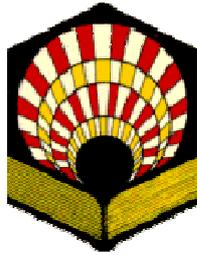


**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**USO DE LEVADURAS SELECCIONADAS
OSMOTOLERANTES, LIBRES Y
COINMOVILIZADAS, PARA LA PRODUCCIÓN
DE VINOS DULCES**

Directores

Juan Carlos García Mauricio

Rafael Peinado Amores

TESIS DOCTORAL

María Teresa García Martínez

Córdoba, Junio 2012

TÍTULO: *Uso de levaduras seleccionadas osmotolerantes, libres y coinmovilizadas,
para la producción de vinos dulces*

AUTOR: *María Teresa García Martínez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

USO DE LEVADURAS SELECCIONADAS
OSMOTOLERANTES, LIBRES Y
COINMOVILIZADAS, PARA LA PRODUCCIÓN
DE VINOS DULCES

Memoria presentada por
María Teresa García Martínez
para optar al grado de
Doctor en Ciencias

La Doctoranda

Los Directores

M^a Teresa García
Martínez

Dr. Juan Carlos
García Mauricio

Dr. Rafael Peinado
Amores

Córdoba, Junio 2012



TÍTULO DE LA TESIS:

USO DE LEVADURAS SELECCIONADAS OSMOTOLERANTES, LIBRES Y COINMOVILIZADAS, PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS DULCES

DOCTORANDO/A:

MARÍA TERESA GARCÍA MARTÍNEZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Dr. Juan Carlos García Mauricio y Dr. Rafael Peinado Amores, como directores de esta tesis doctoral, informan que este trabajo de investigación se ha desarrollado utilizando la metodología adecuada y haciendo uso de las técnicas apropiadas para la consecución de los objetivos propuestos. El resultado final es un trabajo de investigación de una excelente calidad con un elevado potencial de aplicación en la industria vinícola.

Durante el desarrollo de la tesis, la doctoranda ha mostrado en todo momento una alta dedicación e interés por el tema de trabajo, superando con creces los niveles de calidad científica exigibles para la obtención del Grado de Doctor.

La doctoranda ha utilizado distintas técnicas de Microbiología junto con la novedosa tecnología de Proteómica con geles bidimensionales, muy útil para el estudio a gran escala de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*. También, se han utilizado técnicas de análisis cromatográficas que han permitido la caracterización de los mostos y vinos objeto de estudio. El eje central de la tesis ha sido el estudio de un nuevo sistema de inmovilización y su aplicación para la obtención de vinos dulces procedentes de mostos de uva pasificada.

Durante la realización de este trabajo, Dña. María Teresa García Martínez ha mostrado una gran capacidad de trabajo, no sólo en el plano científico sino también en la formación de otros investigadores noveles. Actualmente, parte de los resultados presentados están en fase de redacción para su pronta publicación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de Mayo de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dr. JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO Fdo.: Dr. RAFAEL PEINADO AMORES

*A Juan Carlos,
A Carlos y
A Miguel*

«No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas»

Lucio Anneo Séneca

(4 a. C. - 65 d. C.)

«Como siempre: Lo urgente no deja tiempo para lo importante»

*Joaquín Salvador Lavado, Quino:
Mafalda (1932)*

i. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se ha realizado de forma paralela con otras actividades, pues cuando empecé la parte experimental con la puesta a punto de la técnica proteómica con geles bidimensionales compaginaba con clases de Formación Profesional Específica y de Formación Profesional no reglada a tiempo parcial, las jornadas eran intensas e interminables pero muy interesantes. En la última etapa de esta Tesis, la dedicación ha sido compartida con la formación de nuevos posibles investigadores a nivel de laboratorio, la preparación y docencia de algunas asignaturas de clases prácticas y el comienzo de una nueva técnica y el funcionamiento de nuevos aparatos que ha adquirido nuestra línea de investigación.

Ahora sólo me queda agradecer, de todo corazón, a todas las personas que han contribuido en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis, Juan Carlos García Mauricio y Rafael Peinado Amores, por haber confiado en mí desde el primer momento, y darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación. Ellos han sido mis guías en este difícil camino, con su apoyo han hecho posible que esta Tesis Doctoral sea una realidad.

A Juan Carlos, por su comprensión y su apoyo sincero en todo momento, por su paciencia, por su pulcritud en el trabajo diario, por su excelente calidad científica, por contagiarme su entusiasmo por la Ciencia. Por tantas cosas, en fin, por todo.

A Rafa, por transmitirme tranquilidad durante mi etapa formativa como investigadora, por restarle importancia a las múltiples dificultades que surgen durante la investigación, por estar ahí.

A M^a Carmen Millán, Isidoro García, Juan Moreno, Julieta Mérida, por apoyarme en todo y animarme a llegar hasta el final.

A mis compañeros y profesores de los departamentos de Microbiología, de Bioquímica, Química Agrícola y Edafología, y de Química Inorgánica e Ingeniería Química, por su ayuda y amistad durante estos años, por hacerme las cosas mucho más sencillas, por estar dispuestas a darme consejos y ánimos día a día.

i. Agradecimientos

A todas las “chicas del PAS”, por hacer más fácil el trabajo diario.

A Marisol Ruiz y Ángel Díaz, propietarios del Centro de Formación de Grado Medio de Peluquería “Grecia Peluqueros”, por comprender mi inquietud científica y permitirme compatibilizar ambas actividades.

A mi familia en general, por el interés mostrado durante este trabajo; y en particular, a mi madre, por estar siempre disponible para cuidar de mis hijos y estar con ellos de la mejor manera que puede estar una abuela mientras yo trabajo fuera de casa; a mi padre, por su apoyo incondicional en todo lo que me propongo. ¡Sois un lujo para mí y para mis hijos! Sin vosotros dos yo no haría la mitad de lo que hago, sin vosotros dos todo sería imposible.

A mis hijos Carlos y Miguel, porque ellos me dan ánimos para continuar, me enseñan a luchar y a seguir trabajando en la vida diaria, y saben cómo hacer para que yo relativice mis contratiempos laborales.

A Juan Carlos, por su apoyo y comprensión, por su confianza en mí para todos nuestros proyectos de vida. Porque sin él nada tiene sentido.

No hubiese sido lo mismo sin vosotros. MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ii. RESUMEN

Algunos tipos de vinos dulces se obtienen a partir de la fermentación total o parcial de mostos con elevada concentración de azúcar. Esta elevada concentración es causa de numerosos inconvenientes como son un difícil arranque de la fermentación, paradas prematuras y elevado riesgo de contaminación microbiana. Por esta razón, la mayoría de los vinos dulces andaluces se elaboran añadiendo alcohol vínico al mosto de uvas pasificadas evitándose de este modo la fermentación alcohólica. Estos vinos poseen aromas asociados al proceso de pasificación, pero carecen de aromas propios de la fermentación alcohólica.

El presente estudio nace de la necesidad de solventar en lo posible los problemas que se pueden presentar durante la fermentación parcial de mostos de uva pasificada. Una posible solución sería la utilización de levaduras osmotolerantes que minimicen los problemas asociados al arranque y/o paradas no deseadas de fermentación y la aplicación de sistemas de inmovilización celular que permitan una detención de la fermentación en el momento deseado.

El sistema de inmovilización utilizado se ha obtenido induciendo una co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentoso GRAS, *Penicillium chrysogenum* H3, aislado del ambiente, y diversas especies de levadura.

Los estudios microscópicos han mostrado que la pared de la biocápsula está compuesta por hifas del hongo filamentoso y células de levaduras atrapadas, asociadas por la secreción de un polímero que, posiblemente, actúa como unión entre ambos microorganismos. Se ha comprobado que, tras cinco días en un medio de fermentación, el hongo filamentoso muere por contacto directo célula de levadura-hifa, quedando éste como un mero soporte inerte para la levadura, siendo posible la utilización de las biocápsulas en procesos fermentativos.

La aplicación de técnicas proteómicas puestas a punto durante el desarrollo de la tesis han permitido comparar el perfil proteómico de *Saccharomyces cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451) en forma libre y coinmovilizada en el medio de formación de biocápsulas. Las proteínas identificadas, expresadas en las células de levadura coinmovilizada, tienen funciones relacionadas con la reparación y maduración del ADN, con el control del ciclo celular; además de con la síntesis y traducción de proteínas, funciones implicadas en el control tanto a nivel de ciclo celular como de transcripción. Los resultados del estudio proteómico sugieren que podría existir una defensa de las células inmovilizadas de levadura frente al hongo bajo las condiciones ensayadas, marcada a través de una serie de controles a nivel de ADN, de ARN y de proteínas.

Para la aplicación del sistema de inmovilización se aislaron e identificaron diversas cepas de *S. cerevisiae* a partir de mostos en fermentación de uva Pedro Ximénez pasificada y se utilizaron varias cepas de hongos filamentosos para su posible coinmovilización. Los resultados mostraron que todas las cepas de levaduras aisladas fueron potencialmente idóneas para fermentar mostos con alta concentración de azúcares. Sin embargo, destacaron las cepas X4 y X5 por su mejor capacidad fermentativa y características

ii. Resumen

sensoriales. El hongo que presentó la mejor coinmovilización fue la cepa de *P. chrysogenum* H3. Se han solicitado dos patentes: P200930239 y P200930240.

Además, se ha conseguido coinmovilizar con éxito otras cuatro cepas de levadura con la cepa de hongo de *P. chrysogenum* H3 y se ha estudiado la actividad fermentativa de las biocápsulas obtenidas y su reutilización en medios azucarados sintéticos. Las biocápsulas obtenidas con las cepas X4 y Uvaferm BC fueron las que se reutilizaron más veces sin pérdida de actividad.

Las cepas seleccionadas X4 y X5, en forma libre, se han utilizado para fermentar parcialmente mostos de uvas Pedro Ximénez pasificadas. El análisis de los vinos obtenidos mediante nariz electrónica y cromatografía de gases ha permitido una clara diferenciación de los vinos parcialmente fermentados de aquellos elaborados de forma tradicional.

Por otro lado, las cepas X4 y X5 se han utilizado en forma libre y coinmovilizada para fermentar parcialmente mostos de uva pasificada. Se obtuvo el perfil aromático de los vinos agrupando, en función de sus descriptores aromáticos, los valores de actividad odorante de los compuestos volátiles analizados. Todas las series aromáticas aumentaron de forma significativa por efecto de la fermentación parcial en relación con los vinos elaborados de forma tradicional. Destacaron los valores de las series química, fruta madura y láctea, tanto en los vinos obtenidos con levadura en forma libre como coinmovilizada.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permiten confirmar que se podrían obtener vinos dulces parcialmente fermentados mediante la aplicación de biocápsulas de levadura. Este sistema de coinmovilización conlleva una serie de ventajas como son, entre otras, la facilidad de retirar las biocápsulas en el momento deseado, y la posibilidad de reutilizar las biocápsulas. Otras posibles ventajas de este sistema serían la agilización de los procesos fermentativos, reducción de costes, y la posibilidad de utilizarse en procesos continuos. Así, la aplicación de nuestro sistema de coinmovilización con levaduras supone una mejora tecnológica frente a la utilización de levaduras en forma libre en la producción de vinos dulces.

La versatilidad de este sistema permitiría aplicarlo no sólo para la fermentación de mostos, sino que usando las levaduras apropiadas podría utilizarse en la desacidificación biológica de mostos, en la segunda fermentación en botella para la obtención de vinos espumosos y en otros procesos industriales como es la obtención de bioetanol.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los Proyectos RTA2008-00056-CO2-02 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA), y RTA2011-00020-CO2-02 por el actual Ministerio de Economía y Competitividad y Fondos FEDER.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ELABORACIÓN DE VINOS DULCES PEDRO XIMÉNEZ.....	1
1.1.1. Descripción de la zona de producción de vinos PX y de las variedades de uva.....	2
1.1.2. El proceso de pasificación.....	3
1.1.3. Proceso de obtención del mosto.....	5
1.1.4. Biodiversidad de levaduras en mostos de uva con alta concentración en azúcares.....	6
1.1.4.1. Respuesta molecular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a las condiciones de estrés a alta concentración de azúcar.....	7
1.1.5. Producción de vinos dulces.....	9
1.2. INMOVILIZACIÓN CELULAR.....	12
1.2.1. Ventajas e inconvenientes de la inmovilización celular.....	12
1.2.2. Tipos de sistemas de inmovilización celular.....	13
1.2.3. Soportes usados en vinificación.....	16
1.2.4. Aplicaciones de la inmovilización celular en vinificación.....	17
1.3. INTRODUCCIÓN A LA PROTEÓMICA.....	21
1.3.1. Electroforesis bidimensional (2-DE).....	25
1.3.2. Espectrometría de masas (MS).....	27
1.4. BIBLIOGRAFÍA.....	30
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
3. METODOLOGÍA.....	45
3.1. MICROORGANISMOS.....	45
3.1.1. Levaduras.....	45
3.1.2. Hongos.....	46
3.2. MEDIOS DE CULTIVO, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN.....	46
3.2.1. Medio y condiciones de formación de biocápsulas de levaduras.....	47
3.2.2. Medios y condiciones para la fermentación alcohólica.....	47
3.2.2.1. Medio y condiciones para estudiar la tolerancia de las levaduras a la glucosa.....	47
3.2.2.2. Medio y condiciones para la fermentación con tubos de diálisis.....	47
3.2.2.3. Medio y condiciones para la producción de vinos dulces.....	48
3.2.3. Conservación de las cepas.....	49
3.2.4. Aislamiento y obtención de cultivos axénicos.....	49

3.3. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.....	49
3.3.1. Microscopio óptico.....	49
3.3.2. Microscopio electrónico.....	50
3.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido (<i>SEM</i>).....	50
3.3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (<i>TEM</i>).....	51
3.4. PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> G1 EN FORMA LIBRE Y BIOINMOVILIZADA.....	52
3.4.1. Preparación de las muestras.....	52
3.4.2. Electroforesis bidimensional.....	54
3.4.3. Tinción de los geles.....	57
3.4.4. Análisis de las imágenes.....	57
3.4.5. Identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF.....	59
3.4.6. Interpretación de los resultados.....	60
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
3.5.1. Recuento del número de células totales.....	62
3.5.2. Recuento del número de células viables.....	63
3.5.3. pH.....	64
3.5.4. Acidez titulable.....	64
3.5.5. Determinación enzimática de metabolitos en mostos y vinos.....	65
3.5.5.1. Determinación de la concentración de etanol.....	65
3.5.5.2. Determinación de la concentración de glucosa y fructosa.....	66
3.5.5.3. Determinación de la concentración de ácido acético.....	67
3.5.5.4. Determinación de la concentración de ácido succínico.....	68
3.5.5.5. Determinación de la concentración de acetaldehído.....	69
3.5.6. Determinación de OTA.....	69
3.5.7. Determinación cuantitativa de proteínas en células de levaduras.....	70
3.5.8. Determinación de los compuestos del aroma.....	72
3.5.8.1. Análisis de los compuestos volátiles minoritarios del aroma.....	72
3.5.8.2. Análisis de los compuestos volátiles mayoritarios del aroma.....	74
3.6. ANÁLISIS SENSORIAL.....	75
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	77
4. RESULTADOS: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y RESULTADOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN.....	81
4.1. Capítulo I: Optimización y caracterización de biocápsulas de levaduras	81
4.1.1. Co-culture of <i>Penicillium chrysogenum</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> leading to the immobilization of yeast.....	81
4.1.2. Aproximación al estudio proteómico comparativo entre <i>S. cerevisiae</i> en forma libre y coinmovilizada con <i>P. chrysogenum</i>	89

*Uso de levaduras seleccionadas osmotolerantes, libres y coinmovilizadas, para la
producción de vinos dulces*

iii. Índice

4.2. Capítulo II: Aislamiento y caracterización de levaduras osmotolerantes y coinmovilización con <i>Penicillium chrysogenum</i>	105
4.2.1. Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares.....	106
4.2.2. Potential use of wine yeasts immobilized on <i>Penicillium chrysogenum</i> for ethanol production.....	109
4.3. Capítulo III: Aplicación de levaduras seleccionadas osmotolerantes libres y coinmovilizadas para la producción de vinos dulces.....	119
4.3.1. Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose.....	119
4.3.2. Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes.....	126
5. INFORME CON EL FACTOR DE IMPACTO Y CUARTOL DEL JCR (SCI y/o SSCI).....	163
6. CONCLUSIONES.....	167
7. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS.....	171
7.1. Otras publicaciones indexadas con índice de impacto.....	171
7.2. Presentación de Comunicaciones a Congresos.....	172
7.3. Recopilación de pósteres.....	174
7.4. Publicaciones no indexadas.....	197



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La producción de Vinos Dulces Andaluces se realiza, principalmente, a partir de uvas previamente pasificadas por exposición directa al sol con un contenido en azúcares próximo a 400 g/L. La elevada concentración de azúcares dificulta la fermentación del mosto, que puede ser muy lenta o incompleta, debido a las condiciones de estrés en las que se encuentran las levaduras, como son elevada presión osmótica y toxicidad del etanol producido por la propia levadura. Las paradas de fermentación provocan un incremento de la inestabilidad microbiana que suele conllevar un aumento de la acidez volátil y la obtención de vinos de baja calidad (Caridi *et al.*, 1999). Puesto que la fermentación alcohólica de estos mostos plantea serios problemas, sería recomendable usar levaduras osmotolerantes autóctonas en forma libre o inmovilizada, como ya han sugerido otros investigadores (Osho, 2005; Zuzuarregui *et al.*, 2005; Malacrinò *et al.*, 2005; Tofalo *et al.*, 2009; Ortiz-Muñiz *et al.*, 2010; López de Lerma y Peinado, 2011).

La presente tesis doctoral estudia la optimización y caracterización de un nuevo sistema de inmovilización (biocápsulas de levaduras) y su aplicación en la elaboración de vinos dulces, a partir de mostos de uva pasificada al sol de la variedad Pedro Ximénez. Mediante el uso de este sistema se solventan algunos problemas técnicos que tiene la producción de este tipo de vinos, en los que se aumenta la concentración en compuestos derivados de la fermentación y se disminuye la cantidad de alcohol vínico que se añade habitualmente, y de este modo, se puede cumplir con las normas de elaboración de los Vinos Dulces Naturales (VDN). En este trabajo se introduce una serie de innovaciones en el sistema de elaboración de vinos dulces basadas en la fermentación parcial de los mostos de uva pasificada, se seleccionan levaduras osmoetanoltolerantes y se estudia la utilización de estas levaduras coinmovilizadas para la producción de vinos dulces de alta calidad con características organolépticas mejoradas.

El consumo del vino se enfrenta actualmente a un mercado cada vez más competitivo, tanto por el alto consumo de cerveza como de otras bebidas destiladas. En este sentido, se requiere una reducción de costes de producción, una salida del producto a la venta en el mínimo tiempo posible, y una mayor publicidad para rescatar y ampliar a nuevos consumidores. Este sistema de coinmovilización celular podría introducir una mejora tecnológica y económica en la producción de vinos dulces.

1.1. ELABORACIÓN DE VINOS DULCES PEDRO XIMÉNEZ

La elaboración de vinos dulces en Andalucía se realiza en tres zonas vitivinícolas con Denominación de Origen Protegida (DOP): Montilla-Moriles (Córdoba), Málaga y Jerez de la Frontera (Cádiz), que producen vinos de postre de alta calidad a partir de uvas parcialmente deshidratadas por exposición directa al Sol. Estos vinos pertenecen a la categoría de los vinos dulces, que según sea su contenido mínimo en etanol procedente de la fermentación parcial del mosto se pueden distinguir 3 tipos:

1. Vinos de licor dulces, contenido mínimo 4 % (v/v) de etanol.
2. Vinos dulces naturales, contenido mínimo 7 % (v/v) de etanol.
3. Vinos naturalmente dulces, contenido mínimo 13 % (v/v) de etanol.

Entre los vinos dulces más conocidos se encuentran: los Pedro Ximénez (PX), que son vinos obtenidos a partir de uvas pasificadas de la variedad del mismo nombre, se cultivan predominantemente en la zona vitivinícola Montilla-Moriles, y los de Málaga, que se elaboran con las variedades de uva Moscatel de Alejandría y/o Pedro Ximénez, fortificados con etanol de origen vínico. Ambos son vinos de postre muy estables. La definición de cada tipo de vino, los productos autorizados y las normas de elaboración están recogidos en los reglamentos de los Consejos Reguladores de cada una de las Denominaciones de Origen correspondientes. En general, se consideran vinos dulces aquellos que tienen un contenido mayor de 45 g/L de azúcar.

1.1.1. Descripción de la zona de producción de vinos PX

Las zonas de producción de vinos PX se sitúan en las localidades de Montilla-Moriles (Córdoba), Málaga y Jerez de la Frontera (Cádiz), siendo la primera de ellas (**Figura 1.1**) la de mayor producción de este tipo de vino dulce. Según Hidalgo (2002), estas zonas de Andalucía se incluyen en la zona V de la clasificación de Winkler y



Figura 1.1. Localización de Montemayor (Córdoba), DOP Montilla-Moriles.

Amerine, además de Grecia, Chipre, Italia y Turquía, que poseen un índice heliotérmico de 2597°C, caracterizado por la suma de temperaturas mayores a 10°C durante el ciclo vegetativo de la vid y con temperaturas máximas diurnas durante el periodo de maduración de la uva que superan los 40°C.

La DOP Montilla-Moriles elabora más del 90% de la producción total de vinos **Pedro Ximénez** por reunir las condiciones climáticas adecuadas como sol, calor, ambiente seco y por ocupar la mayor extensión de cultivo de esta variedad de uva.

La vid se cultiva en estas zonas sobre suelos calizos, siendo los más característicos las albarizas, son de color blanco como la cal, presentan características edafológicas de las margas calizas y poseen un elevado porcentaje de caliza activa, ya que retienen el agua procedente de las cortas pero intensas lluvias en el subsuelo a varios metros de profundidad durante todo el año. En zonas muy concretas se presentan suelos rojos que poseen un mayor porcentaje de arena en la capa superficial y en profundidad se encuentra la marga caliza. Estas características de los suelos condicionan la elección del porta-injertos sobre el que se desarrolla la parte aérea de las variedades de vid cultivadas. Los más usados son el 41 B de Millardet y el 161-49 de Couder, seguidos a gran distancia del porta-injertos 110 de Richter (Valencia, 1990 y López-Alejandre, 2000).

En general, el clima es de tipo semiárido con algunas zonas de tipo seco subhúmedo, con una eficacia térmica de tipo mesotérmico. Las temperaturas medias anuales oscilan entre 13,2 y 19,5°C y las precipitaciones entre 415 y 813 mm al año. Bajo

estas condiciones climáticas tiene lugar la maduración precoz, rápida y completa de las uvas para la elaboración de excelentes vinos dulces.

La variedad de uva más utilizada en la elaboración de los vinos dulces en las zonas de Montilla-Moriles y Málaga es, generalmente, Pedro Ximénez. Es una variedad de uva blanca típicamente mediterránea y el marco de plantación permitido oscila entre 2500-3000 plantas/ha, según la zona (**Figura 1.2**). Tradicionalmente, la vid se conduce mediante poda corta, ciega, y pulgares con dos yemas vistas, aunque en la actualidad se tiende al cultivo en espaldera. Es una variedad de maduración precoz, pero el cultivo de la uva Pedro Ximénez está disminuyendo en zonas costeras, porque los rocíos marítimos la pudren con facilidad debido a que tiene una piel muy fina que la hace muy sensible a la humedad.

Las características enológicas a destacar son la baja acidez titulable de los mostos y su elevado contenido en azúcares. Su hábitat ideal se encuentra en zonas de interior con climas secos y calurosos como la Denominación de Origen Protegida Montilla-Moriles (Córdoba), cuya extensión aproximada es de 7500 ha. La uva Pedro Ximénez, de origen incierto y discutido, es muy versátil utilizándose para la elaboración de vinos generosos de gran finura y elevado grado alcohólico natural como los finos, amontillados, olorosos, palos cortados y el vino dulce que lleva su nombre, también conocido como Pedro Jiménez o Pedro Ximén, según la zona de Andalucía. Es muy sensible al mildew y a la podredumbre.



Figura 1.2. Imagen de la variedad de uva Pedro Ximénez.

1.1.2. El proceso de pasificación

La pasificación de las uvas por exposición directa al sol, también llamado “soleo” o “asoleo”, es un tratamiento post-cosecha que se realiza tradicionalmente de una manera muy similar en las tres zonas citadas del sur de Andalucía. Las características edafoclimáticas particulares de cada comarca y los accidentes meteorológicos que ocurren durante la maduración y el soleo de las uvas determinan la velocidad del proceso y la calidad del mosto obtenido.

Particularmente, en determinadas zonas de la localidad de Montemayor (Córdoba) (**Figura 1.1**), las uvas Pedro Ximénez maduran completamente hasta la primera quincena del mes de agosto, lo que permite comenzar el proceso de soleo con las elevadas temperaturas y el elevado grado de horas de insolación característicos de este mes. Según datos de observatorios meteorológicos situados en la zona, la temperatura media durante el periodo de soleo en un año típico es de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con temperaturas extremas de 45 y 14°C , la humedad ambiente relativa presenta valores medios de $31 \pm 9\%$ y valores

extremos de 82,7 y 8,7% y la radiación solar media de 25,4 MJ/m².día con valores extremos de 28,1 y 16,1 (Junta de Andalucía, 2011).

El proceso de pasificación comienza con la recolección de las uvas sanas y maduras, con un contenido medio en azúcares de 13-14° Baumé (°Bé), que se transportan cuidadosamente hasta las paseras en cajas de plástico alimentario, cuya capacidad máxima es de 15 Kg. Tradicionalmente, los racimos seleccionados se colocaban sobre discos de esparto denominados “capachos, paseras o redores” de 1,5 a 2,0 m de diámetro, pero en la actualidad se usan unas mallas de plástico alimentario de 0,75 m de ancho y 10 m de longitud que se extienden sobre el suelo.



Figura 1.3. Mallas de plástico (Actualmente).



Figura 1.4. Disco de esparto.

Las paseras (**Figuras 1.3** y **1.4**, paseras de Montemayor) se sitúan en terrenos arenosos de suaves pendientes, seleccionados por su orientación al sol, de manera que los racimos reciban el máximo número de horas de luz solar directa. El soleo dura en torno a 7-10 días cuando las condiciones climáticas lo permiten. Sin embargo, en las paseras situadas en zonas de humedad relativa elevada suele durar de 10 a 20 días, e incluso pueden sufrir rocíos nocturnos. Para que todas las uvas se deshidraten homogéneamente, es necesario voltear periódicamente a mano los racimos de uvas y también es conveniente cubrirlos por la noche para protegerlos de la humedad, especialmente en las zonas próximas al mar, como Málaga y Jerez.

Tras alcanzar su punto óptimo de desecación, entre 22-25°Bé, el mosto de uva tiene un contenido en azúcares reductores superior a 350 g/L, las uvas se recogen con especial cuidado para evitar roturas y deterioros (**Figura 1.5**). El grado de pasificación que se obtiene en las uvas de la variedad Moscatel de Alejandría en Málaga es menor que el obtenido en las uvas Pedro Ximénez en Montilla-Moriles. Esto es debido al mayor espesor del hollejo, al mayor tamaño del grano, al menor tiempo expuesto a la pasificación y a la mayor humedad ambiental.



Figura 1.5. Contenedores de plástico con uvas pasificadas.

El principal inconveniente del asoleo es la dependencia de las condiciones ambientales. Una humedad excesiva, tormentas inesperadas o algunos días sucesivos de lluvia pueden arruinar la campaña de soleo, principalmente porque en estas condiciones se favorece el desarrollo de hongos filamentosos como *Aspergillus*. Estos hongos son los predominantes durante la maduración, recolección y el periodo de soleo, cuando el ambiente es cálido y húmedo (Valero *et al.*, 2005). Los mostos obtenidos a partir de uvas

afectadas por *A. nigri* presentan contenidos de Ocratoxina A (OTA) superiores al límite establecido de 2 µg/L para toda clase de vinos pero, afortunadamente, cuando el proceso de soleo se realiza en condiciones óptimas, el contenido en OTA es menor de 0,1 µg/L (Serratosa *et al.*, 2008).

En cuanto a los **cambios físicos**, se observa que la piel de la uva se arruga progresivamente, se pardea, pierde elasticidad y se hace frágil debido a la exposición directa al sol que conlleva una pérdida de agua de hasta el 50%, y el denominado “escobajo o raspón” también se oscurece y se seca. Las uvas desecadas contienen poco zumo, de modo que el agotamiento completo sólo se consigue utilizando métodos enérgicos de prensado. A medida que el grado de asoleo es mayor, el color de los mostos cambia desde el amarillo al pardo rojizo, la densidad y viscosidad aumentan y el mosto que se obtiene es cada vez más dulce y menos ácido. El olor de estos mostos es poco perceptible por vía nasal; sin embargo, por vía retronasal se aprecian olores a pastel, caramelo y heno seco. En boca resultan dulces y suaves.



Figura 1.6. Racimo de uva PX pasificada.

En cuanto a los **cambios químicos**, la principal consecuencia de la pérdida de agua del grano de uva es el aumento de la concentración de las sustancias disueltas en el mosto que se obtiene de las uvas maduras al inicio del asoleo. Según Franco *et al.*, (2004), los valores de la acidez titulable y el pH aumentan en la misma proporción que disminuye el contenido en agua.

Los componentes del mosto de uva pasificada se clasifican según su importancia cuantitativa y enológica. Así pues, la pasificación produce un aumento de las concentraciones de los compuestos químicos mayoritarios de la uva, azúcares y ácidos, aunque en proporciones diferentes, ya que los ácidos pueden incluso disminuir su concentración. Este diferente comportamiento se puede explicar por las transformaciones que los ácidos experimentan en función de la actividad de enzimática de la uva, que a su vez depende de su estado fisiológico y de la temperatura. Está descrito que la acidez aumenta en menor medida que los azúcares, debido a la pérdida de agua y al consumo de ácido málico (Flanzy, 2000; Bellincontro *et al.*, 2004), que presenta contenidos menores de 1 g/L en el mosto de uva madura Pedro Ximénez (López *et al.*, 1988). El aumento de pH y de la capacidad tampón (Peinado *et al.*, 2009) de los mostos sugiere un aumento en el porcentaje de salificación del ácido tartárico (Moreno y Peinado, 2010).

1.1.3. Proceso de obtención del mosto

Una vez llegado al punto óptimo de pasificación, los racimos de uva tienen una concentración en azúcares superior a 350 g/L. Se recogen y se seleccionan de las mallas sólo aquellos racimos que están en perfecto estado sanitario para la elaboración de vino y se transportan inmediatamente al lagar en contenedores de plástico. Según el grado de pasificación de la uva, pueden obtenerse mostos de diferente riqueza en azúcares con diferente color y también con diferentes características aromáticas.

Los racimos se colocan sobre una prensa de platos horizontales de pequeño diámetro, donde se consigue un primer mosto (**Figura 1.7**). La pasta resultante se somete



Figura 1.7. Imagen de una prensa horizontal.

a un segundo prensado en prensas verticales (**Figura 1.8**), que pueden alcanzar presiones de hasta 300 atm, se obtiene un segundo mosto de color más oscuro. El rendimiento mínimo en mosto de las uvas pasificadas se sitúan sobre los 30-40 L por cada



Figura 1.8. Imagen de una prensa vertical.

100 kg de uva fresca. La pasta resultante del prensado de las uvas pasificadas son los hollejos y las pepitas, que se reutilizan para la obtención de alcohol vínico y compost. El mosto se alcoholiza hasta un mínimo de 8% de etanol.

1.1.4. Biodiversidad de levaduras en mostos de uva con alta concentración en azúcares

La composición microbiana de levaduras en el mosto de uva contribuye significativamente en las características organolépticas del vino producido debido a su actividad metabólica. La biodiversidad de especies de levaduras de mostos de uva se ha descrito desde hace tiempo, y éstas pertenecen principalmente a los géneros *Hanseniaspora* (forma anamórfica *Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, y ocasionalmente, también pueden encontrarse especies de otros géneros como *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera* y *Schizosaccharomyces* (Fleet, 2003; 2008) (**Figura 1.9**).

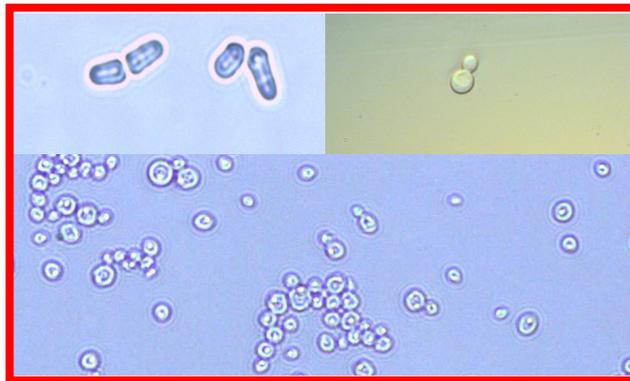


Figura 1.9. Fotografías de diversos géneros de levaduras.

Estas levaduras proceden de los granos de uva y del ambiente de la bodega. Se sabe que muchas de las especies de las no-*Saccharomyces*, productoras de bajo grado alcohólico, (especialmente de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*) inician espontáneamente la fermentación alcohólica del mosto de uva, pero pronto son reemplazadas por el crecimiento de *S. cerevisiae*, levadura más tolerante al etanol, de tal manera que predomina desde la mitad hasta el final del proceso, frecuentemente queda ésta como única especie (Fleet, 1998). Sin embargo, existen pocos estudios sobre las

poblaciones de levaduras en mostos con elevado contenido en azúcares. Se ha descrito que en uvas pasificadas al sol de la variedad Pedro Ximénez (DOP Montilla-Moriles) el contenido de mohos y bacterias lácticas y acéticas de los mostos muy azucarados depende del estado sanitario de la uva y de las condiciones de pasificación; aunque, una vez finalizada la fermentación los mohos desaparecen y el número de bacterias se reduce significativamente (García-Martínez *et al.*, 2008).

S. cerevisiae es un hongo sacarofílico y en su ambiente natural se encuentra con concentraciones elevadas de azúcares (Erasmus *et al.*, 2003). Para la producción de vinos dulces, la concentración de azúcar puede ser superior al 50% (p/v). Numerosas cepas de *S. cerevisiae* poseen una apreciable capacidad para resistir al estrés osmótico y producir etanol a partir de la fermentación de mostos de uva con concentraciones elevadas de azúcar (Malacrinò *et al.*, 2005). Urso y colaboradores (2008) han investigado la biodiversidad y dinámica de levaduras por métodos moleculares durante la producción de vino dulce obtenido a partir de uvas pasas. Sobre las uvas se destacó una gran biodiversidad de mohos, mientras que las levaduras llegaron a ser importantes solamente en los mostos, aislándose no-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida*, *Torulaspota* y *Debaryomyces*) y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta última especie fue la que condujo y finalizó la fermentación y contribuyó a las características finales de los vinos dulces obtenidos. Recientemente, Tofalo y colaboradores (2009) han encontrado distintas especies de levaduras osmotolerantes como *Candida zemplinina*, *C. apicola* y *Zygosaccharomyces bailii* a través de todo el proceso de fermentación de mostos con elevado contenido en azúcares, mientras que *S. cerevisiae* prevaleció después de los 15 días de fermentación.

Varios investigadores han sugerido que ciertas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, tales como *Kloeckera apiculata*, *C. stellata* y *T. delbrueckii*, podrían tener mejor capacidad que *S. cerevisiae* para crecer durante la fermentación de mostos con elevada concentraciones de azúcares y mejorar las características de los vinos dulces (Bely *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2009).

1.1.4.1. Respuesta molecular de *Saccharomyces cerevisiae* a las condiciones de estrés a alta concentración de azúcar

Hohmann y Mager (2003) definieron el estrés en su libro titulado “Respuestas de las levaduras al estrés” de la forma siguiente: “las condiciones ambientales que amenazan a la supervivencia de una célula o al menos le impiden funcionar óptimamente son comúnmente denominadas estrés celular”. Muchos factores exógenos pueden ser peligrosos para las células como cambios de temperatura, presión osmótica, limitación nutritiva, condiciones oxidativas y presencia de productos químicos, como metales pesados, sales, herbicidas, compuestos tóxicos o subproductos metabólicos.

Durante la producción de vino, las células de levadura están afectadas por varias condiciones que son adversas al crecimiento y a la viabilidad, como elevada concentración de azúcar o de etanol, por lo que las levaduras deberían responder a estas condiciones, pues de lo contrario la fermentación alcohólica se puede afectar negativamente. Por lo tanto, una de las condiciones de estrés que puede afectar a las células de *S. cerevisiae* durante su crecimiento en mostos de uva de alta concentración en

azúcar es el estrés osmótico. Las células de levadura en elevada concentración de glucosa tienen una velocidad de crecimiento menor durante la fase inicial de fermentación e incluso esta condición puede contribuir a paradas de fermentación (Guidi *et al.*, 2010).

S. cerevisiae se adapta al aumento del estrés osmótico aumentando la producción de glicerol intracelular como soluto compatible para así compensar la presión osmótica. Se ha observado que algunas levaduras tienen bombas de glicerol activas (Hohmann, 2002). Sin embargo, el estrés osmótico no sólo induce la acumulación de osmolitos, sino que también tiene un gran impacto sobre la fisiología celular, como la reorganización del citoesqueleto, la dinámica de los cambios de la pared celular, la alteración de la homeostasis de iones, los ajustes metabólicos y la detención de ciclo celular, así como un efecto muy notable sobre la expresión génica (Hohmann, 2002; Nadal y Posas, 2008).

La respuesta osmorreguladora en *S. cerevisiae* se está estudiando mucho en la actualidad (Erasmus *et al.*, 2003; Hohmann y Mager, 2003; Jiménez-Martí *et al.*, 2011a; b). La ruta clave que permite a las células de *S. cerevisiae* recibir y responder rápidamente a cambios en la osmolaridad es la MAPK HOG (*Mitogen Activated Protein Kinase High Osmolarity Glycerol*) (Capaldi *et al.*, 2008). Las rutas MAPK están altamente conservadas en eucariotas. Consisten en cascadas de proteínas quinasas actuando unas sobre otras a través de fosforilaciones consecutivas. También se ha comprobado que está implicada la ruta RAS-cAMP PKA, que interviene en la regulación del crecimiento celular, en la reserva de carbono y en la respuesta al estrés (Erasmus *et al.*, 2003).

El paso clave de la síntesis del glicerol está catalizado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica dependiente de NAD^+ , que convierte dihidroxiacetona-fosfato en glicerol-3-fosfato con la generación de NAD^+ . Dos isoformas de esta enzima están codificadas por los genes *GPD1* y *GPD2*. Se ha comprobado que el gen *GPD1* se induce por estrés osmótico (Erasmus *et al.*, 2003, Zuzuarregui *et al.*, 2005). Sin embargo, la expresión de *GPD2* no se induce por dicho estrés (Pigeau y Inglis, 2007), por lo que parece que tiene un papel en el mantenimiento del equilibrio de redox en condiciones anaerobias (fermentación).

Un aumento de la producción de glicerol requiere un aumento equimolar de la formación de NADH citoplásmico. En condiciones de elevado estrés osmótico, esta exigencia parece estar parcialmente resuelta por la disminución de la reducción de acetaldehído a etanol y por un aumento de la oxidación a acetato. Por lo tanto, en condiciones de estrés, la formación de acetato juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox en las células de levadura (Erasmus *et al.*, 2003). Esto puede ocurrir por la acción de la aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , que reduce NAD^+ a NADH oxidando el acetaldehído a ácido acético (**Figura 1.10**). Pigeau y Inglis (2007) describieron que la aldehído deshidrogenasa responsable del aumento de ácido acético en vinos con elevada concentración de azúcares está codificada por el gen *ALD3*, pero no por los genes *ALD2*, -4, -5 y -6.

Estudios sobre transcritómica y proteómica en levaduras en condiciones de estrés a alta concentración de azúcar muestran que existe un aumento en la regulación de los genes de las rutas de la glicolisis, de las pentosas fosfato, del glicerol, de la trehalosa, en la producción de ácido acético a partir de acetaldehído y de succinato a partir de

glutamato (Erasmus *et al.*, 2003; Pham y Wright, 2008; Guidi *et al.*, 2010; Jiménez-Martí *et al.*, 2009; 2011b).

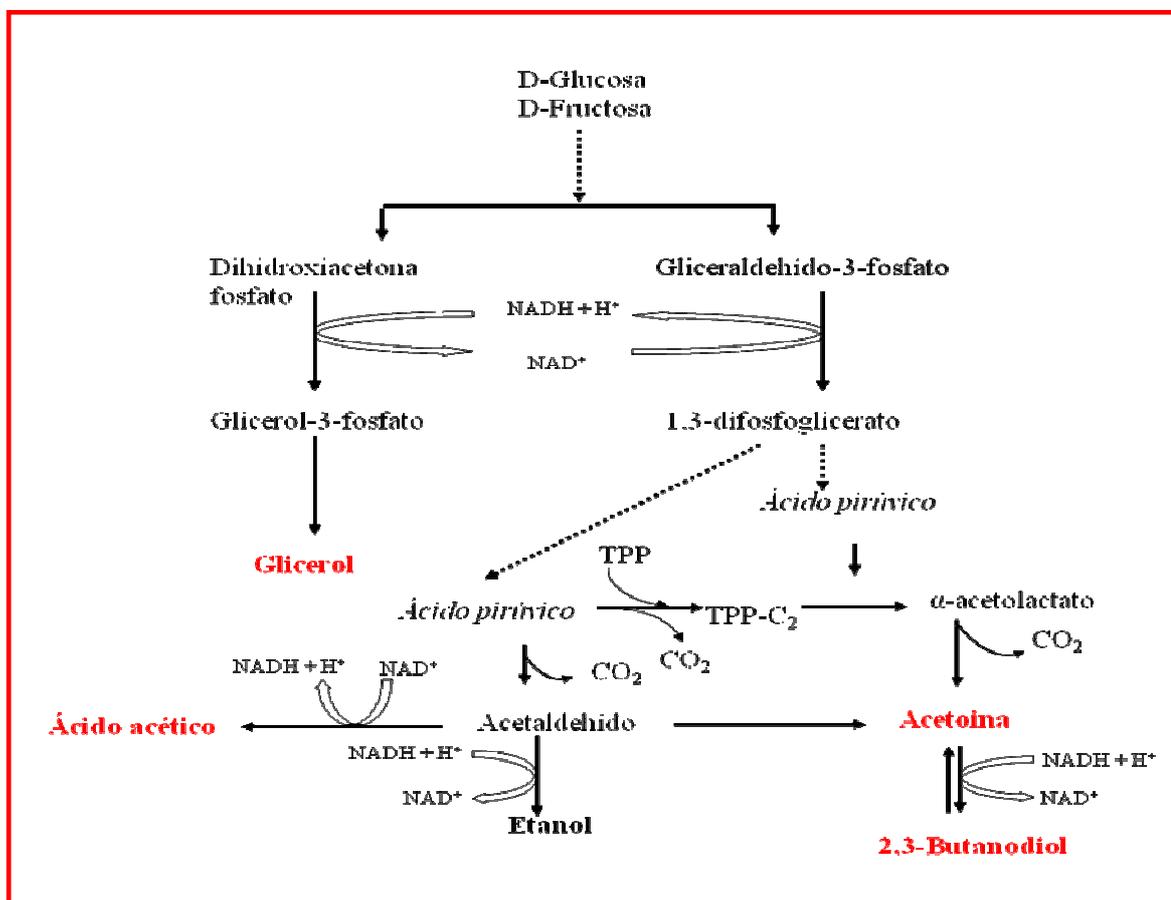


Figura 1.10. Esquema de la fermentación alcohólica y gliceropirúvica. Puntos de control para el mantenimiento del equilibrio redox.

1.1.5. Producción de vinos dulces

Según el reglamento de la DOP Montilla-Moriles, el vino Pedro Ximénez es un vino de licor de calidad producido en regiones determinadas (VCPRD), con un contenido mínimo en azúcares de 272 g/L, obtenido a partir de uva soleada de la variedad Pedro Ximénez y cuyo contenido en etanol procede de la fermentación alcohólica parcial del mosto.

Cuando se usa *S. cerevisiae* para fermentar mostos con alta concentración en azúcares se presentan dos importantes problemas técnicos. El primero de ellos es un inicio complicado de la fermentación, que provoca una fase de adaptación demasiado larga y, en consecuencia, fermentaciones muy lentas y paradas prematuras no deseadas. El segundo problema es la dificultad de detener la fermentación en el momento óptimo para obtener el tipo de vino buscado. Además, estos problemas pueden favorecer el desarrollo de microorganismos indeseables que aumentan la acidez volátil, originando vinos de baja calidad (Caridi *et al.*, 1999). Salmon y Mauricio (1994) observaron una

menor actividad en el transporte de glucosa en levaduras que fermentan medios con una elevada concentración de azúcares.

No obstante, el nivel actual de conocimientos y la aplicación de biotecnologías apropiadas permiten la fermentación de estos mostos mediante levaduras seleccionadas por su elevada tolerancia al azúcar y al etanol y así lo han sugerido numerosos autores (Osho, 2005; Zuzuarregui *et al.*, 2005; Malacrinò *et al.*, 2005; García-Martínez *et al.*, 2007; Tofalo *et al.*, 2009; Ortiz-Muñiz *et al.*, 2010; López de Lerma y Peinado, 2011).

A partir del vino base, en el mercado se puede encontrar dos tipos de vinos dulces según el tiempo de envejecimiento: vino Pedro Ximénez de Añada, encabezado de nuevo hasta 15% (v/v) de etanol y sin periodo de crianza, y vino Pedro Ximénez de Soleras, con periodo de crianza oxidativa mediante el tradicional sistema de criaderas y solera (Berlangua *et al.*, 2004a y 2004b), el cual modifica de forma considerable las características organolépticas del vino de partida.

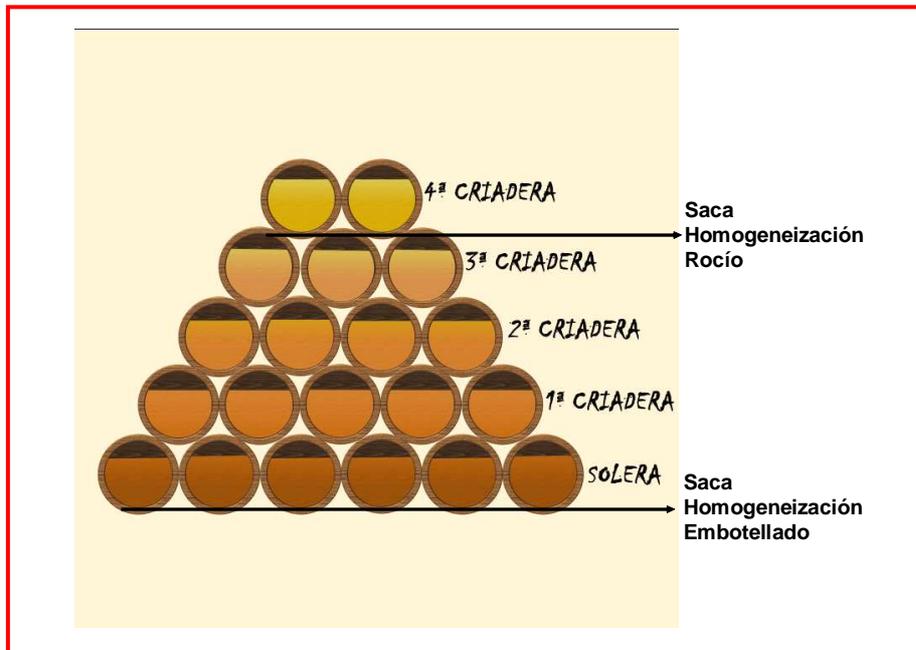


Figura 1.11 Diagrama de envejecimiento mediante el sistema de criaderas y solera.

El sistema de criaderas y soleras es un método de crianza y envejecimiento dinámico de ciertos vinos, que se fundamenta en la mezcla de vinos, de diferentes edades medias, almacenados en varias escalas superpuestas de botas viejas a través de adecuadas operaciones sucesivas de extracción (saca), homogeneización y relleno (rocío) del vacío producido en cada bota de la escala a rociar (**Figura 1.11**). De este modo, se consigue un producto homogéneo a lo largo del tiempo, y que los vinos más jóvenes que se incorporan al sistema se beneficien de las aportaciones organolépticas de los más envejecidos. A cada conjunto de botas con vinos de la misma edad media se le llama “escala”. A las botas que contienen los vinos más viejos se les llama “solera” por estar próximas al suelo. A la escala colocada encima de las soleras, con vinos también viejos

pero algo más jóvenes se les llama “1ª criadera”, a la siguiente “2ª criadera” y así hasta llegar a los vinos más jóvenes, normalmente hasta cuatro alturas de botas. Las botas son de madera de roble americano envejecida, puesto que no se desea que aporte taninos ni aromas propios de las botas nuevas, sino que actúe de envase por cuyos poros penetre el oxígeno del exterior. Las botas se suelen llenar hasta aproximadamente las 5/6 partes para que quede una superficie libre donde el oxígeno oxida lentamente al vino, modificando así sus características organolépticas.

Tras un periodo de envejecimiento no inferior a dos años el vino a comercializar se extrae de la solera. Éste se encabeza hasta su graduación final de 15% (v/v) de etanol, según la normativa vigente (Reglamento CE 1493/1999 del Consejo, 99). El vaciado formado en la solera se rellena con vino de la primera criadera, previamente homogeneizado, ésta con el vino de la segunda, y así sucesivamente hasta la última criadera, que se rocía con el vino Pedro Ximénez del año.

1.2. INMOVILIZACIÓN CELULAR

El uso de sistemas de células inmovilizadas en procesos fermentativos, como la elaboración de productos alimenticios (vino, vinagre, cerveza), es un área de investigación muy atractiva que rápidamente se ha extendido debido a las ventajas técnicas y económicas que presenta cuando se compara con los sistemas tradicionales de células libres (Margaritis y Merchant, 1984; Stewart y Russell, 1986; Kourkoutas *et al.*, 2002).

En 1916, Nelson y Griffin descubrieron por serendipia que la enzima invertasa de levadura se adsorbía sobre carbón activo y era capaz de catalizar la hidrólisis de la sacarosa. A partir de este momento, se publicaron varios trabajos sobre la inmovilización de enzimas con uniones covalentes a distintos soportes. Pero no fue hasta 1969 cuando la inmovilización de enzimas comenzó a aplicarse en la industria por Chibata y colaboradores en Japón para la obtención de L-aminoácidos y N-acil-D-aminoácidos, mediante la inmovilización de una amino-acilasa de hongo sobre DEAE-Sephadex.

Posteriormente, se intentó inmovilizar células enteras para evitar pérdidas de actividad catalítica, ahorrar los costes de la purificación de la enzima y llevar a cabo procesos multienzimáticos. De modo que, los cultivos de células inmovilizadas comenzaron como una derivación de los procesos de enzimas inmovilizadas. La primera aplicación industrial de células microbianas inmovilizadas fue realizada con éxito por Chibata y colaboradores en 1973 en Japón para producir L-aspartato a partir de fumarato y de amonio mediante el atrapamiento de *Escherichia coli* en gel de poliacrilamida, esta bacteria tiene una elevada actividad aspartasa (Chibata *et al.*, 1974). Kennedy y colaboradores (1976) inmovilizaron células microbianas sobre hidróxidos metálicos.

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). Actualmente, los sistemas de inmovilización se aplican a biocatalizadores, como enzimas, orgánulos celulares, microorganismos, células animales y vegetales, que queden confinados en un espacio definido, de tal modo que conserven sus actividades y puedan ser reutilizados repetidamente durante un largo periodo de tiempo.

1.2.1. Ventajas e inconvenientes de la inmovilización celular

El uso de sistemas de células inmovilizadas en procesos fermentativos ofrece una serie de ventajas frente a los procesos tradicionales con células libres como son:

- prolongan la actividad y la estabilidad de los biocatalizadores
- mejoran la productividad de las fermentaciones, debido a que se puede alcanzar una mayor concentración de células
- acortan el tiempo del proceso
- posibilidad de trabajar con células no proliferantes
- reducen el riesgo de contaminación
- posibilitan procesos continuos de fermentación que se pueden optimizar y controlar mejor

- aumentan la tolerancia a sustancias inhibitoras a alta concentración de sustrato y al producto final
- posibilitan la realización de fermentaciones a baja temperatura para mejorar la calidad del producto
- introducen y retiran fácilmente los microorganismos de los medios de cultivo después de la total o parcial biotransformación de los sustratos en el momento más deseado y conveniente
- reutilizan las células
- posibilitan la realización de fermentaciones a menor escala reduciendo costes y facilitando el uso de una variedad de cepas microbianas que incluyen organismos modificados genéticamente.

Los inconvenientes asociados a los propios sistemas de inmovilización celular son:

- incremento de la turbidez, debido al desprendimiento de células, que dependerá del método de inmovilización empleado
- inestabilidad mecánica del soporte usado
- pérdida de actividad celular en operaciones prolongadas.

La mayor dificultad que presenta cualquier sistema de inmovilización celular es conseguir mantener las células inmovilizadas en unas condiciones fisiológicas óptimas, ya que se alteran con el tiempo, debido fundamentalmente a que los inmovilizados están sometidos a unas condiciones no naturales.

1.2.2. Tipos de sistemas de inmovilización celular

Según la técnica o el método de inmovilización los sistemas de células inmovilizadas se pueden clasificar de la siguiente manera:

A. Inmovilización natural

Bajo determinadas circunstancias ciertos microorganismos se unen entre sí de forma natural y espontánea, sin ningún tratamiento formando agregados, flóculos, micelios, velos, o se unen a determinados tipos de soportes o matrices produciendo biopelículas, en las que los microorganismos se encuentran atrapados por polímeros extracelulares secretados por ellos mismos. Un tipo de inmovilización natural lo constituyen las bacterias del ácido acético (vinagre) o las levaduras de flor (crianza biológica de vinos), que producen espontáneamente un velo sobre la superficie del vino (Peinado y Mauricio, 2009). También se ha conseguido la inmovilización celular mediante modificaciones genéticas.

B. Inmovilización artificial

Para el resto de microorganismos que no se pueden inmovilizar de una manera natural, existen los siguientes sistemas de inmovilización, que sirven tanto para microorganismos como para orgánulos, enzimas, células animales y vegetales (Webb *et al.*, 1986; Tanaka y Kawamoto, 1999; Kourkoutas *et al.*, 2004; Willaert, 2007).

B.1. Sistemas de inmovilización por retención física

B.1.1. Atrapamiento con matrices porosas

Este sistema de inmovilización consiste en la retención física del biocatalizador en una red de una matriz constituida por uno o varios polímeros, que pueden ser naturales (colágeno, alginato, carragenato) o sintéticos (poliacrilamida, poliuretano). La matriz rígida debe permitir la difusión de sustratos y productos, además de hacer posible el crecimiento y mantenimiento de las células activas. En general, el proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de las células en una solución del monómero. La polimerización se inicia por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, éstas suelen ser más resistentes que los geles.

B.1.2. Inclusión en membranas

B.1.2.1. Microencapsulación

En este tipo de inmovilización las células están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de las propias células. Pueden ser de polímeros sintéticos, liposomas o microcápsulas de celulosa. Las microcápsulas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro.

B.1.2.2. Reactores de membrana

Los reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato e impermeables a las células. Mediante una bomba se establece un flujo líquido donde el producto atraviesa la membrana del reactor. El desarrollo de reactores o sistemas que contengan células atrapadas con membranas ha despertado gran interés en la industria.

B.2. Sistemas de inmovilización por unión química

B.2.1. Unión a soportes

Son los sistemas de inmovilización más usados en procesos biotecnológicos y de los que se dispone de mayor información. El biocatalizador se puede unir a un soporte insoluble en agua mediante fenómenos de adsorción (interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, por puentes de hidrógeno), por unión covalente (enlaces diazo, enlaces peptídicos) y más raramente por uniones bioespecíficas. En el primer caso tiene el problema de que los microorganismos pueden separarse del soporte, con pérdida de actividad del inmovilizado, ya que las uniones no son covalentes.

Los soportes se pueden clasificar en dos grandes grupos:

B.2.1.1. Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo existe una gran variedad de soportes, que pueden ser *naturales* (arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice, magnetita, entre otros) o *materiales manufacturados* (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, entre otros).

B.2.1.2. Soportes orgánicos. Se pueden dividir en:

Polímeros naturales:

- polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar, agarosa, alginatos, quitina).
- proteínas (gelatina, albúmina, colágeno, queratina).

Polímeros sintéticos:

- poliolefinas (poliestireno).
- polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos).
- otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas).

B.2.2. Reticulado o Entrecruzamiento

Este método consiste en usar reactivos bifuncionales como el glutaraldehído, diisocianato de tolueno o de hexametileno, para formar bases de Schiff con grupos funcionales de los biocatalizadores, produciendo un entramado de redes insolubles en agua. En este caso, las propias células actúan como soporte.

En la **Figura 1.12** se muestra un resumen de los tipos de inmovilización celular que existen hasta la actualidad.

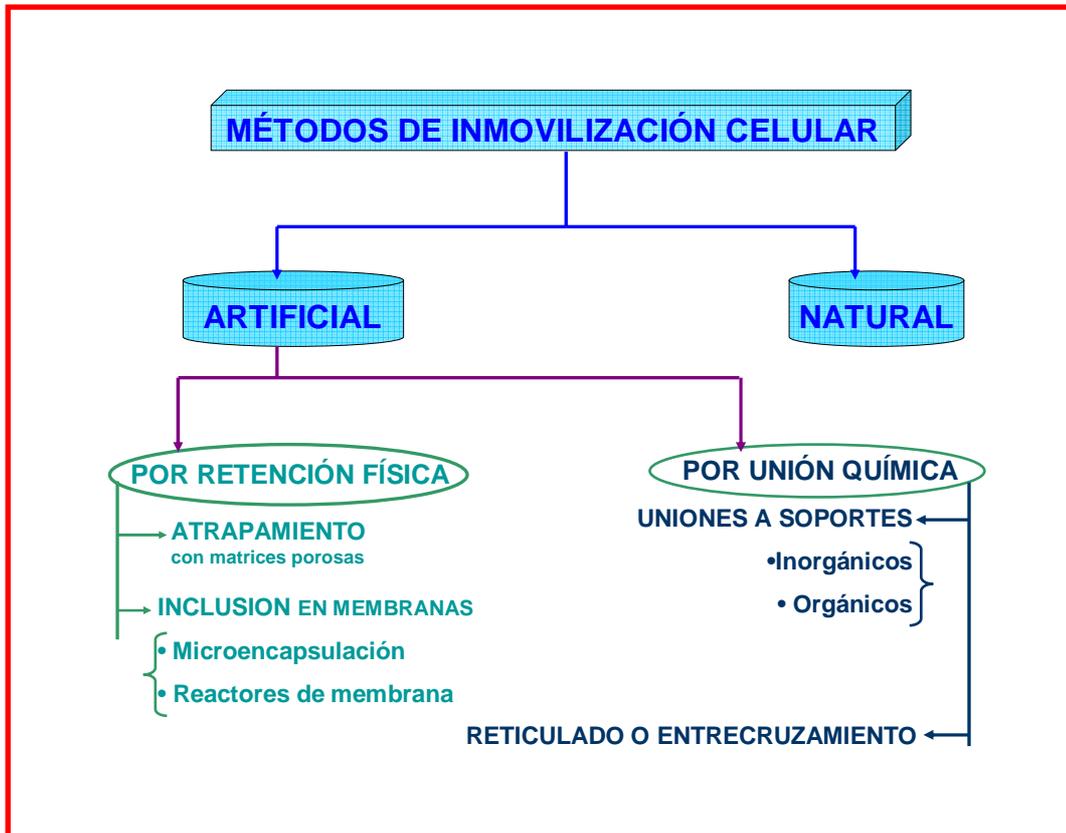


Figura 1.12. Esquema de los métodos básicos de inmovilización celular.

1.2.3. Soportes usados en vinificación

A nivel industrial, la utilización de células inmovilizadas ofrece varias ventajas generales, de las cuales las más importantes son la posibilidad de intensificar procesos tecnológicos, la reutilización de la biomasa celular sin pérdida de su actividad catalítica y la obtención más fácil del producto final. A pesar de esto, el uso de células inmovilizadas en productos alimenticios está todavía limitado a la investigación a escala piloto, quizás entre otras razones por el uso de soportes adecuados (Martynenko y Gracheva, 2003).

Uno de los aspectos más importantes y críticos en la inmovilización celular aplicada a la Enología es la selección de un soporte adecuado o matriz. Los soportes usados para inmovilización en la industria alimenticia deben ser materiales de grado de pureza alimentaria, además de baratos, abundante en la naturaleza y de fácil manejo en la industria. En el caso de soportes aceptados para la producción de vinos deben, incluso, tener características como ser de naturaleza no degradables, ideales para fermentaciones a baja temperatura, no susceptibles de contaminación, aptos desde el punto de vista alimenticio, no tóxicos, higiénicos, químicamente inactivos y no deben influenciar la composición sensorial del vino (Kandylis *et al.*, 2008).

Uno de los primeros soportes ensayados fue la poliacrilamida, que presenta unas excelentes propiedades de resistencia mecánica, pero tiene el grave inconveniente de ceder monómeros tóxicos al vino, llegando incluso a inhibir la viabilidad de las células incluidas (Hidalgo, 2003). Los geles de carragenato y de alginato también se han usado para la producción de vinos, ambos son polisacáridos naturales extraídos de algas marinas. Los geles de alginato son los soportes más adecuados para la inmovilización de levaduras en la elaboración de los vinos espumosos.

En la actualidad existe un producto comercializado denominado “perlas de alginato” que consiste en incluir los microorganismos en una matriz de alginato cálcico, que es permeable a los sustratos y metabolitos entre el medio y los microorganismos, además no libera células de levadura al mosto o vino. La gelificación de carragenato y alginato se producen a temperaturas bajas en presencia de cationes de potasio o de calcio. Se obtienen unas esferas o perlas de unos 2 mm de diámetro con dos zonas diferentes: una capa externa hecha con alginato estéril y una zona interna que contiene células de levadura activas. Aproximadamente tiene 2,5 millones de células de levadura vivas por gramo. En estos sistemas de inmovilización conviene evitar la multiplicación celular en el interior del gel para impedir la liberación de células al exterior y la retención de CO₂ y etanol por el soporte que podría inhibir el proceso de fermentación.

Investigadores de la Universidad de Patras (Grecia) han estudiado y comparado el uso de multitud de soportes para la producción de vinos como el Kissiris (una roca volcánica porosa), bolitas porosas de γ -alúmina, perlas de alginato cálcico, material celulósico deslignificado, bolitas de gluten, trozos de frutas (pera, manzana, membrillo y muchos más), hollejos de uva, corcho, trigo, cebada (Bakoyianis *et al.*, 1997; Kourkoutas *et al.*, 2002; Mallouchos *et al.*, 2003; Mallios *et al.*, 2004; Tsakiris *et al.*, 2010; Kandyllis *et al.*, 2010; 2012).

1.2.4. Aplicaciones de la inmovilización celular en vinificación

La inmovilización celular tiene una serie de aplicaciones, algunas se han llevado a cabo a nivel industrial y otras se están adaptando en Enología a nivel de laboratorio para su estudio. A continuación, se describen las más importantes.

1.2.4.1. Para producir vinos espumosos. A finales de la década de los años 80, la inmovilización celular se estudió sobre todo para la realización de la segunda fermentación en botella de los vinos espumosos, porque aporta una mejora tecnológica que reduce trabajo, tiempo y, por lo tanto, costes.

Durante el proceso de removido (giro de la botella) el vino y el interior del vidrio deben quedar perfectamente limpios y transparentes. La inclusión de levaduras en bolas de alginato cálcico evita su propagación en el conjunto de la botella. Como las levaduras quedan atrapadas en el gel de alginato, el removido manual puede eliminarse, bastan sólo algunos segundos para que las bolas se sedimenten sobre el cuello de la botella cuando ésta se introduzca cabeza abajo en la balsa de desgüelle. La retirada de las levaduras es muy rápida.

No obstante, se han detectado algunos inconvenientes en su uso, debido a la naturaleza del soporte, se ha comprobado que, en algunos casos, existe un incremento de calcio en el vino. Este hecho conlleva a problemas de precipitación de tartrato de calcio. Para evitar la liberación de células de levadura, las perlas de alginato se sellan con una capa estéril de alginato cálcico. También se ha visto en alguna ocasión que este sistema ralentiza la toma de espuma. Incluso se han detectado diferencias organolépticas respecto al uso del sistema tradicional de células libres (Hidalgo, 2003).

Otro soporte que se ha usado para la segunda fermentación en botella son los criogeles de alcohol de polivinilo, pero antes se somete a las células a un tratamiento que inhibe el crecimiento y la proliferación de las células de levadura sin afectar a la actividad de fermentación para prevenir la liberación de las células de la matriz (Martynenko *et al.*, 2004).

Otras alternativas para la producción de vino espumoso por células inmovilizadas son la de encapsulación dentro de un recinto o de una membrana semipermeable y el empleo de levaduras floculantes. Los soportes tipo cápsula o contenedores de microorganismos han sido ensayados con membranas de diversos materiales como nylon, colodión, éster de celulosa, teflón, policarbonato. Las cápsulas suelen ser cilíndricas y están acopladas al obturador de polietileno convencional. Sin embargo, los resultados han sido mediocres ya que no han permitido realizar segundas fermentaciones completas, posiblemente porque se produce una cierta inhibición del desarrollo de las levaduras debido a la presencia de la elevada concentración de gas carbónico en la cápsula que modifica el pH intracelular, pero el principal inconveniente es que encarece mucho el producto.

En el caso del uso de levaduras floculantes, se han encontrado varios inconvenientes. El pie de cuba o cultivo iniciador de este tipo de levaduras tiende a producir olores a reducido, además se ha visto la dificultad de multiplicación del pie de cuba, debido a que estas levaduras crecen lentamente, necesitan un sistema de agitación continua y se aglomeran de forma que es difícil su utilización y dosificación en la industria (Hidalgo, 2003).

1.2.4.2. Para el tratamiento de las paradas de fermentación o fermentaciones lentas.

Se sabe que las fermentaciones a bajas temperaturas mejoran la calidad del vino y reduce la toxicidad sobre las levaduras. Sin embargo, a bajas temperaturas las levaduras crecen más lentamente y pueden producirse paradas de fermentación. El uso de levaduras inmovilizadas a bajas temperaturas evita la ralentización de este tipo de fermentaciones, porque la biomasa introducida es mayor, y en consecuencia, aumenta la productividad en relación a levaduras libres (Kandyliis *et al.*, 2008; 2010).

1.2.4.3. Para la desacidificación biológica. Un microorganismo que se usa para controlar la desacidificación biológica de mostos es *Schizosaccharomyces pombe*. Esta levadura es una buena alternativa para la eliminación del ácido málico y para la desacidificación química (Guo y Tsay, 1989; Silva *et al.*, 2003). Normalmente, se le considera un contaminante, porque si permanece mucho tiempo en el vino después de la fermentación alcohólica o de la maloláctica, puede producir malos caracteres organolépticos. La nueva tecnología de la encapsulación en alginato permite monitorizar y retirar con rapidez esta levadura, solucionando el problema de los malos olores. Las ventajas de aplicación son la facilidad y rapidez de uso. El consumo del ácido málico se puede parar fácilmente cuando se alcance el nivel deseado.

1.2.4.4. Para producir vinos dulces. Los problemas asociados a la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar se minimizarían con la utilización de levaduras osmotolerantes inmovilizadas. Dado que los vinos fermentados con levadura inmovilizada *a priori* no difieren en gran medida de los elaborados con levadura en forma libre, la utilización de estas levaduras osmotolerantes inmovilizadas añadiría, además, la ventaja de la retirada de la mayor parte de las levaduras una vez se haya alcanzado la concentración de etanol deseada (Martynenko y Gracheva, 2003). Se ha ensayado *Saccharomyces cerevisiae* encapsulada en alginato ya que permite una retirada fácil y completa de la levadura del vino, que resulta en una terminación drástica de la fermentación, como ventaja presenta el fácil manejo, pues las levaduras encapsuladas se pueden añadir al mosto en bolsas permeables con asas.

También se ha estudiado la producción de vinos dulces a altas temperaturas con una levadura termotolerante inmovilizada, *Kluyveromyces marxianus*. Se han examinado tres soportes para la inmovilización de la levadura termotolerante: celulosa deslignificada, manzana, y membrillo. Se seleccionaron los soportes de manzana y de membrillo, porque con éstos se consiguieron fermentaciones más cortas y mayor concentración de etanol. La calidad mejorada en el sabor de los vinos producidos puede ser debida a las bajas concentraciones alcanzadas de alcoholes superiores. El aroma afrutado fue predominante y el acetato del etilo tuvo valores similares a los presentados en otros vinos. Las pruebas sensoriales mostraron un sabor fino y un carácter especial de los vinos producidos (Kourkoutas *et al.*, 2004).

1.2.4.5. Para la fermentación maloláctica. Se ha inmovilizado distintas bacterias de la fermentación maloláctica, sobre todo *Oenococcus oeni*, con cierto éxito (Herrero *et al.*, 2001; Agouridis *et al.*, 2008). Hace tiempo se propuso inmovilizar células de *Lactobacillus casei* atrapadas en gel de poliacrilamida (Divies y Siess, 1976). Este proceso fue operativo durante un año sin pérdida de actividad. Sin embargo, se produjeron diversos problemas como contaminaciones, transferencia de malos sabores al vino, pérdida de actividad sobre prolongada operación y pérdida de células de los soportes sólidos. Por el contrario, se ha obtenido una buena estabilidad operacional con bolas de gel de pectato cálcico, bolas de quitosano modificado químicamente y microesferas de alginato cálcico con soporte protector de membrana de sílice (Kosseva *et al.*, 1998). Para una bodega, el simple método de adhesión sobre virutas de madera podría ser recomendada para adaptar el método a la práctica industrial.

1.2.4.6 Para controlar el pardeamiento de vinos blancos. Autores como Merida *et al.*, 2007 y López-Toledano *et al.*, 2007 utilizan levaduras inmovilizadas sobre geles (carragenato o alginato) para controlar el pardeamiento de los vinos blancos, tanto de los que ya han pardeado (acción correctora) como de los susceptibles de pardear a lo largo del tiempo (acción preventiva). Las levaduras inmovilizadas con geles de carragenato fueron las que tuvieron una mayor eficacia como agentes correctores del nivel de pardeamiento del vino. Se ha comprobado que las levaduras inmovilizadas en bolas de carragenato interactúan con compuestos fenólicos y retrasan el pardeamiento del vino.

1.3. INTRODUCCIÓN A PROTEÓMICA

La Proteómica es, junto a la Metabolómica, la Transcriptómica y la Genómica, una de las nuevas ciencias “-ómicas” que más interesan actualmente. Los distintos proyectos de secuenciación de genomas han generado una enorme cantidad de información que hoy día está disponible en diversas bases de datos. Dicha disponibilidad ha estimulado el estudio directo de los productos codificados por genes; es decir, de las proteínas. La proteómica se ocupa del conjunto de técnicas o tecnologías dirigidas a la obtención de información de la función de todas las proteínas. La Proteómica es la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes (Honoré *et al.*, 2004).

El desarrollo de las técnicas de análisis e identificación ha permitido el nacimiento y avance de las disciplinas “-ómicas”; es decir, la separación, identificación, cuantificación y caracterización de proteínas a gran escala, debido a potentes herramientas bioinformáticas que usan la información disponible en las bases de datos de secuencias de genes, transcritos y proteínas para poder definir niveles de proteínas a nivel celular, investigar complejos de proteínas así como elucidar funciones, rutas metabólicas e interrelaciones.

Aunque es cierto que un gen codifica una secuencia de aminoácidos, existen dos procesos que incrementan considerablemente el número de proteínas que pueden ser originadas por un gen y estar presentes en una célula en un momento dado, y por tanto, hace más complejo el proteoma de una célula. Tales sucesos son el “empalme alternativo” (*splicing*), consistente en que los exones pueden reordenarse de varias formas para dar lugar a más de una proteína a partir de un sólo gen, y el proceso conocido como “modificación post traduccional” (*post-translational modification, PTM*), en el que una proteína puede ser modificada durante o después de la traducción. Mientras que el genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de la vida, el proteoma celular es el resultado de un proceso dinámico y variable. La expresión de proteínas cambia según las diferentes etapas del ciclo celular, las condiciones intra y extracelulares, el estrés, la temperatura y las condiciones de crecimiento en un momento determinado. Además de la degradación o eliminación de proteínas (ubiquitinación) (Massoni *et al.*, 2009). De modo que, la complejidad de un proteoma se debe principalmente a dos factores: el nivel de expresión de las proteínas, variable en un sistema biológico (Schiess *et al.*, 2009) y la heterogeneidad de las proteínas, según las modificaciones post-traduccionales que tenga lugar un determinado producto génico.

La Proteómica definida como la ciencia que se ocupa del estudio de la expresión de las proteínas y de sus cambios en un contexto biológico (fracción subcelular, célula, tejido, órgano, organismo), comprende tanto las tecnologías para el estudio a gran escala de las proteínas expresadas a partir de un genoma en unas condiciones determinadas presentes en una unidad biológica en un tiempo y condiciones determinadas (proteoma) como las aplicaciones de estas técnicas al análisis de sistemas biológicos.

El término proteoma (*proteome*) fue propuesto por Marc Wilkins en 1994 para definir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma: **PROTEIn complement of a genOME** (Wilkins *et al.*, 1995). El proteoma de una célula es pues la expresión de su fenotipo característico en un momento y condiciones determinados, y las

diferencias entre un mismo tipo celular en diferentes situaciones se pueden asignar a los cambios espacio-temporales que tienen lugar en la expresión y funcionalidad de sus proteínas a lo largo de su ciclo de vida.

El reto principal de la Proteómica es la automatización y la integración de las principales técnicas en desarrollo como: tecnología reproducible de electroforesis bidimensional (Görg *et al.*, 2004); cromatografía multidimensional (Washburn *et al.*, 2002); tecnología de tinción y análisis de los geles; tecnología para la identificación de péptidos y proteínas con espectrometría de masas (Steen y Mann, 2004), herramientas bioinformáticas para el manejo de bases de datos de genomas y de proteínas (Apweiler *et al.*, 2004); y, también, algoritmos de búsqueda y de recuperación de datos.

Los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica son la dificultad que supone relacionar las características biológicas de un sistema con la expresión de las proteínas, y más concretamente, relacionar los cambios en las propiedades biológicas con los cambios en la expresión de proteínas. Para ello, es necesario disponer de técnicas que permitan:

- a) separar miles de proteínas;
- b) identificar las proteínas de interés y
- c) cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de proteínas.

La Proteómica aborda este complejo problema técnico con diversas herramientas o tecnologías dando lugar a la existencia de la siguiente clasificación de proteómica según las técnicas de separación usadas y el momento en que tenga lugar la digestión de las proteínas. Estas técnicas se agrupan en dos grandes campos:

a) Proteómica de primera generación, basada en geles, primero las proteínas se separan por electroforesis, fundamentalmente bidimensional y después se digieren, la identificación es mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS).

b) Proteómica de segunda generación, libre de geles, primero las proteínas se digieren y después los péptidos se separan por cromatografía líquida, la identificación es mediante espectrometría de masas (ESI-MS/MS).

De forma general, en función de los objetivos específicos que se pretendan alcanzar, la Proteómica se puede dividir en cuatro grandes áreas, según diversos autores:

1) Proteómica descriptiva. Corresponde al análisis a gran escala de la expresión de todas las proteínas de un proteoma, a la construcción de mapas bidimensionales, a la identificación a gran escala de estas proteínas tras su separación mediante el análisis por espectrometría de masas y a la posterior identificación mediante la búsqueda en bases de datos de proteínas.

2) Proteómica de expresión diferencial o comparativa. Establece las diferencias en el perfil proteico entre dos diferentes estados fisiológicos de un mismo tipo celular seguido de la identificación de las proteínas que presentan cambios cualitativos y/o cuantitativos en el que es frecuente utilizar la electroforesis bidimensional.

3) Proteómica de las modificaciones post-traduccionales (PTMs). Se trata de, una vez detectadas las posibles variaciones de las proteínas, caracterizarlas mediante el

análisis de modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, ubiquitinaciones, entre otras.

4) Proteómica funcional. Se centra principalmente en las interacciones proteína-proteína, proteína-DNA o proteína-otras moléculas (Figeys, D. 2003).

La naturaleza de los estudios proteómicos dependerá en gran medida de la tecnología empleada tanto en la separación de proteínas (2-DE o cromatografía) como en la identificación de las mismas que, a su vez, dependen del sistema de generación de iones utilizado (MALDI o ESI) y del tipo de análisis de masas empleado (TOF o trampa iónica).

La aproximación más utilizada en proteómica de levaduras es la separación por electroforesis bidimensional y análisis mediante espectrometría de masas. La cromatografía líquida bidimensional, como técnica alternativa de separación, está emergiendo cada vez con más fuerza (Nagele *et al.*, 2004) para solventar problemas relacionados con la resolución de proteínas minoritarias, hidrofóbicas o de puntos isoeléctricos extremos, aunque también presenta sus limitaciones respecto a la separación electroforética bidimensional, ya que se pierde la información sobre el tamaño molecular y el punto isoeléctrico, ambos parámetros son muy útiles para la identificar proteínas y caracterizar isoformas proteicas o *PTMs*.

En la **Tabla 1.1** se muestran los aspectos esenciales de un estudio proteómico que se basa en una serie de técnicas y herramientas para la extracción y separación de las proteínas por 2-DE seguido de la identificación de las proteínas de interés.

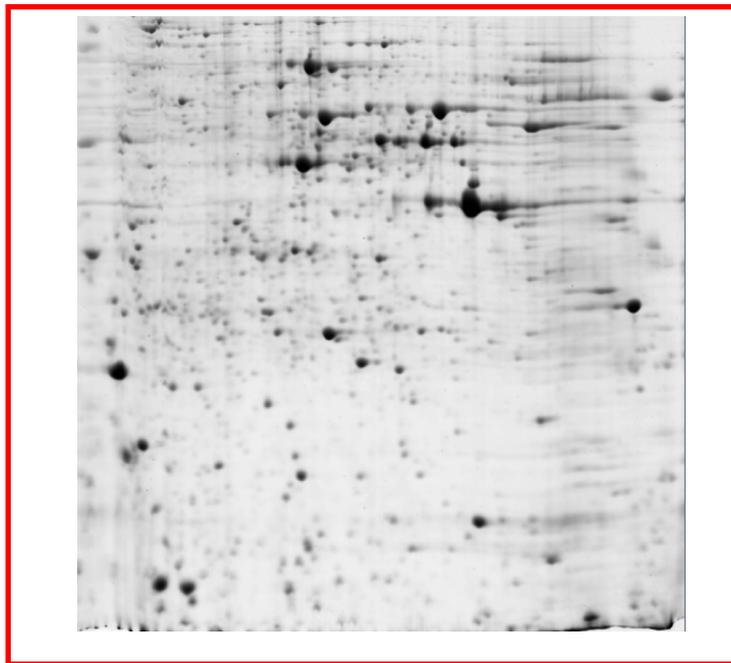
Tabla 1.1. Etapas en el análisis de la expresión de proteínas por 2DE e identificación de las proteínas por espectrometría de masas

ACCIONES	OBJETIVOS
1. Preparación de la muestra	Eliminar los componentes no proteicos y obtener las sub-fracciones celulares si es necesario
2. Extracción de proteínas	Obtener el mayor número y la mayor cantidad de proteínas posibles
3. Separación de proteínas por punto isoeléctrico. Primera dimensión.	Separar en tiras de geles de gradiente de inmobilinas (anfolitos-biolitos) (<i>IPG</i>). La focalización de las proteínas transcurre durante un período de tiempo prolongado a alto voltaje
4. Separación de proteínas por peso molecular. Segunda dimensión.	Separar perpendicularmente a la dirección de migración en un segundo gel de <i>SDS-PAGE</i>
5. Tinción de los geles	Teñir con colorante (Azul de Coomassie)
6. Adquirir las imágenes de los geles bidimensionales	Capturar las manchas de proteínas mediante un escáner
7. Análisis de las imágenes de los geles	Identificar los cambios en la expresión de proteínas entre dos condiciones experimentales diferentes comparando varias réplicas de cada condición.
8. Selección de proteínas de interés	Elegir las proteínas cuyo cambio (cuantitativo y/o cualitativo) sea significativo y reproducible en un grupo de experimentos idénticos
9. Recorte o “picado” de secciones de gel con las proteínas seleccionadas	Cortar pequeños cilindros de gel que contienen las proteínas que se desean identificar
10. Incubación y digestión con una proteasa específica (tripsina) los trozos de gel con las proteínas	Incubar las secciones de geles con tripsina durante 3-20 horas para así poder obtener la mezcla de los péptidos trípticos (La tripsina corta enlaces peptídicos por el extremo Carboxilo de lisina (K) y de arginina (R))
11. Análisis de las mezclas de péptidos por espectrometría de masas	Obtener las masas moleculares de los péptidos resultantes y las secuencias parciales o completas de los péptidos
12. Identificación por comparación con las bases de datos de proteínas	Comparar los valores de masas con bases de datos de las digestiones virtuales del proteoma teórico del organismo estudiado si el genoma es conocido, en caso contrario se comparan con genomas conocidos de especies cercanas

A continuación, se expone una descripción de dos de las técnicas más ampliamente empleadas en estudios proteómicos.

1.3.1. Electroforesis bidimensional (2-DE)

La electroforesis es un método analítico-semipreparativo en el que se separan biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico. Esta técnica fue empleada por primera vez por Tiselius en el año 1937. Smithies y Poulick, en 1956, describieron el primer gel en dos dimensiones. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (*PAGE*), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein.



La popularidad de este método creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (*SDS*) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y *SDS* en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó “electroforesis en geles de poliacrilamida con *SDS*” (*SDS-PAGE*). En 1975, Patrick O’Farell en Estados Unidos, y Joachim Klose en Berlín, establecieron, simultáneamente por primera vez, los fundamentos básicos de la Proteómica con los geles de **electroforesis bidimensional**, técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas de proteínas altamente complejas que se utiliza hoy en día. Estos geles permiten obtener un despliegue físico de mezclas complejas de proteínas en dos dimensiones (**Figura 1.13**). Se basan en la sucesión de dos electroforesis distintas realizadas en una misma muestra: 1) la separación por carga eléctrica (isoelectroenfoque, IEF), en la que las proteínas migran en tiras con gradiente de pH inmovilizado (*IPG strips*) hasta alcanzar su punto isoeléctrico, valor de pH al cual la

carga neta de la proteína es cero, y 2) la separación por tamaño molecular que se efectúa en un gel de poliacrilamida en presencia de un detergente aniónico muy potente, el dodecil sulfato de sodio (*SDS-PAGE*).

La electroforesis bidimensional es hasta el presente, la única técnica que permite resolver con alta eficiencia las isoformas proteicas que difieren en punto isoeléctrico y peso molecular, por ello, se sigue utilizando ampliamente.

La electroforesis bidimensional presenta algunos inconvenientes o limitaciones que se van corrigiendo con los años de investigación, pero los más destacables actualmente son:

- Técnica muy laboriosa. Requiere mucho tiempo y reactivos. No se puede automatizar
- Análisis de una única muestra por gel bidimensional
- Las proteínas muy grandes (no entran en el gel durante la primera dimensión) y las hidrofóbicas (son proteínas de membrana que precipitan durante el IEF por su baja solubilidad no pasan a la segunda dimensión) están limitadas
- Las proteínas muy ácidas ($pI_s < pH3$) o muy básicas ($pI_s > pH 10$) no se resuelven muy bien
- Técnica poco resolutive para proteínas poco abundantes
- El análisis y la cuantificación son labores lentas y bastante tediosas
- Algunos artefactos como las carbamylaciones pueden confundirse con modificaciones-postraduccionales

Entre las ventajas destacar las siguientes:

- ✓ Alto poder de resolución: visualización de hasta miles de formas proteicas en un sólo gel bidimensional
- ✓ Permite la cuantificación, aunque es un proceso lento y manual
- ✓ Permite establecer diferencias cualitativas en base a la presencia/ausencia de manchas proteica en la condición problema respecto a la condición control
- ✓ Identifica las proteínas de manera fácil a partir de sus huellas peptídicas, siempre que se dispongan de bases de datos para el organismo
- ✓ Detecta las modificaciones postraduccionales
- ✓ Permite la separación de proteínas entre 10-300 kDa

Por ello, generalmente los proteomas estudiados por 2DE están sesgados hacia las moléculas más hidrofílicas, mientras que las proteínas hidrofóbicas se analizan preferentemente mediante combinaciones de técnicas de cromatografía y de *SDS-PAGE* en una sola dimensión o mediante su previa conversión a mezclas de péptidos.

Tras la separación de las proteínas es necesario visualizar las proteínas en los geles. Para ello se utilizan métodos de tinción de geles visibles (tinción con nitrato de plata, azul de Coomassie (Mathesius *et al.*, 2001), fluorescentes (SYPRO) o radiactivos. Las proteínas se visualizan como numerosas manchas circulares (*spots*), cada una de las cuales corresponde a una proteína. Una vez reconocidas y estudiadas todas las manchas en los geles son recortadas o “picadas” directamente del gel y digeridas enzimáticamente para producir un conjunto de péptidos fragmentados. Estos se identifican por

espectrometría de masas, tipo MALDI-TOF muy útil para la obtención de la “huella peptídica” (*peptide mass fingerprinting, PMF*) o secuenciación de *nov* mediante búsqueda en bases de datos de proteínas a partir de ADN genómico utilizando motores de búsqueda (MASCOT, SEQUEST) (Agrawal y Rakwal, 2006).

1.3.2. Espectrometría de masas (MS)

La **Espectrometría de Masas** es una tecnología analítica muy importante en la Proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas. La espectrometría de masas permite la identificación y la cuantificación de proteínas a través de la interpretación de los espectros de fragmentos de péptidos generados previa digestión enzimática de las proteínas objeto de estudio. En un espectrómetro de masas se mide la relación de los iones en fase gaseosa, puesto que son más fáciles de manipular y detectar que las moléculas neutras.

Un espectrómetro de masas consta, generalmente, de tres componentes:

a) una fuente de iones que genera e introduce los iones analitos dentro del aparato en fase gaseosa (ionizador). Para ello, se utilizan habitualmente dos tipos de técnicas de ionización suave, que han permitido el análisis de macromoléculas biológicas:

-Ionización ESI (*Electrospray Ionisation*): Ionización por electronebulización, en el que se introduce el ión analito disuelto en un solvente más volátil por un capilar metálico cargado. Debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido se sale del capilar y forma un aerosol, el solvente se evapora y los iones se dirigen hacia el analizador de masa (Fenn *et al.*, 1989).

-Ionización MALDI (*Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*): Ionización por desorción mediante láser asistida por matriz. Permite el análisis de macromoléculas que tienden a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales (Karas y Hillenkamp, 1988). La macromolécula es primero implantada en una matriz sólida de un material orgánico, usándose principalmente α -ciano-4-hidroxicinámico para analizar péptidos, y después es irradiada con un láser pulsado. La energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados de forma discreta, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y produce iones con carga protonada (+1).

b) un analizador de masas de tiempo de vuelo (*Time-Of-Flight, TOF*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga (m/z) tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF, y por último

c) un detector de iones, que determina el número de iones separados para cada valor de m/z produciendo una señal (Newton *et al.*, 2004).

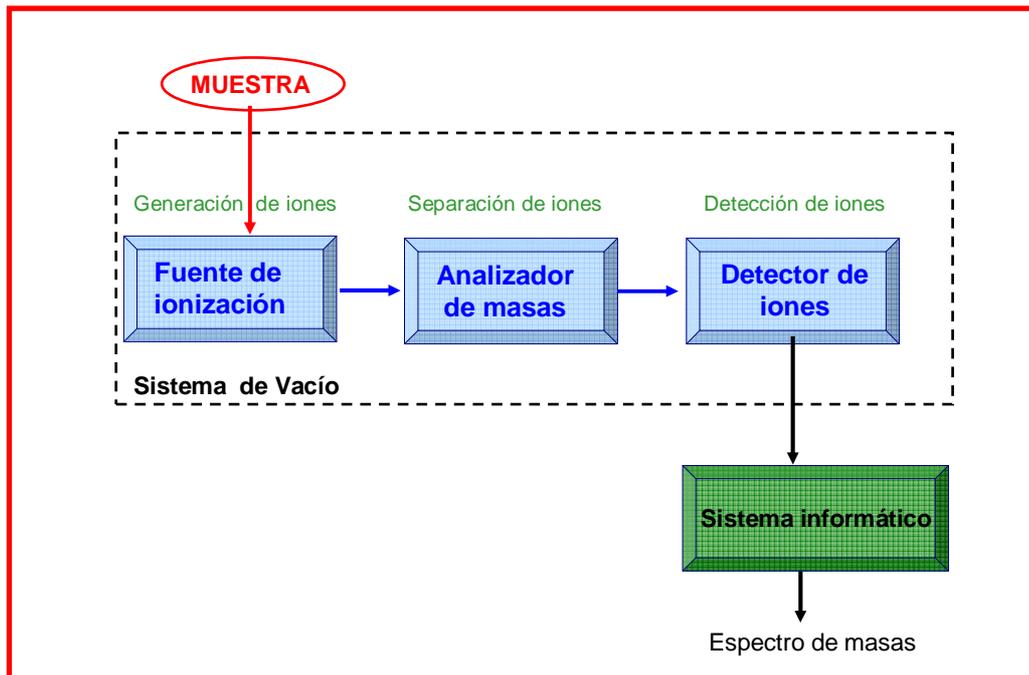


Figura 1.14. Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. Existen tres componentes esenciales: La fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los anteriores en el caso de los espectrómetros híbridos) y el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas en un sistema informático, externo al espectrómetro de masas, que genera unos gráficos denominados “huellas peptídicas” o “espectros de masas”.

En la **Figura 1.14** se muestra de forma muy simplificada los componentes principales de un espectrómetro de masas.

Existen distintos tipos de fuentes de ionización y analizadores. Los diferentes espectrómetros disponibles son el resultado de la combinación de estos dos elementos. Las combinaciones de esta técnica que más se utilizan en Proteómica son las siguientes: MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry*).

El conjunto de masas moleculares determinadas por esta técnica de espectrometría de masas corresponde a las denominadas “espectros de masas”. Son representaciones de la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación masa/carga, obtenidos tras la digestión enzimática de una proteína, generalmente la tripsina, proteasa cuyo corte es altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina, que permite identificar la proteína mediante comparación de los valores de masa peptídica medidos (reales) con los valores calculados *in silico* (teóricos) en la digestión virtual de todas la proteínas en las bases de datos (Clauser *et al.*, 1999).

En la **Figura 1.15** se presenta de forma esquemática los pasos generales para realizar un estudio proteómico mediante electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masa.

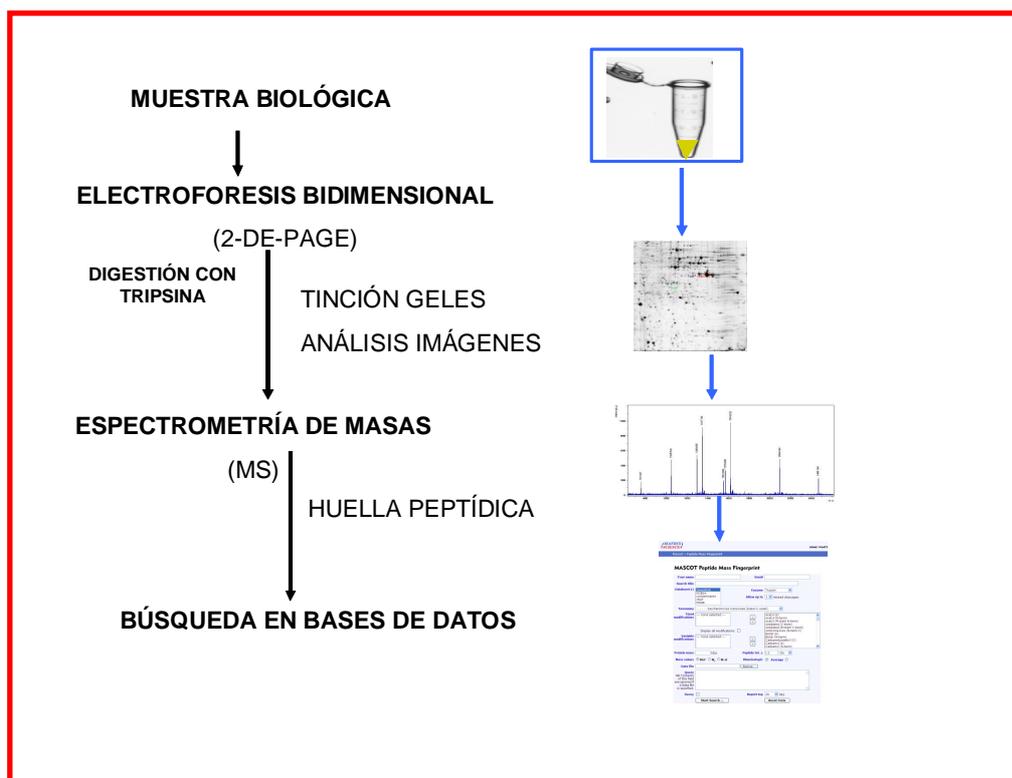


Figura 1.15. Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Visión general de un enfoque clásico en un estudio proteómico en levaduras. Un extracto de proteínas es sometido a electroforesis bidimensional (2-DE). Una vez las proteínas de interés han sido identificadas, son cortadas en los geles y se digieren con tripsina. Los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas (MS).

La identificación de las proteínas por espectrometría de masas (*mass spectrometry*, *MS*) se basa en la producción de iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, la clasificación de los mismos en función de su relación masa/carga (m/z) y la cuantificación de su intensidad. Con esta información se puede determinar el peso molecular (Kwon *et al.*, 2006) y la abundancia de los componentes de una mezcla y así tener una idea de su estructura química.

La espectrometría de masas proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y carga de proteínas en una muestra. Las medidas de masas de las proteínas intactas pueden proporcionar información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque para identificar una proteína no es correcto basarse únicamente en su relación m/z , ya que existen múltiples factores (*PMTs*) que pueden variar la masa molecular real de una proteína respecto a la masa teórica de los datos.

En los casos en los que las proteínas no han podido ser caracterizadas por MALDI-TOF, se recurre a la espectrometría de masas en tándem (*MS/MS*) en la que se obtiene más información de lo que es la m/z , por ejemplo, la estructura o secuencia de aminoácidos que constituyen el péptido. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos energéticos que lo fragmentan. El análisis de los iones fragmentados proporciona información estructural del

ión precursor. El patrón de fragmentación de un péptido analizado por MS/MS depende del tipo de rotura que sufre el ión precursor.

Además este patrón es característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, de forma que la secuencia puede deducirse del análisis del correspondiente espectro MS/MS. En teoría a partir de un espectro de fragmentación se podría determinar de forma manual la secuencia lineal de dicho péptido (secuenciación “de novo”) o al menos de una parte de la secuencia. Para ello sólo se tendrá que calcular las pérdidas de masa molecular entre dos iones consecutivos de cada serie, este valor debe coincidir con la masa molecular del residuo de aminoácido al que pertenece.

Sin embargo, el valor de la masa de los residuos de aminoácidos se puede modificar debido a las modificaciones postraduccionales, por lo que resulta bastante difícil interpretar las señales de fragmentación. También puede ocurrir que no todos los enlaces se fragmenten con la misma eficacia, por lo que puede faltar alguna señal de fragmentación de alguna de las series. Además, los sistemas de alto rendimiento que utilizan instrumentos capaces de generar miles de espectros por minuto hacen inviable la interpretación manual.

Para resolver estos problemas se han desarrollado diferentes programas informáticos capaces de secuenciar “de novo” a partir de espectros de fragmentación. Después se realiza una búsqueda por homología de secuencia en las bases de datos existentes para finalmente identificar a la proteína. Si la proteína en estudio pertenece a una especie no secuenciada, o de la que no se tienen datos de su genoma, se realiza una búsqueda por homología en otras especies o familias cercanas.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, G.K. Rakwal, R. 2006. Rice proteomics: a cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrometry Reviews* 25:1-53.

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H. 2004. Protein sequence databases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:76-80.

Bardi, E.P., Bakoyianis, A., koutinas, A., kanellaki, M. 1996. Room temperature and low temperature wine making using yeast immobilized on gluten pellets. *Process Biochem.* 31:425-430.

Bellincontro, A., De Santis, D., Botondi, R., Villa, I., Mencarelli, F. 2004. Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. *Journal of Food Science and Agriculture*, 84:1791-1800.

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*, 122:312-320.

Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (2011). BOJA, 23 diciembre 2011, N° 249:114-199.

Capaldi, A.P., Kaplan, T., Liu, Y., Habib, N., Regev, A., Friedman, N., O'Shea, E.K. 2008. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nature Genetics*, 40:1300-1306.

Caridi, A., Crucitti, P., Ramondino, D. 1999. Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 21:617-620.

Clauser, K.R., Baker, P.R., Burlingame, A.L. 1999. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical Chemistry*, 71:(14) 2871-2882.

Erasmus, D.J., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J.J. 2003. Genome-wide analyses, metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3:375-399.

Espejo, F., Armada, S. 2010. Effect of enzyme addition in the making of Pedro Ximénez sweet wines using dynamic pre-fermentative maceration. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31:133-141.

Figeys, D. 2003. Novel approaches to map protein interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:119-125.

Flanzy, C. 2000. Metabolismo anaerobio de la uva. In: Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Coordinator: Flanzy, C. Ed. AMV-Mundi Prensa, Madrid, Spain.

Fleet, G.H. 1998. Yeasts-what reactions and interactions really occur in natural habitats. *Food Technology and Biotechnology*, 36:285-289.

Fleet, G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86:11-22.

Fleet, G.H. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8:979-995.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 (4926): 64-71.

Franco, M., Peinado, R.A., Medina, M., Moreno, J. 2004. Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:3905-3910.

García-Martínez, T., Maestre, O., Peinado, R., Moreno, J., Mauricio, J.C. 2007. Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares. In Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Editorial Junta de Extremadura pp. 102-104.

García-Martínez, T., Peinado, R.A., Maestre, O., Moreno, J. and Mauricio, J.C. 2008. Fermentación de mostos con elevado contenido en azúcares mediante bioinmovilización de levaduras. *Bulletin de l'OIV*, 81:559-568.

- Giavalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Klöppel, K.D., Lehrach, H., Klose, J. y Gobom, J. 2005. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomic* 5: 1902-1913.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4:3665-3685.
- Guidi, F., Magherini, F., Gamberi, T., Borro, M., Simmaco, M., Modesti, A. 2010. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1516-1525.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:300-372.
- Hohmann, S., Mager, W.H. 2003. Yeast stress responses. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, (Germany).
- Honoré, B., Østergaard, M., Vorum, H. 2004. Functional genomics studied by proteomics. *BioEssays*, 26:901-915.
- Jiménez-Martí, E., Gomar-Alba, M., Palacios, A., Ortiz-Julien, A., del Olmo, M. (2011a) Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:1551–1561.
- Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Gomar-Alba, M., Gutiérrez, D., Gil, C., del Olmo, M. 2011b. Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 211-220
- Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Ridaura, I., Lozano, N., del Olmo M. 2009. Genetic manipulation of HSP26 and YHR087W stress genes may improve fermentative behaviour in wine yeasts under vinification conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 130:122-130.
- Junta de Andalucía. 2011.
- Kandyliis, P., Goula, A., Koutinas, A.A. 2008. Corn Starch Gel for Yeast Cell Entrapment. A view for Catalysis of Wine Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 12037-12045.
- Karas, M., Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60 (20): 2299-301.
- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 211-234.
- Kwon, S.J., Choi, E.Y., Choi, Y.J., Ahn, J.H., Park, O.K. 2006. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *Journal of experimental botany*, 57(7): 1547-1551.

López-Alejandre, M.M. 2000. *Los vinos de Montilla–Moriles*, ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla (Spain).

López, P.A., Moreno, J., and Medina, M. 1988. Caracterización del envero y madurez en la uva de *Vitis Vinifera* Pedro Ximénez cultivada en la zona Montilla–Moriles. *Revista Agroquímica y Tecnología Alimentos*, 28:274-284.

López de Lerma, N., Bellincontro, A., Mencarelli, F., Moreno, J., Peinado, R.A. 2012. Use of electronic nose, validated by GC-MS, to establish the optimum off-vine dehydration time of wine grapes. *Food Chemistry*, 130:447-452.

López de Lerma, N., Peinado, R.A. 2011. Use of two osmoethanol tolerant yeast strain to ferment must from Tempranillo dried grapes. Effect on wine composition. *International Journal of Food Microbiology*, 145:342-348.

Malacrinò, P., Tosi, E., Caramia, G., Prisco, R., and Zapparoli, G. 2005. The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. *Letters of Applied Microbiology*, 40:466-472.

Martynenko N.N., Gracheva I.M. 2003. Physiological and biochemical characteristics of immobilized champagne yeasts and their participation in champagnizing processes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39: 439-445(7).

Massoni, A., Moes, S., Perrot, M., Jenoe, P., Boucherie, H. 2009. Exploring the dynamics of the yeast proteome by means of 2-DE. *Proteomics*, 9, 4674-4685.

Mathesius, U., Keijzers, S., Natera, H.A., Weinman, J.J., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago trunculata* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 1:1424-1440.

Moreno, J., Peinado, J., Peinado, R.A. 2007. Antioxidant activity of musts from Pedro Ximénez grapes subjected to off-vine grape drying process. *Food Chemistry*, 104:224-228.

Moreno, J., Peinado, R. 2010. “Equilibrios ácido-base en el vino”. In: Química Enológica, ed. AMV & Mundi-Prensa. Madrid, 237-270.

Nadal, E., Posas, F. 2008. “Regulation of gene expression in response to osmostress by the yeast stress-activated protein kinase Hog1”. In Stress-Activated Protein Kinases, ed. F. Posas, A.R. Nebreda, Berlin Heidelberg, (Germany), Springer-Verlag.

Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P. y Vad, C. 2004. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Review Proteomics*, 1: 37-46.

Newton, R.P., Brenton, A.G., Smith, C.J. y Dudley, E. 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65: 1449-1485.

- O'Farrell, P H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*, 250, 4007-4021
- Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sanchez, B., Aguilar-Uscanga, M.G. 2010. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85:1361-1367.
- Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *African Journal of Biotechnology*, 4:660-662.
- Peinado, J., López de Lerma, N., Moreno, J. Peinado, R. 2009. Antioxidant activity of different phenolics fraction isolated in must from Pedro Ximénez grapes at different stages of the off-vine drying process. *Food Chemistry*, 114:1050-1055.
- Peinado, R.A., Moreno, J.J., Maestre, O. Mauricio, J.C. 2005. Use of a novel immobilization yeast system for winemaking. *Biotechnology Letter* 27, 1421-1424.
- Pham, T.K., Wright, P.C. 2008. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. *Journal of Proteome Research*, 7:4766-4774.
- Pigeau, G.M., Inglis, D.L. 2007. Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103:1576-1586.
- Salmon, J. M., Mauricio, J.C. 1994. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*, 16:89-94.
- Serratos, M.P., Lopez-Toledano, A., Merida, J., Medina, M. 2008. Changes in color and phenolic compounds during the raisining of grape cv. Pedro Ximenez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2810-2816.
- Schiess, R., Wollscheid, B., Aebersold, R. 2009. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular Oncology*, 3: 33-44.
- Steen, H., Mann, M. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 699-711.
- Tofalo, R., Chaves-Lopez, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A., and Suzzi, G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130:179-187.
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., and Cocolin, L. 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8: 1053-1062.

Valencia, F. 1990. *Monografía sobre los vinos de Málaga*, ed. Larios, S.A. Málaga (Spain).

Valero, A., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchís, V. 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology*, 41:196–201.

Washburn, M.P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schieltz, D.M., Yates, J.R. 2002. Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *III Analytical Chemistry*, 74: 1650-1657.

Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology Genetic Engineering Reviews*, 13:19-50.

Zuzuarregui, A., Carrasco, P., Palacios, A., Julián, A., del Olmo, M. 2005. Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. *Journal of Applied Microbiology*, 98:299–307

Zuzuarregui, A., del Olmo, M. 2004. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85:271-280.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., del Olmo, M. 2006. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 836-847.



Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los vinos dulces son complicados de elaborar técnicamente, puesto que proceden de mostos con elevada concentración de azúcares (alrededor de 400 g/ L). Éstos pueden sufrir paradas prematuras de fermentación o fermentaciones lentas, con lo que se favorece el desarrollo de microorganismos indeseables, que aumentan la acidez volátil y originan vinos de baja calidad. Por esta razón, los vinos dulces en Andalucía se han elaborado, tradicionalmente, alcoholizando directamente los mostos de uva, que han sido previamente pasificadas por exposición directa al sol, sin tener lugar la fermentación, por tanto, carecen de las aportaciones aromáticas propias de fermentación. El presente estudio nace de la necesidad de solventar en la medida de lo posible los problemas que se pueden presentar durante la fermentación en este tipo de mostos.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos durante la introducción de esta memoria, el presente trabajo plantea como hipótesis de investigación “**la elaboración de vinos dulces procedentes de mostos de uva pasificada con fermentación parcial mediante la aplicación de levaduras osmotolerantes libres y coimmobilizadas**”. Los resultados de este trabajo son parte de los obtenidos en dos proyectos de investigación finalizados y continuación de un proyecto actual:

Título: Estudio de la inmovilización celular de levaduras sobre hongos filamentosos GRAS sin soportes externos. Aplicaciones en fermentaciones vínicas y efecto sobre la calidad de los vinos. AGL2005-01232-ALI. Entidad Financiera: Ministerio de Educación y Ciencia y FEDER. Duración: Desde 1 Enero 2006 hasta 31 Diciembre 2008.

Título: Optimización de biocápsulas de levaduras para la elaboración de vinos tranquilos y cava. Estudio de las posibles desviaciones del metabolismo de las levaduras inmovilizadas. RTA2008-00056-CO2-02. Entidad Financiera: Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER. Duración: Desde 21 Julio 2008 hasta 21 Julio 2011.

Título: Mejora de la formación de biocápsulas con levaduras auto-inmovilizadas para la elaboración de cava. Estudio proteómico y metabólico. RTA2011-00020-C02-02. Entidad Financiera: Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) (actual Ministerio de Economía y Competitividad) y FEDER. Duración: Desde 07 Diciembre 2011 hasta 06 Diciembre 2014.

La originalidad del sistema de inmovilización desarrollado por nuestro grupo de investigación consiste en inducir una co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentosos GRAS (*Generally Recognized As Safe*), *Penicillium chrysogenum* H3, aislado del ambiente, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* G1 (ATCC: MYA-2451), en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos, creando artificialmente las condiciones adecuadas para favorecer una simbiosis. Ésta se consigue por la adición al medio de cultivo de un nutriente no utilizable por la levadura (ácido glucónico), pero sí por el hongo filamentosos en un medio tamponado y agitado. Este nuevo sistema de bioinmovilización ha sido patentado por la Universidad de

Córdoba: “WO2004/029240-A1. *Method of obtaining yeast biocapsules, biocapsules thus obtained and applications of same. Procedimiento de obtención de biocápsulas de levaduras, biocápsulas así obtenidas y sus aplicaciones*”.

La hipótesis propuesta tiene como objetivo general **elaborar vinos dulces a partir de biocápsulas de levadura**, cuyos objetivos específicos se encuadran en los tres capítulos siguientes:

Capítulo I: Optimización y caracterización de biocápsulas de levaduras

Los objetivos específicos son los que se presentan a continuación:

- 1º) Optimizar la coinmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium chrysogenum*.
- 2º) Estudiar la estructura de las biocápsulas de levadura por microscopía.
- 3º) Comparar el perfil proteómico de las células inmovilizadas con las células de levadura libres en medio de formación de biocápsulas.

Los objetivos específicos 1º y 2º se han conseguido, y quedan reflejados en la publicación del siguiente artículo científico: “Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast”. Doi 10.1002/jctb.2593 (Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 86:812-817, 2011).

El tercer objetivo específico se ha desarrollado al final de este Capítulo I.

Capítulo II: Aislamiento y caracterización de levaduras osmotolerantes y coinmovilización con *Penicillium chrysogenum*

Los objetivos específicos de este capítulo son los siguientes:

- 4º) Aislar, caracterizar y seleccionar levaduras osmoetanol tolerantes de mostos de uva con alta concentración en azúcares.
- 5º) Coinmovilizar diferentes cepas de levadura de *Saccharomyces* con *Penicillium chrysogenum* para su uso en fermentación alcohólica.
- 6º) Estudiar la reutilización de biocápsulas en fermentación alcohólica.

El objetivo específico 4º se ha logrado, y queda recogido en la aportación científica al IX Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL2007; ISBN: 978-84-690-6060-5. pp. 102-104). Título: “Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares”.

Los objetivos específicos 5º y 6º se han abordado en la publicación del artículo científico titulado: “Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production”. Doi 10.1002/jctb.2725 (Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87:351-359, 2012).

Capítulo III: Aplicación de levaduras seleccionadas osmotolerantes libres y coinmovilizadas para la producción de vinos dulces

Los objetivos específicos del último capítulo son los que se muestran a continuación:

- 7º) Aplicar levaduras libres seleccionadas osmotolerantes para la producción de vino dulce Pedro Ximénez parcialmente fermentado.
- 8º) Discriminar vinos dulces parcialmente fermentados con dos levaduras osmoetanol tolerantes por cromatografía de gases y nariz electrónica.
- 9º) Aplicar biocápsulas de levaduras seleccionadas osmotolerantes para la producción de vino dulce Pedro Ximénez parcialmente fermentado.

Los objetivos específicos 7º y 8º quedan recogidos en la publicación del artículo titulado: “Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose”. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.130 (Food Chemistry, 127:1391-1396, 2011).

El objetivo específico 9º se consigue con los resultados expuestos en un trabajo que ha sido enviado a Food Chemistry titulado: “Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes”. Actualmente, está en fase de revisión.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permiten confirmar la hipótesis como verdadera, así pues se podría vinificar mostos de uva pasificada con fermentación parcial mediante la aplicación de biocápsulas de levadura para la elaboración de vinos dulces naturales. Este sistema de coinmovilización conlleva una serie de ventajas como son, entre otras, la facilidad de retirar las biocápsulas en el momento deseado, la posibilidad de reutilizar las biocápsulas, agilizar el proceso, reducir costes, y también la posibilidad de utilizarse en procesos continuos de fermentación. Así, este sistema de coinmovilización podría suponer un avance tecnológico en procesos fermentativos.



Metodología

3. METODOLOGÍA

En este Bloque se procede a enumerar y describir los microorganismos empleados, los medios de cultivo y los métodos analíticos utilizados en los trabajos experimentales de esta Memoria, además de los reactivos, muestras analizadas, condiciones de crecimiento, la instrumentación empleada, los aparatos y otros materiales.

3.1. MICROORGANISMOS

3.1.1. Levaduras

Las levaduras empleadas en la presente Tesis Doctoral corresponden a cepas vínicas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*, excepto Uvaferm BC, que es una cepa de *Saccharomyces bayanus*.

Las cepas X2, X3, X4, X5, X6 y X9 fueron aisladas de mostos en fermentación de uvas pasificadas Pedro Ximénez en la DOP Montilla-Moriles (Córdoba). Se han seleccionado por sus características osmotolerantes y por su producción de etanol. Todas estas levaduras son cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con una similitud de 591/592 (99%) en la secuencia AY048154.1 (26S rRNA) según la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Dentro de este grupo, se han usado las cepas X4 (CECT13014) y X5 (CECT13015) para la coimovilización por poseer las mejores características de osmoetanol tolerancia y sensoriales.

La cepa E1 (ATCC: MYA-425) fue aislada de un mosto en fermentación y las cepas F12 y G1 (ATCC: MYA-2451) fueron aisladas de un velo de flor de la misma zona vitivinícola que las anteriores. Todas estas cepas de levaduras pertenecen a nuestra colección, y han sido seleccionadas por su tolerancia al etanol, identificadas y caracterizadas por Guijo *et al.*, 1986; Mauricio *et al.*, 1986; Aguilera *et al.*, 2006.

La cepa P29 (CECT11770) fue aislada de un cava procedente de la DO Penedès (Barcelona, España) y facilitada por el Instituto Catalán de la viña y el vino (INCAVI).

La cepa QA23 fue aislada y seleccionada por la Universidad de Trás-os-Montes e Atlo Douro (UTAD-Portugal) y comercializada por la empresa Lallemand (Canadá) para su uso industrial en la producción de vinos.

La cepa de *Saccharomyces bayanus*, Uvaferm BC, fue seleccionada para vinificación y facilitada por Lallemand (Canadá), presenta alta tolerancia al etanol por lo que se utiliza para reiniciar fermentaciones enlentecidas y para la segunda fermentación en la producción de vinos espumosos.

De todas las levaduras empleadas, las que se han inmovilizado son las cepas de *S. cerevisiae* G1, X4, X5, P29, QA23 y Uvaferm BC de *S. bayanus*.

3.1.2. Hongos

En este estudio se han aislado distintas cepas de hongos filamentosos del ambiente y de mostos de uva, principalmente de las especies *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*. De todos ellos, se ha seleccionado la cepa *P. chrysogenum* H3 por poseer muy buenas propiedades para la coinmovilización de células de levadura. La cepa *P. chrysogenum* H3 se ha aislado del ambiente por miembros del Departamento de Microbiología y se ha identificado por la CECT.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento, mantenimiento de las distintas cepas de levaduras y del hongo filamentosos y coinmovilización se muestran en la **Tabla 3.1** según su composición.

Tabla 3.1. Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medios	Composición
YPD (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)	
(Levaduras)	1% Extracto de levadura
	2% Peptona
	2-50% D-Glucosa
	2% Agar*
MEDIO DE FORMACIÓN DE BIOCÁPSULAS	
(Levaduras y hongo filamentosos)	0,67% YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) sin aminoácidos
	0,5% D-Ácido Glucónico
	0,72% Di-Sodio Hidrógeno-Fosfato
	0,36% Potasio-Dihidrógeno-Fosfato
	Hidróxido de sodio hasta pH=7
MEDIO DE ESPORULACIÓN	
(Hongo filamentosos)	0,1 % Extracto de levadura
	1,7 % Corn meal agar
	0,2 % Glucosa
	2% Agar*

*En el caso de medios sólidos.

Todos los medios se esterilizaron por calor húmedo a 120°C, a 1 atm durante 20 minutos en autoclave, pero en los medios para estudiar la tolerancia a la glucosa la esterilización fue por vapor fluyente a 100°C. El pH de los medios se ajustó con HCl hasta 5,5; excepto el medio de formación de biocápsulas o de coinmovilización, cuyo pH fue de 7. Las levaduras crecieron a 28°C en medio YPD durante 24 horas en un incubador agitador orbital Infors AG (Suiza) a 175 rpm. El medio de esporulación se utilizó para la formación de esporas y para el mantenimiento de las cepas del hongo filamentosos. El hongo filamentosos creció a 28°C en este medio durante 5 días.

Todos los reactivos químicos utilizados en el presente trabajo fueron de pureza analítica o superior y pertenecen a las casas comerciales de reconocido prestigio como Bio-Rad, Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Difco, Merck, Panreac y Sigma-Aldrich.

3.2.1. Medio y condiciones de formación de biocápsulas de levaduras

El medio de producción de biocápsulas de levaduras se tamponó a pH 7 con fosfato de sodio y potasio, y posteriormente se esterilizó en autoclave (120°C, 20 min). El medio se inoculó con 4×10^6 células de levadura/mL y con dos asas de siembra de esporas del hongo filamentoso. Las biocápsulas se formaron por agitación en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de formación en un agitador orbital New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA) a una velocidad de agitación de 175 rpm a 28°C durante 7 días. De este modo, se consiguió una coinmovilización espontánea entre los dos microorganismos en ausencia de un soporte externo, que hemos denominado “biocápsulas de levadura”. El procedimiento y el medio de coinmovilización celular ha sido descrito por Peinado *et al.* (2005 y 2006) y García-Martínez *et al.* (2011a).

3.2.2. Medios y condiciones para la fermentación alcohólica

3.2.2.1. Medio y condiciones para estudiar la tolerancia de las levaduras a la glucosa

El medio YPD, además de utilizarlo para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de levadura, también se ha usado para estudiar el efecto de la tolerancia de las levaduras a altas concentraciones de glucosa, variando su concentración de forma creciente desde 25 hasta 50% (p/v) de glucosa.

Se han realizado microfermentaciones con cada cepa de las levaduras X2, X3, X4, X5, X6, X9, E1, F12 y G1. La esterilización de los medios fue por vapor fluyente a 100°C durante 30 minutos. Las inoculaciones se realizaron con 4×10^6 células/mL. Las microfermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 100 mL conteniendo 50 mL de medio con tapón de caucho atravesado por una punta de micropipeta con cada cepa de levadura a 24°C y a 150 rpm en el agitador New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA) hasta que se dio por finalizada la fermentación.

3.2.2.2. Medio y condiciones para la fermentación con tubos de diálisis

Para los experimentos de diálisis se utilizaron unos tubos de membrana de celulosa de 15 cm de largo, de 2,5 cm de anchura media plana y de 1,6 cm de diámetro (Sigma-Aldrich) que retienen moléculas mayores de 12 kDa de peso molecular. El medio de fermentación utilizado fue 100 mL de YPD con 20 % (p/v) de glucosa, que se esterilizó en autoclave a 100°C durante 30 minutos. Los tubos de diálisis se rellenaron con 50 mL del medio de fermentación, se taparon con algodón estéril en sus extremos y se sumergieron en un vaso precipitado con los 50 mL restantes. Dentro de los tubos de diálisis se introdujeron aproximadamente 30-40 esferas de *P. chrysogenum* de 5 mm de

diámetro sin levaduras, obtenidas del mismo modo que las biocápsulas de levaduras, pero sin la inoculación de las células de levadura, y fuera de dichos tubos se inocularon células libres de *S. cerevisiae* con una concentración de 4×10^6 células/mL (**Figura 3.1**). De forma paralela, se usó como control la misma cantidad de biocápsulas de levadura dentro de los tubos de diálisis. La temperatura se mantuvo a 28°C y el medio de diálisis se agitó a 375 rpm en un agitador magnético Mini MR standard, Ikamag (Alemania) durante 5 días en ambos casos. Transcurrido este tiempo de fermentación, la viabilidad de *P. chrysogenum* y *S. cerevisiae*, en las esferas y en las biocápsulas respectivamente, se comprobó por la incubación de estos microorganismos en cajas de Petri con medio agar YPD a 28°C durante 72 h. Todas las pruebas de diálisis se realizaron por triplicado.

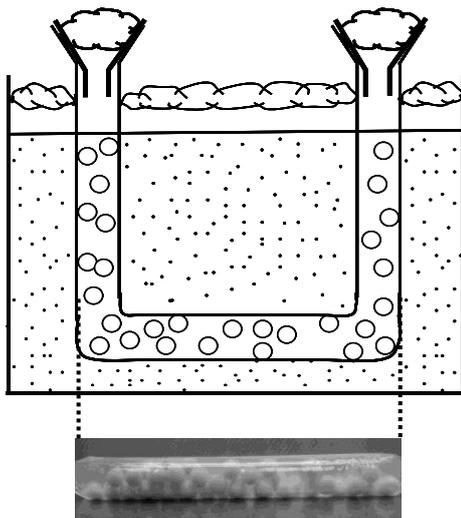


Figura 3.1. Representación esquemática de una fermentación con un tubo de diálisis. Dentro del tubo se encuentran esferas sólo con el hongo filamentoso y fuera del tubo células de levadura. En la parte de abajo del esquema se observa una imagen de un tubo de diálisis con biocápsulas de levadura.

3.2.2.3. Medio y condiciones para la producción de vinos dulces

Se ha usado un mosto de uva pasificada al sol de la variedad Pedro Ximénez procedente de la DOP Montilla-Moriles, de la Cooperativa San Acacio (Montemayor, Córdoba) obtenido de la vendimia 2008 de un prensado industrial. Este mosto se envasó en garrafas de 5 L y se congeló a -20°C hasta el momento de su uso. Antes de comenzar los experimentos, las garrafas se descongelaron sumergiéndolas bajo un flujo constante de agua a temperatura ambiente. Para retirar partículas sólidas se centrifugó a 300 rpm en una centrífuga Beckman Coulter J2-HS con rotor J-14.

El mosto se dividió en fracciones de 400 mL que se colocaron en matraces de 500 mL. Como control se usó un mosto sin fermentar al que se añadió alcohol vínico como en el método tradicional de elaboración. Todos los demás matraces se sumergieron en el baño termostático con agua a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ donde se llevaron a cabo las fermentaciones, de los cuales un lote se inoculó con la cepa X4 en forma libre, otro lote con la cepa X4 inmovilizada, y se procedió de la misma manera con la cepa X5. En todos los casos, el mosto se inoculó con 5×10^6 células/mL. Los matraces se taparon con algodón hidrófobo. Se realizaron fermentaciones hasta que se alcanzó aproximadamente 8% (v/v) de etanol. Las fermentaciones se detuvieron añadiendo alcohol vínico hasta un contenido final del 15% (v/v) y refrigerando los mostos a 2°C, incluso el primer lote que no se fermentó. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

3.2.3. Conservación de las cepas

Los cultivos de trabajo se realizaron en tubos con YPD agar inclinado de las distintas cepas de levadura y en tubos con medio de esporulación para el hongo filamentos, se almacenaron a 4°C. Estos cultivos se refrescaron en medio nuevo cada 3 meses o cada 24 h para su uso inmediato. El almacenamiento de los microorganismos durante periodos de tiempo más largos se realizó a -80°C en suspensiones celulares de glicerol al 20% (v/v). La inoculación en medio sólido para mantener las cepas se realizó en YPD agar inclinado y la incubación fue a 28°C durante 24-48 horas.

3.2.4. Aislamiento y obtención de cultivos axénicos

Para el aislamiento y la obtención de cultivos puros o axénicos se ha seguido las técnicas clásicas de Microbiología, como son la siembra en superficie por agotamiento en estría simple o en cuatro direcciones y la siembra con diluciones seriadas, que también se usó para el recuento de células viables.

3.3. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Las células de levadura y las hifas del hongo filamentos se observaron por microscopía óptica y electrónica. Sin embargo, la técnica de preparación de las muestras para la observación en ambos instrumentos no fue igual, debido a que sus fundamentos físicos y técnicos son diferentes. Mientras que el microscopio óptico debe su funcionamiento, de modo muy general, a un conjunto de lentes superpuestas que dejan pasar la luz visible, el electrónico se basa en un haz de electrones que por diversos campos magnéticos, generados en bobinas electromagnéticas, aumentan la imagen.

3.3.1. Microscopio óptico

El estudio al microscopio óptico se realizó en biocápsulas de levaduras cuyo diámetro aproximado fue de 3 mm después de 7 días en el medio de formación de biocápsulas.

3.3.1.1. Materiales y Aparato

- Biocápsulas de levaduras
- Bisturí
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Microscopio óptico de campo claro Nikon YS100

3.3.1.2. Técnica de observación en fresco

Primero, las biocápsulas se aplastaron ligeramente hasta conseguir desalojar gran parte del líquido de su interior. A continuación, las biocápsulas se diseccionaron en varios cortes con un bisturí. El corte de las muestras se hizo lo más limpio posible, y se colocó sobre el portaobjetos. Al aplicar el cubreobjetos se presionó de nuevo con cuidado sobre la muestra para eliminar lo máximo posible el líquido y evitar que se formen burbujas para su observación al microscopio óptico. Finalmente, la observación de las muestras se realizó incrementando progresivamente el aumento para el reconocimiento y estudio general de microscopía óptica de las diferentes estructuras presentes en cada uno de los dos distintos tipos celulares.

3.3.2. Microscopio electrónico

3.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido (*SEM, Scanning Electronique Microscopy*)

3.3.2.1.1. Reactivos, Materiales y Aparatos

- Glutaraldehído al 2% (v/v)
- Etanol al 90, 96 y 100%(v/v)
- Oro
- Pulverizador Coalter Bal-Tec SDC 005 (USA)
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JMS 6300 (Japón)

3.3.2.1.2. Técnica

Las muestras que se emplearon en microscopía electrónica correspondían a secciones de 1-2 mm de grosor aproximadamente de paredes de biocápsulas recién formadas de tamaño mediano o de biocápsulas que se han reutilizado dos veces en fermentación. Las piezas se fijaron en glutaraldehído al 2% (v/v) durante 6-8 horas. Las muestras se deshidrataron en alcohol 90%, 96% y 100% (v/v) con un intervalo de 20 minutos entre cada uno y se pulverizaron a modo de lluvia oblicua recubriéndolas con oro para la producción de películas conductoras muy finas, de aproximadamente 10 nm de espesor, sobre las muestras usando un pulverizador Coalter Bal-Tec SDC 005 (USA) para que al observarse dé una imagen tridimensional. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JMS 6300 (Japón). Todo este procedimiento se realizó con la asistencia técnica de la Unidad de Microscopía Electrónica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO).

3.3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electronique Microscopy*)

3.3.2.2.1. Reactivos, Materiales y Aparatos

- Glutaraldehído al 2,5% (v/v) y paraformaldehído al 2% (v/v) (1:1) en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,8
- Cloruro de magnesio al 2 mM
- Tetraóxido de osmio al 1% (v/v)
- Etanol al 50, 70, 90 y 100% (v/v)
- Azul de toluidina
- Acetato de uranilo
- Citrato de plomo
- Resina epoxi
- Ultramicrotomo (“Ultracut E”, Leyca con cuchilla de Diamond de 45°)
- Microscopio electrónico transmisión (T.E.M.) “EM 300 Philips”

3.3.2.2.2. Técnica

Las secciones de 1-2 mm de grosor de las paredes de las biocápsulas recién formadas se fijaron rápidamente en una solución 1:1 de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% (1:1) en tampón cacodilato 0,1 M a pH 6,8 y cloruro de magnesio 2 mM, durante 6-8 horas a una temperatura de 4°C. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado de las muestras en el mismo tampón, repitiendo la operación tres veces, con una duración de cada lavado de 20 minutos.

Tras la fijación de las células, éstas se sumergieron durante 1 hora en una solución de tetraóxido de osmio al 1%, y a continuación, se procedió a un nuevo lavado con el tampón cacodilato 0,1 M. Para llevar a cabo la deshidratación de la muestra, ésta se sometió a un gradiente creciente de etanol (50, 70, 90 y 100% de pureza), con un intervalo de 20 minutos entre cada uno. Las muestras se sometieron a infiltración en una mezcla de etanol al 100% y resina epoxi durante 2 horas en agitación continua.

Para la obtención de los bloques definitivos las muestras se mantuvieron en resina epoxi pura durante todo un día y se polimerizaron a 60°C. A partir de los bloques que contenían las muestras infiltradas se efectuaron cortes semifinos de 1µm de grosor, que se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos, de 700 Å de grosor, se realizaron con un ultramicrotomo y se tiñeron con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo. Dichos cortes se colocaron en rejillas de cobre especiales para su visualización al microscopio de transmisión Philips EM 300. Durante todo este proceso se contó con la asistencia técnica de la Unidad de Microscopía Electrónica del SCAI de la UCO.

3.4. PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO DE *Saccharomyces cerevisiae* G1 EN FORMA LIBRE Y COINMOVILIZADA

La proteómica (el análisis a gran escala de los productos de un genoma mediante métodos bioquímicos) permite obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. Esta herramienta ha contribuido de forma relevante al establecimiento de la conexión entre las secuencias genómicas y su función biológica. La combinación de la espectrometría de masas con la electroforesis bidimensional y el análisis bioinformático han hecho posible la identificación de proteínas a gran escala.

El procedimiento general del análisis proteómico de las levaduras en forma libre y coinmovilizada realizado en esta tesis doctoral se desglosa, a continuación, en las distintas etapas que comprenden desde la preparación de los extractos proteicos hasta la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (MS) acoplada a una absorción/desorción con láser asistida por matriz (MALDI) con cámara de tiempo de vuelo (TOF).

3.4.1. Preparación de las muestras

3.4.1.1. Fundamento

La preparación de la muestra es el paso más importante para la obtención de geles bidimensionales, en los que es posible identificar un número elevado de proteínas de forma individualizada. El objetivo de la optimización de los protocolos de extracción de proteínas es visualizar el mayor número posible de proteínas, para lo cual es necesario separar físicamente cada una de las proteínas que forman parte de los complejos presentes en las células. Durante el proceso de preparación de las muestras es fundamental eliminar en gran medida compuestos que puedan provocar algún tipo de interferencia con las técnicas posteriores como son sales, polisacáridos, fenoles (Rabilloud *et al.*, 2007).

3.4.1.2. Reactivos, Materiales y Aparatos

- Solución de NaCl 100 mM
- Tampón 1: SDS 5% (p/v); Tris-HCl 0,5 M pH 7,5
- Tampón 2: Thiourea 2 M; Urea 7 M; CHAPS 4 % (p/v); DTT 1% (p/v); Pharnalite 3-10 2% (v/v)
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%
- Bolas de vidrio de diámetro 600 µm (Sigma-Aldrich)
- Sistema de filtro Millipore
- Sistema para la determinación de la concentración de proteínas: Bradford
- Centrífuga Beckman Coulter J2-HS
- Centrífuga Heraeus Biofuge 17 FR
- Agitador Vórtex- Genie2
- Agitador Heidolph modelo DSG 304

- Incubador agitador orbital Infors AG (Suiza)

3.4.1.3. Técnica

El estudio proteómico comparativo de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó con células de la cepa de levadura G1 en forma coinmovilizada (B) y células de levadura en forma libre (L). El protocolo seguido para la óptima preparación de extractos proteicos implicó tres pasos previos generales:

a) Crecimiento celular:

Las células de levadura G1 crecieron en medio líquido YPD al 2% (p/v) de glucosa y se incubaron a 28°C a 175 rpm en un incubador agitador orbital Infors AG (Suiza) durante aproximadamente 12 horas hasta alcanzar una absorbancia de 0,5 a 600 nm. El hongo filamentoso creció en medio de esporulación y ambos microorganismos se inocularon en el medio de formación de biocápsulas. Los medios empleados están descritos en la **Tabla 3.1**. Para el estudio de las células de levadura libres se procedió de la misma manera sin la inoculación del hongo filamentoso.

b) Lisis celular:

El procedimiento de rotura celular se llevó a cabo con métodos diferentes según la levadura sea en forma coinmovilizada o en forma libre.

Las células de levadura inmovilizada se extrajeron de la biocápsula por rotura mecánica manualmente con la ayuda de un mortero y agitación vigorosa (Heidolph DSG 304) en una solución de NaCl 100 mM durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las células de levadura se separaron de las hifas del hongo filamentoso por dos filtraciones sucesivas con filtros de distintos tamaños de poro, la primera con un filtro Millipore de 180 µm y la segunda de 30 µm de diámetro, respectivamente. Las células de levadura se recogieron por centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga Beckman Coulter J2-HS con rotor J-14. La lisis celular tanto física como química procedente del inmovilizado se realizó según Boucherie *et al.*, (1995); Khoudoli *et al.*, (2004) con algunas modificaciones.

Las células de levadura libre se recogieron por centrifugación (Beckman Coulter J2-HS con rotor J-14) en las mismas condiciones antes indicadas para la levadura coinmovilizada, una vez obtenidos los cultivos de la levadura en forma libre tras 7 días en el medio de formación de biocápsulas.

Ambos tipos de levadura se rompieron agitando en Vórtex- Genie2 con DTT y bolas de vidrio de diámetro 600 µm, a velocidad máxima, 6 veces durante 1 minuto, manteniendo siempre en hielo picado entre agitación y agitación. La muestra se desnaturalizó con 40 µL del tampón 1. Se agitó e incubó 5 minutos a 95°C en el bloque seco. Se colocó el vial de cada muestra en hielo picado y se añadió 500 µL del tampón 2. Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los restos celulares y las bolas de vidrio se eliminaron mediante

centrifugación durante 20 minutos, a 4°C y a 12 000 rpm en una centrífuga Heraeus Biofuge 17 FR, y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su utilización.

c) Limpieza de extractos proteicos:

Para la limpieza de los extractos proteicos y la cuantificación de la concentración de proteínas se siguió el mismo procedimiento en ambos formatos de levadura.

El procedimiento de limpieza de los extractos de proteínas empleado para eliminar ADN, sales y restos de detergente (SDS) consistió en la precipitación de dichas proteínas en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v) con 0,07% (p/v) DTT y acetona fría durante 24 h a -20°C para así favorecer la precipitación (Fernández-Acero *et al.*, 2006). Se añadió a volúmenes iguales al extracto proteico. Tras el tiempo de incubación, las muestras se recogieron por centrifugación en una centrífuga Heraeus Biofuge 17 FR a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C, y posteriormente, se resuspendieron con 500 µL de acetona fría 30 min a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante. El residuo de acetona se evaporó en un concentrador 5301 Eppendorf a temperatura ambiente y la pella de proteínas resultante se resuspendió en 300 µL del tampón 2. Se dejó durante 3 horas en agitación (Heidolph DSG 304) a temperatura ambiente para asegurarnos que no hay proteínas adheridas a las paredes del vial. La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976) usando como patrón albúmina de suero bovino (*BSA*) (Sigma-Aldrich). Las muestras se congelaron a -20°C hasta el isoelectroenfoque.

3.4.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)

3.4.2.1. Fundamento

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución, capaz de resolver mezclas complejas de proteínas en un único experimento. Se trata del método más utilizado por conseguir, de forma eficaz, la separación e individualización de proteínas de entre miles de proteínas en un único gel bidimensional. Esta técnica combina dos métodos electroforéticos, el isoelectroenfoque (*IEF, isoelectrofocusing*), como primera dimensión, y la electroforesis desnaturante (*SDS-PAGE*), como la segunda dimensión. En la primera, las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), y en la segunda, según su masa molecular (*M_w*). El método fue descrito originalmente por O'Farrell (1975), al que se ha ido incorporando numerosas innovaciones, mejoras y optimizaciones. Destacar como la más relevante el desarrollo de tiras de geles con gradientes inmovilizados y preestablecidos de pH, (*IPG, Immobilized pH gradient*), que ha contribuido a la gran acogida de esta técnica (Görg *et al.*, 2004), además de resultar una técnica relativamente fácil, rápida y asequible. Estos gradientes de pH inmovilizados son los responsables de la gran reproducibilidad entre los experimentos, siendo compatible con etapas posteriores de identificación y análisis de proteína por espectrometría de masas.

En la actualidad, es posible disponer de un amplio intervalo de gradientes de pH con extremos comprendidos entre pH 3,0 a pH 12,0. Esto permite, en gran medida,

incrementar la capacidad de resolver el elevado número de proteínas presentes en una muestra determinada. La aplicación de la técnica de electroforesis bidimensional en este trabajo ha permitido identificar un gran número de proteínas implicadas en el metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.2.2. Reactivos, Material y Aparatos

- Tampón 1: SDS 5% (p/v); Tris-HCl 0,5 M; pH 7,5
- Tampón 2: Thiourea 2 M; Urea 7 M; CHAPS 4 % (p/v); DTT 1% (p/v); Pharmalite 3-10 2% (v/v)
- Sistema para la determinación de la concentración de proteínas: Bradford
- Tiras de geles de isoelectroenfoque de 17 cm, con gradiente de pH no lineal +N3-10 (número catálogo 163-2099, Bio-Rad)
- Tampón de rehidratación: Urea 7 M, Thiourea 2M, CHAPS 2% (v/v), DTT 1% (p/v), Biolytes (anfolitos) 0,5% (v/v) pH 3-10 (Bio-Rad) y Azul de bromofenol 0,0001% (p/v)
- Tampón de solubilización: Urea 7M; CHAPS 2% (v/v)
- Tampón de equilibrado I: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; Urea 6 M; SDS 2 % (p/v); Glicerol 20 % (v/v); DTT 2 % (p/v)
- Tampón de equilibrado II: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; Urea 6 M; SDS 2 % (p/v); Glicerol 20 % (v/v); Iodoacetamida 2,5% (p/v)
- Tampón de electroforesis: Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M; SDS 0,1 % (p/v); pH 8,3
- Agarosa de sellado al 0,5% (p/v) con azul de bromofenol
- Aceite mineral (Bio-Rad)
- Acrilamida/Bisacrilamida al 13% (v/v)
- TEMED (v/v) (N,N,N,N'-tetrametilnediamina)
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
- SDS al 10% (p/v)
- APS (v/v) (Persulfato amónico)
- Solución de tinción: 1 g Azul Coomassie, 200 mL metanol, 80 g sulfato amónico en 22,5 mL ácido ortofosfórico al 85%
- Solución de decoloración: Tris 0,1 M pH 6,5 H₃PO₄; metanol al 25% (v/v), sulfato amónico al 20% (p/v)
- Etanol 70%
- Patrones de peso molecular (Bio-Rad)
- Sarcófago para IEF
- Pinzas planas para IEF
- Protean IEF (Bio-Rad)
- Protean II Cell (Bio-Rad)

3.4.2.3. Técnica

Para la primera dimensión, las muestras se pusieron en contacto con tiras de geles *IPG* de isoelectroenfoque de 17 cm, con gradiente de pH inmovilizado no lineal +N3-10. Las tiras se rehidrataron de forma pasiva en tampón de rehidratación durante 2 horas,

después se sometieron a otra rehidratación activa a 50 V durante un período de 16 horas a 20°C.

Las muestras se prepararon en el tampón de rehidratación hasta un volumen total de 300 µL por carril. La cantidad de proteínas cargada en cada carril fue de 500 µg totales (geles preparativos). Una vez colocada la tira *IPG* en el sarcófago del *IEF*, se cargó cada carril con la muestra del extracto proteico correspondiente y se recubrió con aceite mineral para evitar la evaporación y precipitación de la urea.

Tabla 3.2. Programa de isoelectroenfoque para extractos de proteína total en tiras de 17 cm.

Paso	Voltaje (V)	Tipo Gradiente	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	50	Rampa rápida	16:00	-
2	500	Rampa rápida	01:00	-
3	1000	Rampa rápida	01:00	-
4	8000	Rampa lineal	00:30	-
5	8000	Rampa lineal	07:00	-
6	500	Rampa rápida	--	hasta 50 000

El isoelectroenfoque se realizó en el sistema Protean IEF (Bio-Rad) a 20°C aplicando una corriente continua de 50 µA *per* tira hasta 50.000 Vh, cuyo programa según la rampa de voltajes queda descrito en la **Tabla 3.2**. Al finalizar el programa, se retiró el aceite mineral con ayuda de papel de filtro secante y las tiras se congelaron a -20°C o se equilibraron inmediatamente según el método de Görg *et al.* (2004) para la segunda electroforesis.

Tras el isoelectroenfoque, comienza la fase de equilibrado de las muestras, donde las tiras de IEF durante 10 minutos se pusieron en contacto con 5 mL de tampón de equilibrado I y después otros 10 minutos con el tampón de equilibrado II en agitación. Las proteínas deben ser tratadas con agentes desnaturalizantes, como el SDS, para una buena separación de las proteínas según su peso molecular, puesto que desnaturaliza y despliega las proteínas al mismo tiempo. El SDS se une a ellas de forma proporcional a su peso molecular dotándolas de carga negativa por lo que son atraídas hacia el ánodo, con agentes reductores como el ditioneitol (DTT) que se encarga de reducir los puentes disulfuro y mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas, y con agentes alquilantes como la iodoacetamida (IAA) que alquila los grupos SH reducidos anteriormente y evita su posible posterior oxidación.

Para la segunda dimensión (*SDS-PAGE*), los geles de acrilamida empleados se realizaron a una concentración de poliacrilamida del 13% (p/v). A esta solución de poliacrilamida se le añadió TEMED y APS (persulfato amónico) como catalizadores para iniciar la reacción de polimerización de dicha poliacrilamida. Esta mezcla se vertió en el recipiente de polimerización, donde previamente se habían colocado los cristales de vidrio de tamaño aproximado de 180x245x1mm, en el interior de los cuales se formaron los geles. Para mantener el gel humedecido y obtener un frente recto se añadió etanol al

70% (v/v) mientras tuvo lugar la polimerización de los geles en el Protean II Cell (Bio-Rad).

Una vez finalizada la polimerización de los geles y el equilibrado de las tiras de IEF, se depositaron las tiras sobre la superficie de los geles de acrilamida, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira *IPG* y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal base. Seguidamente, se colocó un aplicador impregnado con 5 μ L de marcadores de peso molecular en el extremo básico de la tira que se usó como referencia para determinar la velocidad electroforética de las proteínas en el gel, y el conjunto se selló con una solución de agarosa al 0,5% (p/v) para fijar ambos geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas migran de un gel a otro. A continuación, se colocaron los geles en las cubetas de electroforesis y se rellenaron con 1,5 L de tampón de electroforesis cada una. Los geles se sometieron a una corriente constante de 60 mA *per* gel durante 5-6 h hasta que el frente de colorante, azul de bromofenol, llegó a la parte final de todos los geles.

3.4.3. Tinción de los geles

3.4.3.1. Fundamento

Una vez terminada la electroforesis bidimensional, es necesario la aplicación de un método de tinción que permita revelar la presencia y posición de las diferentes especies proteicas (*spot*) en el gel de acrilamida. La técnica más utilizada es la tinción con azul de Coomassie CBB G-250 (Merck, Germany) por ser el método más rápido y compatible para la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Se puede detectar hasta 0,2-0,6 μ g de proteína, y es cuantitativo (lineal) hasta 15-20 μ g.

3.4.3.2. Técnica

Al terminar la electroforesis bidimensional, los geles preparativos se tiñeron según el método descrito por Mathesius *et al.*, (2001) con CBB G-250. Para la tinción de geles 2D se recomienda eliminar los anfolitos mediante inclusión de ácido ortofosfórico al 85% (v/v) en el colorante. Los geles se sumergieron en una solución de tinción, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 horas en agitación suave. A continuación, se realizó un paso de desteñido por difusión en soluciones de metanol al 20% (v/v). Este proceso de teñido-desteñido se repitió dos veces. Finalmente, se lavaron los geles en agua bidestilada hasta alcanzar el contraste adecuado.

3.4.4. Análisis de las imágenes

3.4.4.1. Fundamento

Los geles bidimensionales teñidos se deben digitalizar con un escáner. Las imágenes de alta resolución son entonces importadas y guardadas en un ordenador en

formato TIFF para su posterior análisis con un programa informático, PDQuest (Bio-Rad), que contempla una serie de pasos como son la detección de puntos, manchas o especies proteicas, optimización mediante un filtrado gaussiano 9x9 previo al análisis, eliminación del ruido de fondo, estimación del punto isoelectrico y peso molecular para cada uno de los puntos, determinación de la intensidad de los puntos, cuantificación y comparación del patrón de manchas generados por diferentes geles.

Los resultados obtenidos de las imágenes con este análisis permiten comparar de forma cuantitativa y cualitativa las manchas proteicas, emparejarlas con las correspondientes manchas en el resto de los geles e identificar los cambios en la expresión proteica en una condición experimental determinada.

Este proceso requiere una revisión manual pormenorizada y, en ocasiones, la edición y corrección de alguna de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente. A continuación, el programa densitometra las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. Para compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción en los diversos niveles de concentración en cada gel, se aplica el método de normalización más sofisticado del que se dispone con PDQuest mediante la opción “Local Regression Model”.

Este método calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos sus puntos y que sirve para calcular el factor de normalización para cada mancha. Por último, se establecen las “réplicas de grupo”, indicando al programa qué geles pertenecen a un mismo grupo de análisis, y se realiza un análisis cuantitativo y otro estadístico. Para asegurar la reproducibilidad de la técnica y un análisis de resultados apropiado se realizaron 3 geles por tratamiento.

3.4.4.2. Técnica

Las imágenes de los geles bidimensionales teñidos se capturaron con un densitómetro GS-800, Calibrated Densitometer (Bio-Rad) para obtener una imagen digital. El análisis de estos mapas proteicos se realizó empleando el programa informático PDQuest 2-D Analysis Software versión 8.0.1 (Bio-Rad). Las imágenes importadas a este programa se depuraron y optimizaron mediante un filtrado previo al análisis, gaussiana de 9 x 9. A continuación, se creó un archivo con las imágenes de todos los geles en las dos condiciones.

Los datos obtenidos mediante PD-Quest se exportaron a una hoja de cálculo Excel, donde se les dio el formato adecuado para poder analizarlos mediante el programa SPSS v.13.0, que nos permitió realizar la prueba de ANOVA para comparar las medias de una misma variable en más de dos grupos, cuando existe normalidad en la distribución de los datos y homogeneidad en las varianzas muestrales.

Para ello se realizó la prueba de ANOVA, seguida de un análisis post-Hoc (prueba Duncan) que nos permitió comprobar la distribución normal de las variables analizadas y la homogeneidad de las varianzas. Se consideran manchas diferencialmente expresadas aquellas que presentan un valor $p < 0,05$.

3.4.5. Identificación de las proteínas analizadas mediante MALDI-TOF

3.4.5.1. Fundamento

Los grandes progresos en proteómica son posibles al desarrollo tanto de técnicas de separación y análisis de proteínas (2-DE, cromatografía multidimensional, MS) como de herramientas bioinformáticas (Apweiler *et al.*, 2004) que permiten identificar las proteínas de interés mediante la comparación de los espectros de masas de péptidos o de huella peptídica (*peptide mass fingerprint- PMF*) obtenidos por digestión trípica de las proteínas en geles de acrilamida.

Existen dos técnicas de espectrometría de masas muy utilizadas para el análisis de las proteínas en los geles bidimensionales. La primera es la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Off Flight*) y análisis de huellas peptídicas (*PMF*). La segunda técnica es la espectrometría de masas en tándem alimentada por un cromatógrafo de líquidos (*LC/MS-MS*). En este estudio se ha realizado la identificación de proteínas por huella peptídica utilizando un analizador de masas MALDI-TOF.

Para identificar las proteínas de interés, primero se determinan las masas de los péptidos generados en la digestión con tripsina por espectrometría de masas; y a continuación, se pueden comparar mediante la utilización de herramientas bioinformáticas los listados de masas generados de forma experimental con las masas teóricas resultantes de digerir con tripsina las secuencias disponibles en bases de datos.

Con esta técnica, las muestras digeridas con tripsina son embebidas en una matriz de bajo peso molecular que es capaz de absorber la energía de un haz de luz láser que incide sobre la muestra y que induce el proceso de ionización de los péptidos. Los diferentes iones generados se separarán con su ratio masa/carga (m/z) en el interior de un tubo sometido a una diferencia de potencial. Los iones en función de su relación m/z alcanzarán una determinada velocidad que será proporcional al tiempo de vuelo del ión. De modo que, cuanto más pequeños sean los iones antes llegarán al detector y menor será el tiempo de vuelo. El detector es capaz de medir el número de iones que llegan en un momento determinado.

3.4.5.2. Técnica

Una vez acabado todo el proceso de análisis de imágenes, se seleccionaron las proteínas de interés para su estudio; es decir, las que mostraron diferencias cuantitativas y las diferencias cualitativas significativas entre las levaduras en forma libre y coinmovilizada. Estas proteínas se recortaron o “picaron” en cada uno de los geles bidimensionales manualmente con ayuda de la punta de una micropipeta. Los fragmentos del gel resultante de cada *spot* se digirieron automáticamente usando un sistema de digestión de proteína Proteineer DP (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) con tripsina en el Servicio de Proteómica del SCAI de la Universidad de Córdoba siguiendo el protocolo de digestión descrito por Schevchenko *et al.* (1996).

Los extractos peptídicos, con un intervalo de masa/carga de 800-4000, se analizaron por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization the time-of-flight*) MS mediante un espectrómetro “4700 Proteomics Analyzer Mass Spectrometer” (Applied Biosystems, USA). Los péptidos obtenidos se introdujeron en las bases de datos SwissProt y Trembl del Proteoma de Levaduras de *S.cerevisiae*, (www.expasy.ch/sprot) con los softwares respectivos PepIdent y Mascot (Perkins *et al.*, 1999).

Los parámetros introducidos en cada base de datos fueron:

- i. Modificación completa (carbamidometilación) de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina.
- ii. Estado de la carga del péptido (+1) y masa máxima del péptido (70 ppm).
- iii. Un mínimo de 4 péptidos marcados y un 25% de coincidencia en la secuencia.

La búsqueda se ha restringido a *Saccharomyces cerevisiae* y se ha establecido la certeza de un resultado, cuando la puntuación del buscador superaba el 90%.

Para obtener información sobre cepas de levaduras, genes y secuencias de proteínas se han utilizado las siguientes bases de datos (**Tabla 3.3**):

Tabla 3.3. Diversas bases de datos empleadas.

Nombre	URL
Genome Protein Machine Database (GPMDB)	http://gpmdb.thegpm.org/
Sacharomyces Genome Database (SGD)	www.yeastgenome.org
Expert Protein Analysis System (Swiss institute of bioinformatics) (ExPaSy)	expasy.org/
Yeast Proteome Database (YPD)	www.proteome.com/databases/

3.4.6. Interpretación de los resultados

Los rápidos y continuos avances de las técnicas y herramientas informáticas utilizadas en el estudio de las proteínas y de los procesos bioquímicos implicados ofrecen una gran cantidad de información muy importante sobre el origen de las diferentes alteraciones que pueden sufrir los organismos vivos. Por ello, algunos autores han manifestado la posibilidad de un cambio de una “era genómica” a una “era proteómica”, aunque en realidad lo interesante es la complementación de ambas eras. Como motor de búsqueda se utilizó el programa Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido).

Los criterios para asignar una identificación inequívoca a cada proteína analizada utilizan los siguientes parámetros que quedan reflejados en los informes obtenidos del motor de búsqueda:

- *Protein score*: Es una puntuación que da el motor de búsqueda a cada identificación según su sistema probabilístico basado en la distribución (el número) de las masas de los péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF y sus correspondencias con las masas de péptidos resultante de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos.
- *Protein score C.I.*: Es el nivel de confianza para el *protein score* que debe superar el 99%, la búsqueda será más fiable cuanto más cercano esté del 100, y por encima del 95% será significativo.
- *Peptide matched*: Es el número de péptidos que se consigue emparejar entre las masas de los péptidos experimentales y las masas de los péptidos teóricos.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Recuento del número de células totales

3.5.1.1. Fundamento

El contador de partículas Coulter Z2 (Beckman) (**Figura 3.2**) es un aparato que se emplea para hacer un recuento rápido de células y para medir el tamaño de una población celular basado en el principio Coulter. La tecnología está recogida en la norma ISO 13319.

Este método cuenta y mide los cambios en la resistencia eléctrica a medida que las células suspendidas en un líquido conductivo (Isotón) pasan a través de un pequeño orificio en la pared de un tubo de contaje, situado dentro de un vaso con dos electrodos y la suspensión celular. Cuando las células atraviesan el orificio, éstas desplazan su propio volumen de electrolito, lo que crea un aumento momentáneo de la resistencia al paso de corriente eléctrica a modo de pulso. Este pulso se puede medir como un cambio de voltaje o de corriente. La altura del pulso producido es proporcional al volumen de la partícula, la cantidad de pulsos es proporcional al número de células y la amplitud del pulso es proporcional al tamaño de la partícula que lo produjo. Este sistema determina la concentración de la muestra en número de partículas por mL.



Figura 3.2. Imagen del contador de células Coulter Z2 (Beckman)

Este pulso se puede medir como un cambio de voltaje o de corriente. La altura del pulso producido es proporcional al volumen de la partícula, la cantidad de pulsos es proporcional al número de células y la amplitud del pulso es proporcional al tamaño de la partícula que lo produjo. Este sistema determina la concentración de la muestra en número de partículas por mL.

3.5.1.2. Reactivo, Materiales y Aparato

- Isotón
- Micropipetas de 1, 100, 1000 μL
- Tarros para contar
- Contador de partículas Z2 Coulter y analizador de tamaño (Beckman)

3.5.1.3. Técnica

En nuestro caso, generalmente se preparó una suspensión celular de la muestra diluida 1/10 para evitar una alta concentración y la obstrucción del contador. Una vez bien homogeneizada, se añadió 100 μL a 39,9 mL de isotón en el vaso de contaje para proceder al recuento.

3.5.2. Recuento del número de células viables

3.5.2.1. Fundamento

El recuento de microorganismos viables se basa en que cada célula desarrollará una colonia visible; es decir que, cada colonia se origina de un único microorganismo. Este método es muy utilizado para determinar la concentración de una población celular en una muestra determinada.

3.5.2.2. Materiales y Aparato

- Medio YPD
- Diluciones seriadas
- Cajas de Petri
- Asa de Digralsky
- Pipetas de 100 y 1000 μL
- Mechero de gas
- Estufa de laboratorio

3.5.2.3. Técnica

El número de células viables se determinó por recuento directo de colonias en caja de Petri con agar YPD después de hacer diluciones seriadas. Para ello, a partir de la muestra se realizaron diluciones seriadas de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000 con agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 mL. De cada dilución se sembraron en superficie alícuotas de 0,1 mL en cajas de Petri con agar YPD estéril con ayuda de un asa de Digralsky para extender homogéneamente por toda la caja. Se incubaron a 28°C en una estufa de cultivo durante 24-48 horas. Para realizar el contaje se consideró válido aquellas cajas que mostraron un número de colonias comprendido entre 30 y 300. Los resultados se han expresado como media de los recuentos de cada dilución dado en UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/mL.

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en caja} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

Para el recuento de células viables de las levaduras inmovilizadas, las células de levadura se separaron previamente de las biocápsulas de la siguiente manera: 1 g de biocápsulas rotas mecánicamente en un mortero se resuspendió con 9 mL de una solución esterilizada de $\frac{1}{4}$ de solución Ringers a 100 rpm durante 30 minutos en un agitador Heidolph (Type DSG 304, Alemania) y 1 minuto en ultrasonido (Ultrasons, Selecta, España) todo el proceso se mantuvo a 4°C (Vargas *et al.*, 2007).

Previamente, las muestras se filtraron primero por un filtro de 180 μm de poro y posteriormente por otro de 30 μm (Millipore) para retirar hifas del hongo sueltas y recoger solamente células de levadura. Para determinar la viabilidad celular se sembraron por extensión 100 μL de las suspensiones diluidas en cajas de Petri con agar YPD.

La viabilidad celular se determinó por contejo de colonias después de 48 horas a 28°C. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inmovilizado o por mL de caldo de fermentación, respectivamente.

3.5.3. pH

El pH del mosto o vino tiene una gran influencia sobre el desarrollo de ciertos microorganismos, sobre la cantidad de sulfuroso activo, así como sobre las propiedades organolépticas.

La determinación de este parámetro se realizó a 20°C mediante un pH-metro digital marca Crison 2001 previamente calibrado con tampones de pH 7,02 y 4,00. Está basado en la medición de la diferencia de potencial entre dos electrodos, sumergidos en la muestra. Uno de los electrodos adquiere un potencial, que es una función definida del pH del líquido a medir, éste es el electrodo de vidrio. El otro electrodo, tiene un potencial fijo y de ahí su nombre de electrodo de referencia.

3.5.4. Acidez Titulable

3.5.4.1. Fundamento

La acidez titulable está considerada como la suma de los ácidos libres del mosto o vino al que previamente se le ha eliminado el CO₂ por agitación y vacío parcial. Habitualmente se expresa en gramos por litro de ácido tartárico, ya que suele ser el ácido mayoritario.

El método se basa en determinar los miliequivalentes de NaOH necesarios para neutralizar una alícuota de mosto o vino. El punto final de la valoración se puede determinar mediante el empleo de un indicador (por cambio de color) o bien electrométicamente (por pHmetro).

3.5.4.2. Reactivos, Material y Aparatos

- Solución NaOH 0,1 N
- Bomba de vacío
- Matraz kitasato de 100 ml con tapón negro de caucho
- pH-metro Crison 2001
- Bureta graduada

3.5.4.3. Técnica

Su determinación se efectuó por valoración directa de 20 ml de mosto o vino, exentos de CO₂, con NaOH 0,1 N hasta pH = 7,00, según normas de la C.E. (1990).

3.5.5. Determinación enzimática de metabolitos en mostos y vinos

3.5.5.1. Determinación de la concentración del etanol

Se realizó mediante un método enzimático específico Boehringer Mannheim/ R-Biopharm (Alemania) para etanol.

3.5.5.1.1. Fundamento

En presencia de nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD^+), el etanol se oxida a acetaldehído en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenada (ADH) (1).

El equilibrio de esta reacción tiende hacia la formación de etanol y NAD^+ . Sin embargo, en condiciones alcalinas y cuando se elimina el acetaldehído, la reacción puede desplazarse completamente hacia la formación del acetaldehído.

El acetaldehído se oxida cuantitativamente a ácido acético en presencia de aldehído-deshidrogenada (Al-DH) (2). La formación del NADH, medida por el aumento de la absorbancia a 340 nm, es proporcional a la cantidad de etanol presente.



3.5.5.1.2. Reactivos, Materiales y Aparato

- Test enzimático para etanol (n° catálogo 10 176 290 035)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico o cubetas de uso único
- Micropipetas para ensayos enzimáticos de 1000 μL , 200 μL y 100 μL
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.5.1.3. Técnica

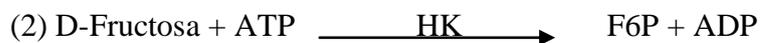
Según recomienda Boehringer Mannheim, se prepararon las soluciones contenidas en el kit enzimático y las muestras. Después, se siguió el procedimiento descrito para obtener las absorbancias en el espectrofotómetro y así determinar de la diferencia de absorbancias y aplicar el incremento de absorbancia (ΔA) en la ecuación general para calcular la concentración de etanol (g/L), teniendo en cuenta que el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución si la muestra ha sido diluida durante la preparación.

3.5.5.2. Determinación de la concentración de glucosa y fructosa

La determinación de la glucosa y la fructosa se realizó mediante un método enzimático, suministrado por Boehringer Mannheim/ R-Biopharm.

3.5.5.2.1. Fundamento

Este método está basado en la fosforilación de la D-glucosa y la D-fructosa con adenosín-trifosfato (ATP) por la enzima hexoquinasa (HK) dando como resultado glucosa-6-fosfato (G6P) y fructosa-6-fosfato (F6P), respectivamente con la formación simultánea de adenosina-5'-difosfato (ADP) (1), (2):



En presencia de la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH), la glucosa-6-fosfato se oxida a D-gluconato-6-P por nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP⁺) con formación de NADPH (3):



La cantidad de NADPH formado en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa. La cantidad de NADPH se determina por su absorbancia a 340 nm.

Una vez terminada esta reacción, la fructosa-6-fosfato se transforma en glucosa-6-fosfato (4) por la acción de fosfoglucosa isomerasa (PGI), la glucosa-6-fosfato que sigue la misma reacción de oxidación que en el caso anterior (3).



La cantidad de NADPH formado en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-fructosa y se determina por absorbancia a 340 nm.

3.5.5.2.2. Reactivos, Material y Aparato

- Test enzimático para glucosa y fructosa (n° catálogo es 10 139 106 035)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico o cubetas de uso único
- Micropipetas para ensayos enzimáticos de 1000 µL, 200 µL y 100 µL
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.5.2.3. Técnica

Una vez se prepararon las soluciones contenidas en el kit y las muestras, se obtuvieron las absorbancias medidas en el espectrofotómetro según recomienda dicho test enzimático. Se calculó el incremento de absorbancia (ΔA) para aplicarlo a la ecuación general y calcular la concentración de glucosa y fructosa (g/L). Si las muestras se diluyeron se multiplicó por el factor de dilución.

3.5.5.3. Determinación de la concentración de ácido acético

La determinación del ácido acético se realizó mediante un método enzimático suministrado por Boehringer Mannheim/ R-Biopharm.

3.5.5.3.1. Fundamento

Este test está basado en la conversión del ácido acético a acetil-CoA en presencia de la enzima acetil-CoA sintetasa (ACS), ATP y CoA (1):



El acetil-CoA reacciona con oxalacetato para dar citrato en presencia de la citrato sintasa (CS) (2):



El oxalacetato requerido en esta reacción (2) se forma a partir de malato y NAD^+ en presencia de la malato deshidrogenada (MDH) (3):



En esta última reacción (3) el NAD^+ es reducido a NADH. La determinación del ácido acético está basada en la formación de este NADH, medido por un incremento de absorbancia a 340 nm aplicando el correspondiente cálculo matemático.

3.5.5.3.2. Reactivos, Material y Aparato

- Test enzimático para acético (nº catálogo 10 148 261 035)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico o cubetas de uso único
- Micropipetas para ensayos enzimáticos de 1000 μL , 200 μL y 100 μL
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.5.3.3. Técnica

Se prepararon las soluciones contenidas en el test enzimático y las muestras, y se siguieron las recomendaciones en todo el procedimiento para obtener las absorbancias y calcular la concentración de ácido acético (g/L), de modo que si la muestra ha sido diluida durante la preparación, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución.

3.5.5.4. Determinación de la concentración de ácido succínico

La determinación del ácido succínico se realizó mediante un método enzimático suministrado por Boehringer Mannheim/ R-Biopharm.

3.5.5.4.1. Fundamento

Este test está basado en la conversión del ácido succínico a succinil-CoA en presencia de la enzima succinil-CoA sintetasa (SCS) también conocida como succinato tioquinasa, además de inosina-5'-trifosfato (ITP) y de coenzima A (CoA) con una formación simultánea de inosina-5'-difosfato (IDP) y fosfato inorgánico (Pi) (1):



Inosina-5'-difosfato reacciona con fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de la enzima piruvato kinasa (PK) para obtener ITP y piruvato (2):



El piruvato se reduce por NADH en presencia de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) (3):



La cantidad de NADH oxidado de la última reacción es estequiométrica a la cantidad de ácido succínico. El NADH se determinó por la absorbancia medida a 340 nm.

3.5.5.3.2. Reactivos, Material y Aparato

- Kit enzimático para ácido succínico (n° catálogo 10 176 281 035)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico o cubetas de uso único
- Micropipetas para ensayos enzimáticos de 1000 µL, 200 µL y 100 µL
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.5.4.3. Técnica

Primero, se prepararon las soluciones contenidas en el kit enzimático y las muestras a 37°C. Después, se obtuvieron las absorbancias en el espectrofotómetro y se aplicó la ecuación general que se describe en el protocolo para calcular la concentración de ácido succínico (g/L), se multiplicó por el factor de dilución en el caso de diluir las muestras.

3.5.5.5. Determinación de la concentración de acetaldehído

La determinación de acetaldehído en mostos y vinos se realizó mediante un test enzimático suministrado por Boehringer Mannheim/ R-Biopharm.

3.5.5.5.1. Fundamento

Este método se basa en que el acetaldehído es cuantitativamente oxidado a ácido acético en presencia de la enzima aldehído deshidrogenada (Al-DH) y nicotinamida-adenin dinucleótido (NAD⁺) (1):



La cantidad de NADH formado es estequiométrica a la cantidad de acetaldehído. El NADH se determinó por la medida de absorbancia a 340 nm.

3.5.5.5.2. Reactivos, Material y Aparato

- Kit enzimático para acetaldehído (n° catálogo 10 668 613 035)
- Cubetas de vidrio de 1 cm de recorrido óptico o cubetas de uso único
- Micropipetas para ensayos enzimáticos de 1000 µL, 200 µL y 100 µL
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.5.5.3. Técnica

Una vez preparadas las soluciones contenidas en el kit y las muestras, se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro según recomienda el protocolo del test enzimático. Se calculó el incremento de absorbancia (ΔA) y se aplicó a la ecuación general para determinar la concentración de acetaldehído (g/L). En el caso de que las muestras se diluyeron se multiplicó por el factor de dilución.

3.5.6. Determinación de Ocratoxina A (OTA)

El método de análisis para la determinación de OTA se basa en una extracción por método de Luke y un posterior análisis del extracto mediante HPLC-Espectrómetro de Masas, trabajando con ionización Electrospray negativo y en modo MRM de adquisición de iones (3 transiciones). Esto se lleva a cabo en un HPLC-Masas Varian 1200L Triple Cuadrupolo. El análisis fue llevado a cabo en la UCO, por el personal asistente del SCAI. Su concentración viene determinada en µg/L

3.5.7. Cuantificación de proteínas en células de levadura

3.5.7.1. Fundamento

La concentración de proteínas de los extractos celulares se estimó por el método descrito por Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color que se produce cuando una solución ácida de Azul Brillante de Coomassie G250 (CBB) se une a las proteínas. La forma protonada de este colorante presenta un color rojo-anaranjado y la absorbancia máxima se produce a una longitud de onda de 465 nm. Cuando el CBB está unido a proteínas, interactúa con los grupos hidrofóbicos y se suprime la protonación en los grupos cargados positivamente, observándose un color azul. En estas condiciones, la absorbancia máxima a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína existente en la muestra.

3.5.7.2. Reactivos, Materiales y Aparato

- Azul Brillante de Coomassie G250
- Seroalbúmina bovina
- Tampón de Solubilización: Urea 8M, CHAPS 2% (v/v)
- Reactivo Bradford
- Micropipetas
- Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640

3.5.7.3. Técnica

Previamente a la cuantificación de las muestras, se realizó una recta patrón con seroalbúmina bovina (SAB) en concentraciones crecientes de 0; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de una disolución inicial de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La ecuación de la recta patrón con SBA se muestra en la **Figura 3.3**.

$$Y = 0,7427 X + 0,0286, \quad R^2 = 0,9842$$

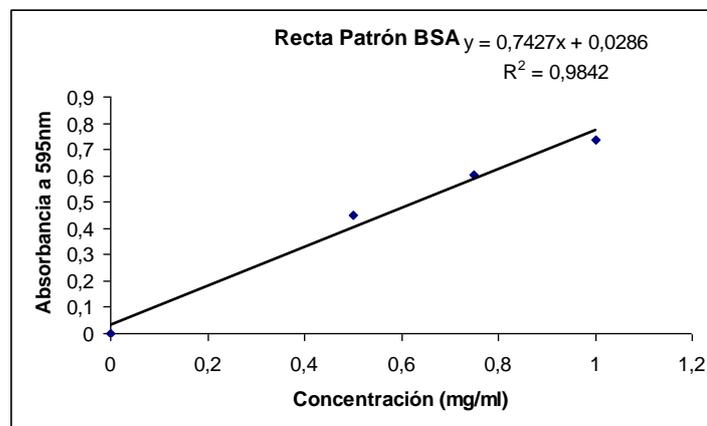


Figura 3.3. Recta patrón con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina.

La disolución de las muestras de los extractos proteicos de levadura fue inicialmente 1/10 para que se incluyesen en la recta patrón. A cada una de las muestras se le añadió 750 μL de reactivo Bradford concentrado (Sigma-Aldrich) y se agitó suavemente para mezclar bien (**Tabla 3.4**). Tras 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se leyó la absorbancia a 595nm. La determinación de proteínas en cada muestra se realizó por extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos en la recta patrón.

Tabla 3.4. Composición de las muestras y patrones empleados para la estimación de la concentración de proteínas.

Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) / Dilución	SAB (μL)	Muestra (μL)	Tampón Solubilización (μL)	Reactivo Bradford (μL)
Blanco	0	0	1500	0
Patrón 1 (0,25)	375	0	1125	0
Patrón 2 (0,50)	750	0	750	0
Patrón 3 (0,75)	1125	0	375	0
Patrón 4 (1,00)	1500	0	0	0
Muestra 1 (1/10)	0	25	725	750
Muestra 2 (1/20)	0	25	725	750

3.5.8. Determinación de los compuestos del aroma

La determinación de los compuestos del aroma en mostos y vinos presenta una serie de problemas como son el elevado número de compuestos y familias químicas que engloba y el amplio intervalo de concentraciones en la que éstos suelen encontrarse. La técnica más utilizada para este análisis es la cromatografía de gases, ya que es la técnica analítica de separación que ofrece mejor poder de resolución para los compuestos orgánicos volátiles.

La cromatografía de gases es una técnica que se basa en las diferencias de volatilidad de los compuestos volátiles contenidos en una muestra y en su capacidad para ser adsorbidos o retenidos por la fase estacionaria. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas portador inerte que no interactúa con las moléculas del analito, sino que su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La fase estacionaria son moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte (**Figura 3.4**).

Una vez que los compuestos volátiles alcanzan el sistema de detección se produce una señal que se transduce en forma de pico. El conjunto de todos los picos constituye un cromatograma, en el que cada analito tiene un tiempo de retención característico que se usa con fines cualitativos.



Figura 3.4. Fotografía del cromatógrafo de gases

3.5.8.1. Análisis de los compuestos volátiles minoritarios del aroma

3.5.8.1.1. Reactivos. Material y Aparatos

- Disolución de HCl 0,1 N
- Disolución de octanol-2 en etanol al 15 % (v/v)
- Disolución de NaCl
- Triclorofluorometano (freón-11)
- Na₂SO₄ anhidro
- Lana de vidrio
- Extractor líquido-líquido

- Helio
- Microconcentrador tipo Kuderna-Danish
- Baño de agua termostatzado
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 series

3.5.8.1.2. Técnica

Previamente a la inyección de la muestra en el CG, los volátiles minoritarios deben extraerse y concentrarse, dada la escasa proporción en que se presentan la mayoría de estos compuestos en mostos y vinos.

La extracción de los compuestos del aroma en estos medios se ha realizado mediante una extracción líquido-líquido, utilizando como extractante freón-11 (triclorofluorometano) siguiendo el procedimiento de Rapp *et al.* (1976). Este compuesto presenta ventajas como escasa reactividad y baja selectividad extractiva, lo que permite obtener extractos que contienen un amplio intervalo de familias de compuestos.

Para la extracción de estos compuestos se partió de una muestra de 100 mL de mosto o vino, se corrigió el pH hasta 3,5 con una disolución de HCl 0,1 N, y se le añadió como patrón interno 5 mL de una disolución al 15% (v/v) en etanol de octanol-2 siendo la concentración final en la muestra de 150 mg/L. Posteriormente, se añadieron 20 mL de una disolución saturada de NaCl con objeto de aumentar la fuerza iónica de la muestra y favorecer la extracción.

En el cuerpo de un extractor líquido-líquido de 250 mL para disolventes más densos que la muestra se añadieron 100 mL de freón-11 recién destilado, para evitar la presencia de impurezas, y a continuación se añadió la muestra ya preparada anteriormente con el patrón interno. Por último, se colocó un embudo difusor con objeto de favorecer la extracción de compuestos del aroma.

El matraz colector se sumergió en un baño de agua termostatzado a 30°C y la parte superior del cuerpo extractor se conectó a un refrigerante por el que circula agua a 4°C procedente de una unidad de frío.

Tras 24 h de extracción en continuo se recogió el freón y se filtró sobre lana de vidrio y una punta de espátula de Na₂SO₄ anhidro con objeto de eliminar las pequeñas gotas de muestra que pudiese contener el extracto de freón.

Una vez obtenido el extracto en freón conteniendo los compuestos del aroma, éste se concentró hasta un volumen de 0,1-0,2 mL en un microconcentrador tipo Kuderna-Danish, cuyo tubo de concentración se sumergió en un baño termostatzado con agua a 30°C y al que se adosó una columna de rectificación por la que circula agua a 25°C, lo que permite la evaporación del freón-11 pero no la de los volátiles contenidos en el extracto. Para evitar emisiones de freón-11 a la atmósfera, el final de la columna de rectificación se acopló mediante un codo de vidrio a un refrigerante con agua a 4°C.

Este procedimiento permite la reducción del extracto en freón hasta un volumen de 0,1 mL. Con ello se consigue aumentar la concentración de los compuestos contenidos en la muestra unas mil veces.

3.5.8.1.3. Identificación y cuantificación de compuestos volátiles minoritarios

La identificación y cuantificación de los compuestos del aroma se llevó a cabo por inyección de 3 μ L del concentrado de freón-11, obtenido como anteriormente se ha descrito, en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 series acoplado a un espectrómetro de masas. El cromatógrafo estaba equipado con una columna capilar de sílice fundida CP-Wax 57CB de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, con un espesor de revestimiento de 0,4 μ m y conectado a un ordenador para la recogida y tratamiento de los datos.

El gas portador utilizado fue helio a un flujo inicial de 0,9 mL/min en modo splitless con un flujo total de 6,4 mL/min y una purga de 3 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 275°C y la temperatura del horno se programó empezando a 40°C durante 10 min; una rampa de temperatura de 1°C/min hasta 180°C, la cual se mantuvo constante durante 60 min y un programa de post run de 185 °C durante 30 min. El flujo del gas portador aumentó de 0,9 mL/min a 1,2 mL/min, usando una rampa de 1 mL/min² cuando la temperatura del horno alcanzó los 154°C.

Los espectros de masas se obtuvieron mediante el método scan que consiste en registrar todos los iones en los que se fragmenta cada molécula y cuyas relaciones m/z estén comprendidas, en nuestro caso, entre 30 y 390. La interfase cromatógrafo de gases espectrómetro de masas se encontraba a una temperatura de 170°C y el voltaje del detector era de 1900 \pm 200 mV.

La identificación de los volátiles minoritarios se realizó comparando los espectros de cada compuesto con los de la librería Willey 7N así como mediante los tiempos de retención de patrones sometidos a las mismas condiciones cromatográficas que la muestra. La cuantificación se llevó a cabo mediante la extrapolación en una recta de calibrado obtenida para cada compuesto mediante el empleo de disoluciones patrón a diferente concentración.

3.5.8.2. Análisis de los compuestos volátiles mayoritarios del aroma

3.5.8.2.1. Reactivos. Material y Aparatos

- Disolución de HCl 0,1 N
- Disolución de 4-metil-2-pentanol en etanol al 14 % (v/v)
- CaCO₃
- Centrífuga
- Helio
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 series

3.5.8.2.2. Técnica

Los compuestos volátiles mayoritarios se cuantificaron e identificaron mediante inyección directa de la muestra en el CG.

A 10 mL de muestra se añadió como patrón interno 1 mL de una disolución de 4-metil-2-pentanol al 14% (v/v) de etanol y cuya concentración es 1050 mg/L. Con objeto de alargar la vida útil de la columna se añaden aproximadamente 0,2 gramos de CaCO₃, para eliminar la mayoría del ácido tartárico presente en la muestra. Una vez centrifugada la muestra durante 5 minutos a 300 g, se inyectó 1 µL del sobrenadante en el cromatógrafo de gases.

3.5.8.2.3. Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles mayoritarios y polioles

La identificación y cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases HP 6890 Series II equipado con una columna capilar de sílice fundida CP-Wax 57 CB de 60 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,4 µm de espesor de revestimiento, como detector se empleó un detector de ionización de llama (*FID*, *flame ionization detector*). Las condiciones cromatográficas fueron las descritas por Peinado *et al.* (2004a).

La identificación de los volátiles mayoritarios se realizó comparando los tiempos de retención de patrones sometidos a las mismas condiciones cromatográficas que la muestra. La cuantificación se llevó a cabo mediante la extrapolación en una recta de calibrado obtenida para cada compuesto mediante el empleo de disoluciones patrón a diferente concentración.

3.6. ANÁLISIS SENSORIAL

Para determinar el efecto de las características organolépticas (color, aroma y sabor) sobre la fermentación de los vinos obtenidos estudiados en este trabajo, las muestras se sometieron a un análisis sensorial, siguiendo las indicaciones de la norma UNE 87-020-93 de la Asociación Española de Normalización (AENOR, 1997).

3.6.1. Preparación de las muestras

Las muestras se conservaron en frío y se pusieron a temperatura ambiente una hora antes de realizar la prueba sensorial para acondicionarlas a los 20°C de la sala de cata. Cada muestra se identificó con una clave consistente en tres números escogidos al azar, de manera que no se aportara ninguna información a los catadores. Las claves fueron distintas para cada prueba sensorial. Las dos primeras pruebas discriminatorias consistieron en evaluar el aroma y el sabor de los vinos mediante la utilización de una escala ordinal con tres grados de calidad: indeseable, aceptable y deseable, designando 3 puntos para cada grado según recomienda la norma antes mencionada (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5. Ficha de análisis con escala ordinal empleada para evaluar las propiedades organolépticas de color, aroma y sabor.

Propiedad	C. 1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7
Indeseable	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3	3
Aceptable	4	4	4	4	4	4	4
	5	5	5	5	5	5	5
	6	6	6	6	6	6	6
Deseable	7	7	7	7	7	7	7
	8	8	8	8	8	8	8
	9	9	9	9	9	9	9

C.= Clave

Previamente a la realización del análisis sensorial (las pruebas discriminatorias), el jurado se instruyó con una breve exposición sobre el objetivo de las pruebas y de las normas del procedimiento que debía llevar a cabo, entregando a cada individuo la correspondiente ficha de análisis (**Tabla 3.5**).

El jurado estaba compuesto por 15 catadores al que se le presentó un panel con tres características organolépticas en la sala de cata termostatazada a 20°C, utilizando catavinos homologados, con características de diseño recogidas en la norma UNE 87-022-92 (AENOR, 1997), etiquetados, con sus respectivas claves, y tapados para así impedir la pérdida de las propiedades organolépticas de las muestras. Se utilizaron catavinos de cristal negro (cuando se analizaron aroma y sabor) para evitar la influencia de las sensaciones visuales.

Tabla 3.6. Comparación de las muestras por parejas para establecer diferencias.

Parejas	Clave	¿Hay diferencias?	
Pareja 1	Clave 5-3	SI	NO
Pareja 2	Clave 1-6	SI	NO
Pareja 3	Clave 5-1	SI	NO
Pareja 4	Clave 3-6	SI	NO
Pareja 5	Clave 6-4	SI	NO

El tratamiento de los datos se realizó mediante el cálculo de la distribución de frecuencias y mediana. La tercera prueba consistió en una prueba de comparación por parejas según la norma UNE 87-005-92 (AENOR, 1997) por el método de preferencias mediante la técnica de juicio forzado para establecer si existían diferencias entre las muestras comparadas (**Tabla 3.6**), en la que los catadores debían elegir obligatoriamente una de las dos muestras de la pareja según el modelo bilateral (**Tabla 3.7**) cuyo objetivo fue estudiar la/s muestra/s que prefieren los catadores. Los resultados se trataron estadísticamente.

Tabla 3.7. Comparación por parejas por el método de preferencias mediante la técnica del juicio forzado.

Parejas	Clave	¿Cuál le gustó más?
Pareja 1	Clave 7-8	
Pareja 2	Clave 9-10	
Pareja 3	Clave 11-12	

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existen diferencias significativas entre las variables enológicas y los compuestos del aroma analizados entre los distintos mostos y vinos se realizó un análisis de grupos homogéneos mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión, de STSC, INC (Rockville, MD). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

En cuanto a los resultados de proteómica se expresan como la media \pm desviación estándar (error estándar) de la media. Los efectos de las diferentes condiciones de levadura bioinmovilizada y libre estudiadas se han examinado usando el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Duncan y la t-Student para comparaciones entre medias. Este análisis estadístico se ha realizado usando el programa informático SPSS vs 14.0. Las diferencias fueron consideradas como significativas para $p < 0,05$.



Resultados

4. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y RESULTADOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN

En este bloque se presentan los resultados en función de la estructura de la memoria de esta tesis doctoral planteada en el **Bloque 2. Hipótesis y objetivos**. De modo que se incluyen, por un lado, los resultados de tres artículos publicados en las revistas científicas ya indicadas como copias completas, y por otro, los resultados pendientes de su publicación, según el orden secuencial que se ha establecido en los tres capítulos propuestos.

4.1. CAPÍTULO I: Optimización y caracterización de biocápsulas de levaduras

En el primer apartado del Capítulo I, se indican los resultados que se han publicado con respecto a la optimización y caracterización de las biocápsulas de levadura en la revista científica *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.

El segundo apartado de este capítulo se corresponde con los resultados del estudio proteómico de la levadura en forma libre y coinmovilizada en medio de formación de biocápsulas que están pendientes de su publicación.

4.1.1. Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast

En este apartado se muestran los resultados obtenidos con respecto a los factores que intervienen en el proceso de coinmovilización de la cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* G1 sobre el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* H3 como son temperatura, velocidad de agitación, tiempo, pH y composición del medio.

Bajo ciertas condiciones se induce una simbiosis forzada entre ambos microorganismos sin la necesidad de soportes externos o compuestos químicos de unión. El medio para coinmovilizar estos microorganismos consistió en YNB sin aminoácidos con amonio como fuente de nitrógeno, ácido glucónico como fuente de carbono fácilmente asimilable por el hongo filamentoso pero no por la levadura, tamponado a pH 7, en agitación orbital a 28°C durante unos 7 días.

De este modo, se obtienen “biocápsulas de levadura” que son esferas huecas, elásticas, resistentes y de color crema. El tamaño de las biocápsulas varía dependiendo de la velocidad de agitación y del tiempo de residencia en el medio de formación. Al microscopio electrónico de barrido se puede visualizar que las paredes de dichas biocápsulas están formadas por células de levaduras unidas a las hifas del hongo filamentoso. Al microscopio electrónico de transmisión se puede percibir que las interacciones pueden estar favorecidas por la presencia de un polímero natural excretado por estos microorganismos que actuaría como unión entre ellos. Cuando las biocápsulas

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

se colocan en un medio fermentativo, las células de levadura colonizan e invaden todas las hifas del hongo filamentoso de la biocápsula.

Durante la fermentación el hongo filamentoso muere, quedando como un mero soporte inerte para las células de levadura. Para confirmar y explicar la muerte del hongo se han realizado experimentos de fermentación en tubos de diálisis en los que se ha demostrado que, en efecto, se produce la muerte del hongo durante la fermentación, pero para ello es necesario el contacto físico de célula levadura-hifa.

Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast

Teresa García-Martínez,^a Rafael A. Peinado,^b Juan Moreno,^b Isidoro García-García^c and Juan C. Mauricio^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Under appropriate conditions, *Saccharomyces cerevisiae* and *Penicillium chrysogenum* were found to co-immobilize spontaneously with no need for external support or chemical binder. The main aims were to examine the interaction between yeast cells and fungal hyphae by electron microscopy and the death of the filamentous fungus because of direct contact between both microorganisms.

RESULTS: Immobilization was accomplished by orbitally shaking at 28 °C a culture medium consisting of yeast nitrogen base buffered at pH 7 and containing gluconic acid as an available carbon source for the filamentous fungus not readily used by the yeast. The yeast biocapsules thus obtained were hollow, smooth, elastic, strong, creamy-coloured spheres of variable size depending on the particular shaking rate and time of residence in the formation medium. Biocapsule walls consisted of yeast cells bound to fungal hyphae. Placing the biocapsules in fermentation medium caused yeast cells to colonize and invade all hyphae, thereby causing the fungus to die and remain as a mere support for yeast.

CONCLUSIONS: The death of the fungus was probably effected by the yeast via a cell-hypha contact-mediated mechanism as shown by dialysis experiments. The yeast biocapsules can be reused with no loss of integrity or activity. The proposed immobilization method provides a simple, convenient, inexpensive alternative which affords yeast reuse.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: immobilized cells; *S. cerevisiae*; *P. chrysogenum*; dialysis; fermentation; cell-hypha contact

INTRODUCTION

Immobilization procedures allow cells to be confined in a specific region of space in order to preserve their biocatalytic activity and enable reuse.¹ Among other advantages, cell immobilization facilitates cell separation, affects overall rates of growth and stoichiometry, leads to high cell concentrations within the reactor, may protect against contamination and enables the development of continuous processes.^{2–10}

Cells can be immobilized by natural or artificial means. The latter includes carrier binding, cross-linking and entrapment.^{4,11} On the other hand, some microorganisms can be immobilized spontaneously simply through aggregation into small pellets, flocs, microspheres, mycelia (filamentous fungi and bacteria), biofilms on solid substrates or vellums such as those of acetic bacteria or flor yeasts on wine.^{12–18}

Some microorganisms can be immobilized jointly. Such is the case with *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus*, which were successfully co-immobilized on cellulose supports with a view to their use in the production of ethanol by simultaneous saccharification and fermentation of starch.¹⁹ Similarly, *S. cerevisiae* and *Candida shehatae* yeasts were co-immobilized on layered agar structures for use in the continuous alcoholic fermentation of a mixture of glucose and xylose.²⁰ Also, *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* were co-immobilized for successful

phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants,²¹ and so were *S. cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* for the fermentation and partial ripening of cider.²² These microorganism couples require an external inert support for immobilization. In this work, however, an effective method was developed to accomplish the natural, spontaneous co-immobilization of the flor yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* without the need for an external support or a chemical binder²³ yielding biocapsules of the fungus immobilizing the yeast.

The primary purposes of this work were to examine the interaction between yeast cells and fungal hyphae by electron

* Correspondence to: Juan C. Mauricio, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Edificio Severo Ochoa, Campus Universitario de Rabanales, Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba, Spain. E-mail: mi1gamaj@uco.es

a Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Spain

b Departamento de Química Agrícola y Edafología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Spain

c Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Spain

microscopy and the death of the filamentous fungus during fermentation in dialysis tubes.

EXPERIMENTAL

Microorganisms

The biocapsules studied were obtained from a *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* strain G1 (ATCC: MYA-2451) previously isolated from a biologically aging wine under flor vellum by members of the Microbiology Department of the University of Cordoba (Spain), and a *Penicillium chrysogenum* strain H3 isolated as a filamentous fungus from the environment by the same research group and identified by the Spanish Type Culture Collection (CECT).

Medium and conditions for the production of yeast biocapsules

Biocapsules were obtained by using yeast nitrogen base (YNB, Difco) medium without aminoacids containing 5 g gluconic acid L⁻¹ as carbon source and buffered at pH 7 with sodium and potassium phosphate. 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterilized medium were inoculated with 4×10^6 viable yeast cells mL⁻¹ and spores of *P. chrysogenum* added by an inoculation loop. The flasks were thermostated at 28 °C and shaken at 150 rpm on an orbital shaker from New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA) for 7 days. In this way, spontaneous bioimmobilization in the absence of an external support was accomplished and yeast biocapsules were obtained as a result.²³ Filamentous spheres containing the fungus alone were prepared similarly except that no yeast cells were used. Some additional comments in order to justify these special conditions will be given further in the Discussion section.

Dialysis tube fermentations

In order to study the effect on the co-culture when no direct contact between both microorganisms is allowed at the same time that the growth medium is shared, a series of dialysis experiments were carried out. The dialysis membrane avoids contact between microorganisms but offers no resistance to solutes in the medium. Dialysis tests were conducted by plugging the ends of 15 cm long cellulose dialysis tubes (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) with a molecular weight cut-off of 12 kDa, average flat width 25 mm, and approximate diameter 16 mm with sterile cotton and immersing the tubes in growth medium. Previously, 100 mL of YPD (1% yeast extract, 2% peptone) medium containing 20% (w/v) glucose were autoclaved at 100 °C for 30 min. Then, the dialysis tubes were supplied with 50 mL of YPD and the remaining 50 mL was placed outside. About 30–40 filamentous spheres of *P. chrysogenum* ca. 5 mm in diameter, containing no yeasts and obtained as described above were placed inside the dialysis tube, and *S. cerevisiae* cells were then inoculated outside at a concentration of 4×10^6 cells mL⁻¹ (Fig. 1). A control test was run in parallel by using the same amount of yeast biocapsules into the dialysis tube. The temperature was kept at 28 °C and the dialysis medium shaken for 5 days in both cases. After 5 days of fermentation, the viability of *P. chrysogenum* and *S. cerevisiae* was checked by incubation in a Petri dish containing YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 5% glucose and 2% agar) medium at 28 °C for 72 h. All dialysis tests were performed in triplicate.

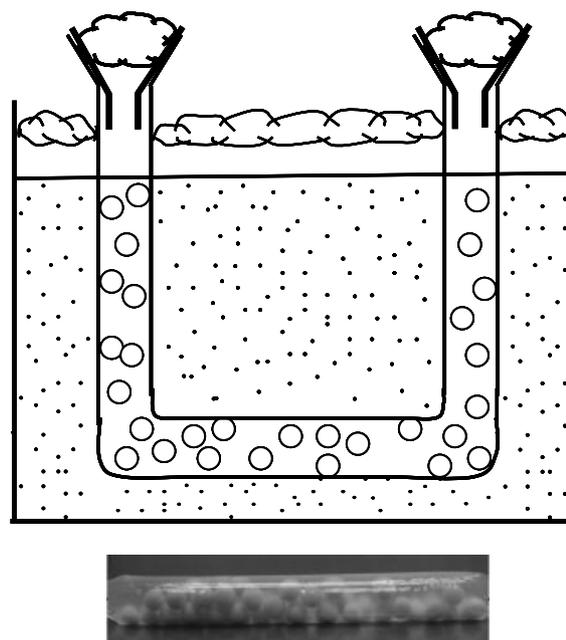


Figure 1. Schematic depiction of fermentation with a dialysis tube. Fungal spheres were placed inside the tube and yeast cells outside. The photograph at the bottom shows a dialysis tube containing yeast biocapsules.

Microscopic study

Yeast biocapsules were examined under electron microscopy. For scanning electron microscopy (SEM), walls from medium-sized biocapsules were dehydrated in an ethanol series and gold-coated using a Sputter Coater Bal-Tec SCD005 (USA). Samples were examined and photographed in a Jeol 6300 scanning electron microscope (Japan).

The samples for transmission electron microscopy (TEM) were biocapsule walls obtained from fresh material and fixed in a mixture of 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol L⁻¹ cacodylate buffer at pH 6.8 for 6–8 h. After washing in the same buffer, the samples were post-fixed in 1% aqueous osmium tetroxide for 1 h, which was followed by washing, dehydration in an ethanol series and embedding in LR White resin. The whole process was conducted at 4 °C in accordance with standard protocols. The resin was polymerized by heating at 60 °C and thin slides obtained, mounted on nickel grids and stained with 4% aqueous uranyl acetate and Reynold's lead citrate. All specimens were viewed and photographed with a Philips EM 300 transmission electron microscope (The Netherlands).

RESULTS AND DISCUSSION

The proposed method involves the spontaneous co-immobilization of a filamentous fungus and a yeast under appropriate conditions leading to forced symbiosis.²³ The specific conditions required are as follows:

- A carbon source readily available by the filamentous fungus but not by the yeast, as gluconic acid. This source difficult the yeast growth (in fact, only one generation was observed) but not the fungus one. If a carbon source as glucose was used an important growth of free yeast is observed resulting a medium no suitable for the biocapsules formation.

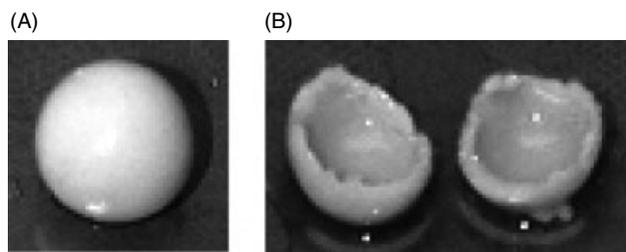


Figure 2. Intact yeast biocapsule (A) and an open biocapsule (B).

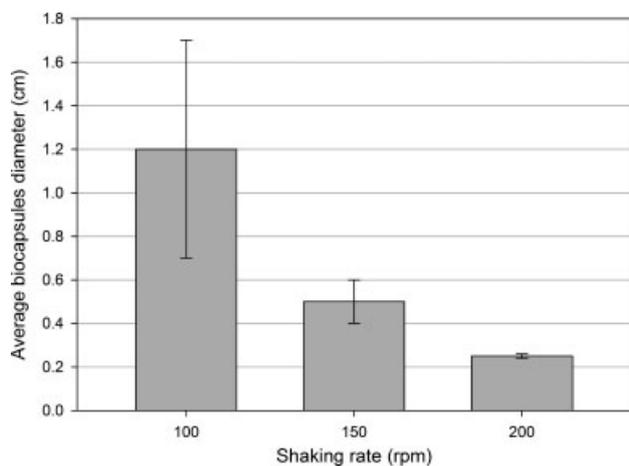


Figure 3. Biocapsules of variable size obtained by orbital agitation at 200, 150 and 100 rpm for 7 days.

- (b) A culture medium buffered at neutral pH. Otherwise, the habitual excretion of acids by the *Penicillium* leads the yeast cells to die, thus producing lax, fibrous and rugged spheres composed only of filamentous fungus (results not shown).
- (c) Continuous stirring to facilitate the formation of spheres and aeration of the medium in order to keep the filamentous fungus alive.

Although it is well known that agitated submerged fungi cultures result in the formation of solid pellets, surprisingly the above conditions enabled spontaneous co-immobilization of *S. cerevisiae* and *P. chrysogenum* in the form of smooth, hollow, elastic spheres. So, the presence of yeasts is apparently necessary to produce this new structure. The resulting product was called 'yeast biocapsules'. Just visually, the formation of biocapsules can be noticed 3 days after inoculation and in 7 days the medium was fully transparent and contained no free yeast cells. At this point the biocapsules were removed from the formation medium. Figure 2 shows a photo of a biocapsule.

The diameter of the biocapsules was found to depend on the length of time they were allowed to form and, especially, the shaking rate. Figure 3 shows three different sizes obtained after 7 days under different orbital agitation conditions. As can be seen, stirring at a rate of 200, 150 and 100 rpm led to the formation of small uniform spheres (average diameter <0.5 cm); mid-sized spheres (average diameter = 0.5 cm); and large spheres (average diameter >0.5 cm), respectively.

One especially interesting finding as regards interactions between the yeast and filamentous fungus was that, as revealed by the micrographs, biocapsule walls consisted of trapped yeasts

bound to fungal hyphae. Also, the biocapsules were hollow and contained free yeast cells inside as revealed by the light microscope.

Figure 4 shows SEM images for the outer wall side of a freshly formed biocapsule exhibiting yeast cells bound to intact fungal hyphae (A); a section of the inner wall containing a greater number of yeast cells (some bound to, and some trapped by, intact hyphae) (B); and the surface of the inner wall side of a biocapsule containing few yeasts bound to, or trapped by, distorted (flattened, amorphous, compacted) hyphae (C). Micrographs (D) to (F) are similar to the previous ones but were obtained from a biocapsule that was used in two fermentation runs; as can be seen, no fungal hyphae remained intact—rather, all were empty and compacted.

Figure 5 illustrates yeast–filamentous fungus interactions at a greater magnification. As can be seen, some hyphae exhibited clefts possibly due to previously released yeast cells, which is suggestive of strong interactions between the two microorganisms. Interactions were also studied by TEM. As can be seen from Fig. 6, the interactions may have been favoured by the presence of a natural polymer released by the microorganisms (Fig. 6(A)); also, interactions between them were enhanced as a result (Fig. 6(B)).

Once formed, the biocapsules were easily removed from the formation medium with a sterile strainer, washed with cold sterile water and placed in a fermentation medium. The yeast cells in the biocapsules grew and invaded and colonized all fungal hyphae, causing important structural alterations in the fungal hyphae (see Fig. 4(D)–4(F)) suggesting fungus death. This last result was checked by conducting separate fermentation tests in dialysis tubes. The tests confirmed that the fungus died during the fermentation process, but this required direct contact between the yeast cells and hyphae. These tests involved alcoholic fermentation with the yeast cells isolated from yeast-free mycelial spheres of the fungus by a dialysis tube; the dialysis membrane in each tube allowed solutes in the fermentation medium to be exchanged while avoiding direct contact between the two microorganisms.

Spheres 5 mm in diameter of the filamentous fungus containing no yeast cells were prepared as described under Materials and Methods prior to the dialysis tests. The fungal spheres were placed inside dialysis tubes and the yeast cells outside. The fermentation medium consisted of YPD broth containing 20% (w/v) glucose and the process was conducted at 28 °C for 5 days (Fig. 1). After fermentation, the dialysis tubes were broken to collect the fungal spheres, which were plated on agar YPD to check their viability. Yeast biocapsules containing both microorganisms were used as control samples in identical fermentation tests.

Figure 7(A) shows a freshly formed, unincubated biocapsule previously used in no fermentation test on agar YPD, and Fig. 7(B) the same biocapsule after incubation for 72 h. As can be seen from Fig. 7(B), both the yeast and the filamentous fungus grew substantially during incubation, which indicates that they were fully active. Figure 7(c) shows the result of 72 h of incubation on agar YPD of a yeast biocapsule previously used in a fermentation process for 5 days. As can be seen, only the yeast exhibited full growth. Finally, Fig. 7(D) shows the result of incubation for 72 h of a yeast-free fungal sphere from a dialysis tube where it was submerged, isolated from the yeast cells by a semi-permeable membrane, in an alcoholic fermenting medium for 5 days. In this case, growth of the filamentous fungus was produced.

The previous results indicate that the filamentous fungus dies during the fermentation process by effect of its direct contact with the yeast cells. If its death was due to the presence of toxins released by the yeast cells in the culture medium, then Fig. 7(D)

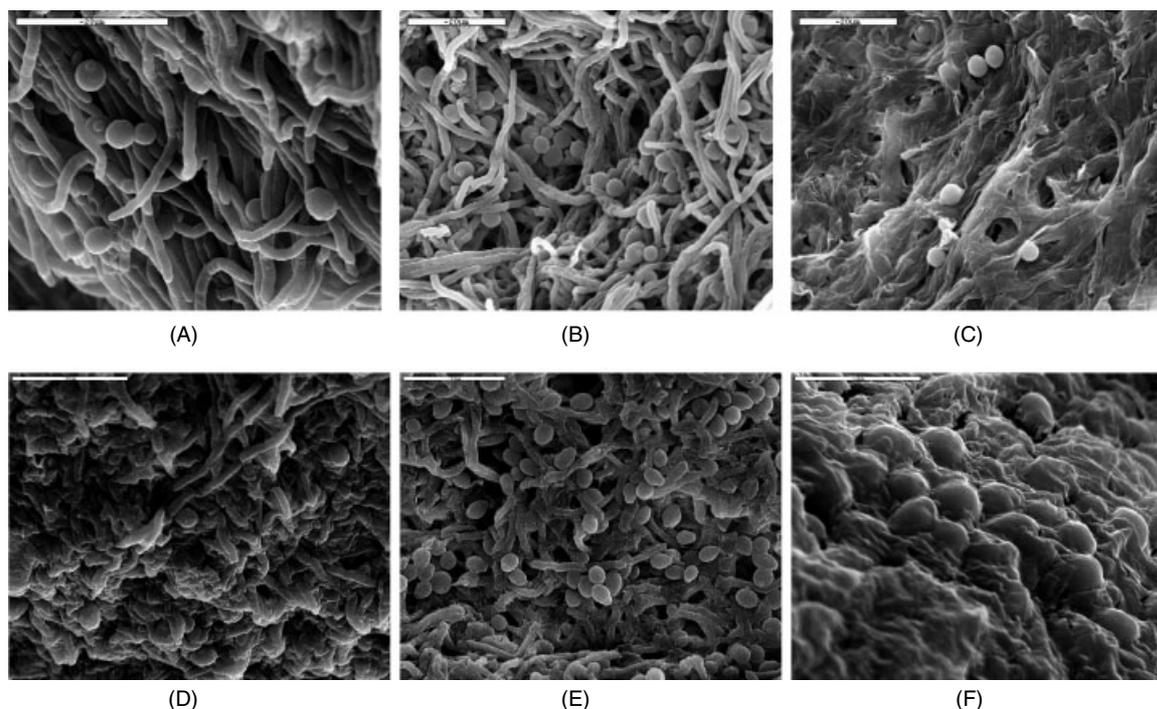


Figure 4. Scanning electron micrographs of wall sections at different depths in two yeast biocapsules. (A) Section of the outer wall side of a fresh biocapsule exhibiting bound yeast cells (spherical structures) and intact hyphae (filamentous structures). (B) Section of the inner wall of a fresh biocapsule exhibiting intact hyphae with yeast cells. (C) Section of the inner wall side of a fresh biocapsule exhibiting yeast cells with amorphous hyphae. (D)–(F) Photographs of the previous three sections in a yeast biocapsule reused in a second fermentation run; unlike (A)–(C), hyphae were no longer intact. Reference bar 20 μm in (A)–(E) and 10 μm in (F).



Figure 5. Scanning electron micrographs illustrating the interactions between yeast cells and fungal hyphae biocapsule walls. The white arrows denote cell–hypha interactions and black arrows hyphal clefts probably due to previous interactions with yeast cells.

would have shown no signs of *Penicillium* growth. Therefore, direct contact between the two microorganisms is seemingly essential for the fungus to die. Also, raising the concentration of yeast cells (results not shown) caused the fungus to die earlier (within 5 days). This was the likely result of yeast cells invading the fungal hyphae. These findings are consistent with those of Nissen *et al.*,^{24,25} who also used dialysis tubes. These authors found early growth arrests in *Kluyveromyces thermotolerans* and *Torulaspora delbrueckii* to be

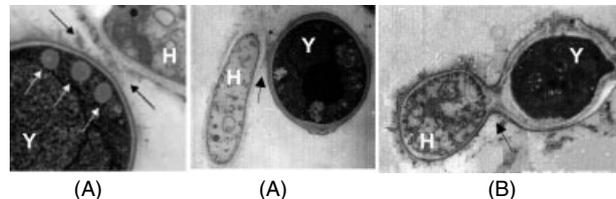


Figure 6. Transmission electron micrographs illustrating the interactions between the two microorganisms in a biocapsule. (Y) Yeast cell. (H) Hypha. (A) Release of a polymer. (B) Enhanced interaction between the two microorganisms.

induced by a cell–cell contact-mediated mechanism dependent on the presence of viable *S. cerevisiae* cells at high concentrations.

Our findings provide the first evidence that yeast cells bound to mould hyphae may cause a filamentous fungus in direct contact with the yeasts to die during fermentation as a result of an increase in the number of yeast cells. In addition to their intrinsic interest, these results are bound to arouse interest in expanding the study of yeast–fungus interactions (bioimmobilization) in some respects including stress conditions, the nature of the binding polymer or proteomics of the biocapsules. It would also be interesting to explore natural co-immobilization mechanisms between other microorganisms and assess their potential biotechnological uses as well as their bio-catalytic activity.

Current immobilization techniques use materials such as cellulose, semi-permeable membranes of synthetic polymers, liposomes, fruit pieces or cereal grains as supports.^{8,26} The originality of the proposed technique is that it exploits the co-immobilization of a filamentous fungus and a flor yeast

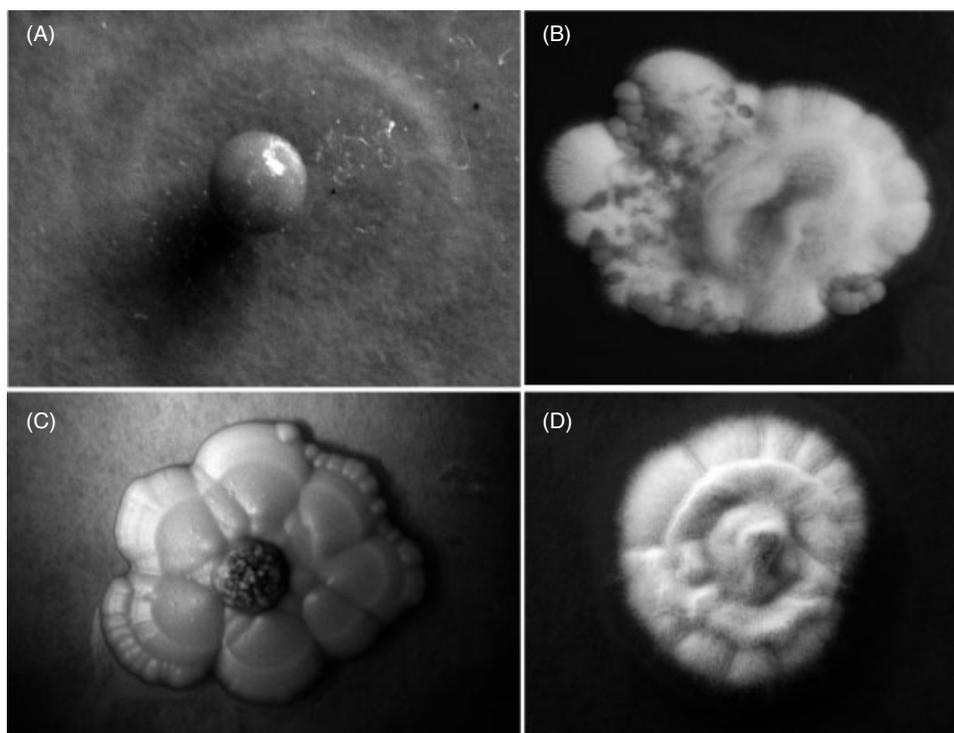


Figure 7. (A) Freshly formed yeast biocapsule in unincubated agar YPD medium; (B) colonies of yeast and fungal mycelium from a freshly formed biocapsule incubated in agar YPD for 72 h; (C) yeast growth of a biocapsule after 72 h of incubation in agar YPD from a fermentation in a dialysis tube in direct contact with yeast cells for 5 days; (D) growth of a fungal mycelium from a fungal sphere incubated in agar YPD for 72 h after fermentation in a dialysis tube without direct contact with yeast cells for 5 days.

without the need for a chemical binder or external support simply by using appropriate conditions to favour a symbiotic action. This is accomplished by supplying a buffered culture medium with a nutrient easily used by the filamentous fungus but not by the yeast and providing appropriate stirring. The fact that one of the microorganisms constitutes the support for the other dispenses with the need for an external support and the associated expenses. Also, the porous structure of a filamentous fungus facilitates the diffusion of nutrients and products in the culture medium, which is another advantage in relation to regular supports.

In summary, the proposed method provides smooth and hollow spheres with walls consisting of fungal hyphae and yeast cells. These 'yeast biocapsules' can be reused with no loss of integrity in several fermentation runs. Interestingly, the filamentous fungus dies during the fermentation process and remains as a mere inert support facilitating subsequent reuse of the biocapsules.

If one considers the high practical significance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the ability to use it in a naturally auto-immobilized form can open new prospects for fermentation processes with substantial technical and economic advantages over traditional fermentation methods based on free cells. The method therefore provides a simple, convenient, inexpensive alternative which affords yeast reuse. Now we have in fact successfully reused yeast biocapsules with no loss of integrity or activity up to 11 times for wine production from natural grape musts (research going on at present). Also, binding and interactions between the two microorganisms are all natural rather than forced on a support such as alginate, carraginate and others,^{8,19,27} this allows the yeast to preserve most of its catalytic activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was co-funded by Spain's Ministry of Science and Innovation (INIA, Grant RTA2008-00056-C02-02) and FEDER.

REFERENCES

- 1 Karel SF, Libicki SB and Robertson CR, The immobilization of whole cells – engineering principles. *Chem Eng Sci* **40**:1321–1354 (1985).
- 2 Margaritis A and Merchant FJA, Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *Crit Rev Biotechnol* **2**:339–393 (1984).
- 3 Stewart GG and Russel I, One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J Inst Brew* **92**:537–558 (1986).
- 4 Webb C, Black GM and Alkinson B, *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems*. The Institution of Chemical Engineers, Rugby (1986).
- 5 Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D and Neufeld RJ, Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit Rev Biotechnol* **14**:75–107 (1994).
- 6 Nigam JN, Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* **80**:189–193 (2000).
- 7 Sakurai A, Nishida Y, Saito H and Sakakibara M, Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *J Biosci Bioeng* **90**:526–529 (2000).
- 8 Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R and Koutinas AA, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* **21**:377–397 (2004).
- 9 Verbelen PJ, Schutter DPD, Delvaux F, Verstrepen KJ and Delvaux FR, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* **28**:1515–1525 (2006).
- 10 Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM and Marchant R, Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Biores Technol* **98**:860–865 (2007).

- 11 Tanaka A and Kawamoto T, Cell and enzyme immobilization, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd edn, ed. by Demain AL, et al ASM Press, Washington, pp. 94–102 (1999).
- 12 Webb C, Fukuda H and Alkinson B, The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. *Biotechnol Bioeng* **28**:41–50 (1986).
- 13 Fontana A, Chraïbi M, Guiraud JP and Ghommidh C, Diffusivity measurement in a flocculating yeast layer. *Biotechnol Techniques* **5**:133–138 (1991).
- 14 Wiczorek A and Michalski H, Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidized bed bioreactor. *FEMS Microbiol Rev* **14**:69–74 (1994).
- 15 Paiva TC, Sato S, Visconti AE and Castro LA, Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Appl Biochem Biotechnol* **57–58**:535–541 (1996).
- 16 Martínez P, Pérez L and Benítez T, Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino Sherry wine. *Am J Enol Vitic* **48**:160–168 (1997).
- 17 Yasuda H, Koga T and Fukuoka T, *In vitro* and *in vivo* models of bacterial biofilms. *Methods Enzymol* **310**:577–595 (1999).
- 18 Gutiérrez P, Roldán A, Caro I and Pérez L, Kinetic study of the velum formation by *Saccharomyces cerevisiae* (*beticus* ssp.) during the biological aging of wines. *Process Biochem* **45**:493–499 (2010).
- 19 Fujii N, Oki T, Sakurai A, Suye S and Sakakibara M, Ethanol production from starch by immobilized *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus* using cellulose carriers. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**:52–57 (2001).
- 20 Lebeau T, Jouenne T and Junter GA, Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by coimmobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**:309–313 (1998).
- 21 El-Komy HMA, Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol Biotechnol* **43**:19–27 (2005).
- 22 Scott JA and O'Reilly AM, Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem* **31**:111–117 (1996).
- 23 Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, Gonzalez-Reyes JA, Ortega JM and Mauricio JC, Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb Technol* **40**:79–84 (2006).
- 24 Nissen P, Nielsen D and Arneborg N, Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast* **20**:331–341 (2003).
- 25 Nissen P and Arneborg N, Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **180**:257–263 (2003).
- 26 Kandyli P, Manousi ME, Bekatorou A and Koutinas AA, Freeze-dried wheat supported biocatalyst for low temperature wine making. *LWT-Food Sci Technol* **43**:1485–1493 (2010).
- 27 García I, Martín A, Ortega JM and Chica A, Kinetic study of the production of ethanol with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on berl saddles. *Chem Eng J* **42**:B1–B7 (1989).

4.1.2. Aproximación al estudio proteómico comparativo entre *Saccharomyces cerevisiae* en forma libre y coinmovilizada con *Penicillium chrysogenum*

En este apartado se incluye un estudio realizado del perfil proteómico de la cepa G1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en forma libre (L) y en forma coinmovilizada (B) con la cepa H3 de *Penicillium chrysogenum*. Dicho trabajo consistió en el análisis general de expresión proteica mediante el uso combinado de electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MS), a partir de la obtención de los extractos proteicos de ambos formatos en el medio de formación de biocápsulas. A continuación, se realizó el análisis de los gels con un programa informático adecuado con el objetivo de identificar y clasificar las proteínas de interés seleccionadas.

En la **Figura 4.1** se muestran los patrones de los gels bidimensionales de la cepa G1 de *S. cerevisiae* en ambas condiciones estudiadas después de 7 días en el medio de formación de biocápsulas.

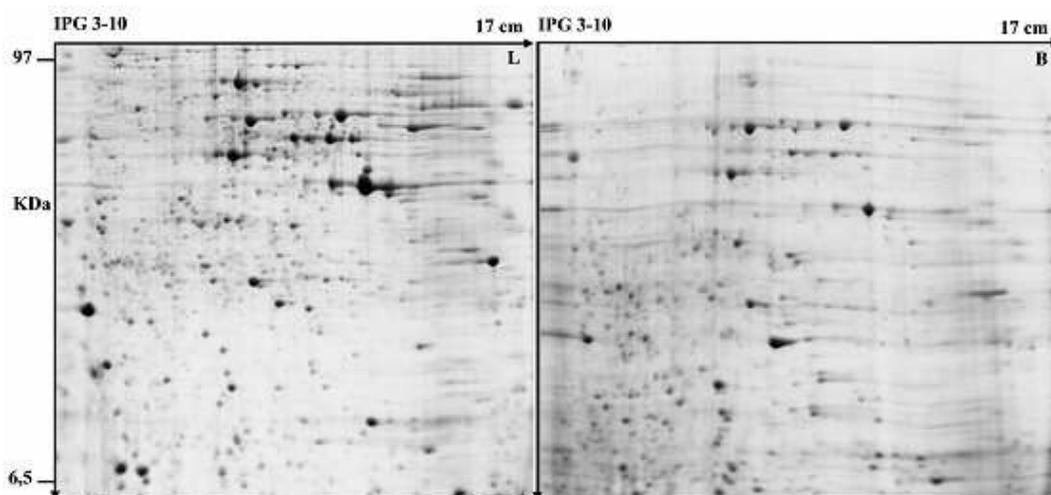


Figura 4.1. Geles 2-DE de proteínas de células de levadura libres (L), imagen izquierda, y de levaduras coinmovilizadas (B), derecha. Las proteínas se separaron por IEF y SDS-PAGE al 13% de poliacrilamida, los gels se tiñeron con CBB-250.

El número de gels realizados por tratamiento fue 3, que se correspondieron con 3 repeticiones biológicas independientes para cada condición ensayada, así que se obtuvo un total de 6 gels. La superposición de todos ellos dio lugar a lo que se conoce como “gel máster”, gel virtual que contiene todas las manchas proteicas (*spots*) detectadas individualmente pertenecientes a todos los gels de un mismo experimento en las condiciones estudiadas (**Figura 4.2**). Como gel de referencia se eligió el gel de células de levadura en forma libre, de modo que los otros gels se compararon con respecto a éste. Las manchas proteicas que aparecen marcadas con un círculo fueron las que presentaron una expresión diferencial, tras una comparación y análisis de los *spots* en ambas condiciones, tanto cualitativa como cuantitativamente.

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

4.1.2.1. Análisis de expresión proteica en levadura libre y coinmovilizada

Para el análisis cuantitativo de las proteínas se empleó el programa PDQuest (Bio-Rad). Las proteínas consideradas como diferentes entre los dos grupos experimentales siguieron los siguientes criterios:

- Los *spots* considerados para cada tratamiento aparecieron en al menos dos de las tres réplicas que había para cada condición.
- El doble o más del doble de cambio de intensidad (*fold change*) de un *spot* en una condición experimental con respecto a la otra.

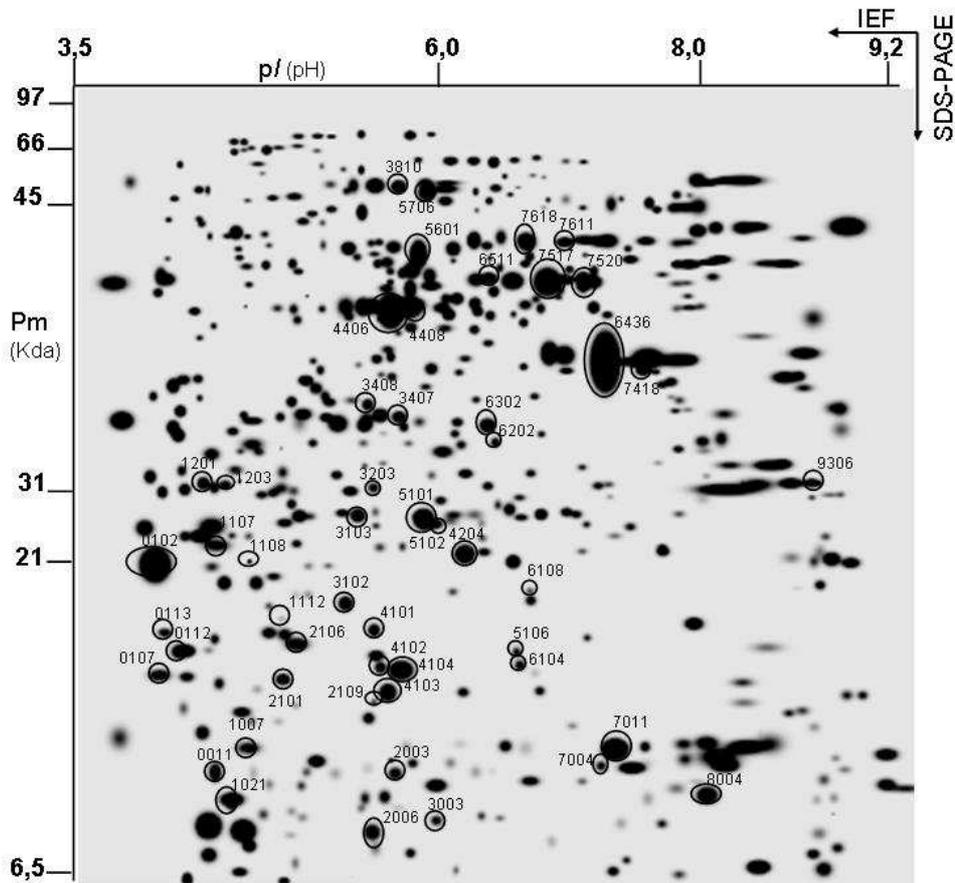


Figura 4.2. Gel “máster” representativo del proteoma de la levadura *S. cerevisiae* G1 obtenido por 2-ED. Se detallan todos los *spots* que muestran una expresión diferencial cualitativa y cuantitativa en células de levadura en forma libre y coinmovilizada marcados con un círculo.

Los resultados mostrados se expresan como diferencias cualitativas y/o cuantitativas de expresión proteica. Para las diferencias cualitativas se realizó un análisis cualitativo de los *spots* que están presentes en un grupo de geles de un tratamiento y ausentes en el otro grupo de geles del otro tratamiento, y/o a la inversa. Para las diferencias cuantitativas se realizó un análisis cuantitativo estadísticamente significativo, y hacen referencia a la cantidad de proteína expresada que está presente en ambos tratamientos o condiciones estudiadas.

La **Figura 4.3** muestra los gels bidimensionales preparativos correspondientes a 500 μg de proteína total obtenidos de la cepa *S. cerevisiae* G1 en forma libre y coinmovilizada, antes de realizar el análisis con el programa PDQuest.

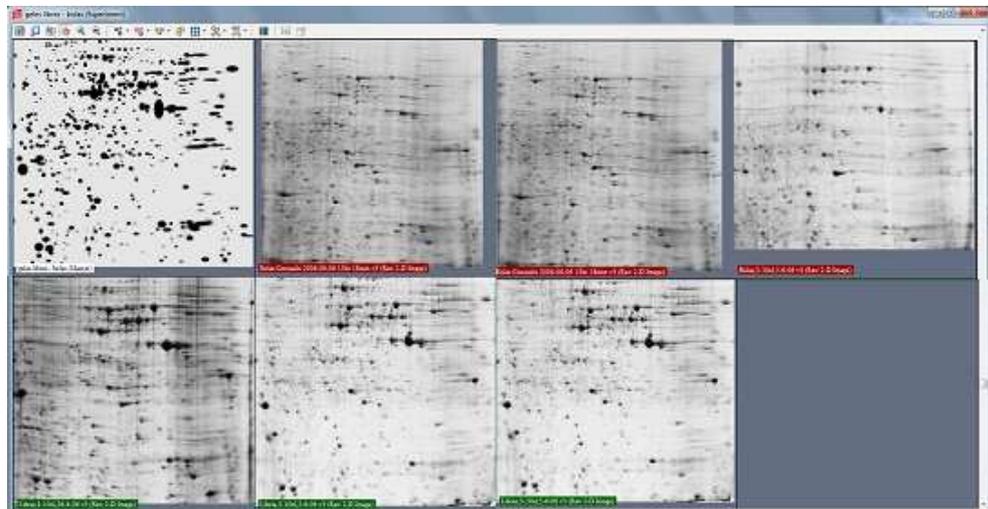


Figura 4.3. Ventana del perfil de expresión de proteínas de *S. cerevisiae*. Arriba: a la izquierda aparece el gel “máster”, y a continuación las tres réplicas de la condición experimental (levadura coinmovilizada). Abajo: las tres réplicas de la condición control (levadura libre).

Tras el análisis de comparación de las imágenes de los gels se obtuvieron un total de 386 ± 9 *spots* en el caso de la levadura coinmovilizada, y 483 ± 4 en el caso de la levadura en forma libre y un total de 524 *spots* entre ambas condiciones (**Figura 4.4**). Cada *spot* tiene asignado automáticamente por el programa informático un número que se conoce como *SSP* (*Standard spot number*).

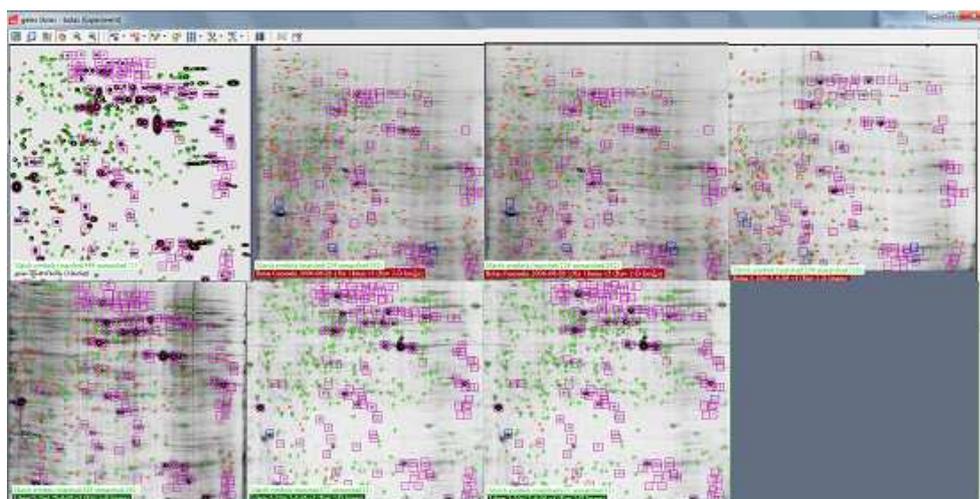


Figura 4.4. Ventana de identificación de los *spots* con su SSP tras un análisis de comparación con el *software* PDQuest.

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

De los 524 *spots*, sólo 51 mostraron diferencias en cuanto a la expresión, correspondientes tanto a diferencias cualitativas como cuantitativas entre ambas condiciones de estudio, que se seleccionaron para el análisis de los perfiles proteicos y que fueron finalmente identificados. Este análisis se resume en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Resultado global del análisis total mediante el *software* PDQuest de los geles 2-DE obtenidos para ambas condiciones.

Manchas proteicas (<i>spots</i>)	Analizados PDQuest	Identificados MS	
Cambios Cualitativos	112	8	1 en Levadura libre 7 en Coinmovilizada
Cambios Cuantitativos	412	43	36 con diferencias significativas $p < 0,05$ 7 no significativos
TOTAL	524	51	

En cuanto a las proteínas que presentaron cambios cuantitativos se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa SPSS v.13.0, se aplicó el método de comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones *a posteriori* y asumiendo que las varianzas son iguales se siguió el procedimiento Duncan y se realizó el test de homogeneidad de varianza. Estos resultados muestran que 36 *spots* presentaron diferencias cuantitativas con $p < 0,05$, a continuación se realizó un análisis cuantitativo con estos spots para mostrar las proteínas que varían al menos 2 veces su intensidad o la cantidad de proteína expresada. Entonces, éstas serían las proteínas que tienen un *fold change* $\geq 2,0$. Se calculó a partir de los volúmenes medios normalizados de ambas condiciones. Esto queda reflejado en las **Figuras 4.8 y 4.9**.

En la **Tabla 4.2** se detallan las 8 manchas proteicas referidas a cambios cualitativos y las 36 manchas proteicas que mostraron diferencias cuantitativas después de aplicar el análisis de la varianza ANOVA y una separación de las medias por el método Duncan.

Tabla 4.2. *Spots* que mostraron cambios cualitativos (azul) y cambios cuantitativos (negro) estadísticamente significativos.

SSP	SSP	SSP	SSP	SSP
5706	0011	2109	4104	6436
0113	0102	3102	4406	6511
1007	0107	3103	5101	7004
1107	0112	3203	5106	7011
1108	1021	3407	5601	7418
1112	1201	3408	6104	7517
2106	1203	3810	6108	7618
4103	2003	4101	6202	8004
	2006	4102	6302	9306

A continuación, en la **Tabla 4.3** se muestran los valores de peso molecular y punto isoeléctrico de las diferencias cualitativas que aparecen sólo en la condición citada. En la **Tabla 4.4** se detallan estos dos parámetros de los *spots* que presentaron diferencias cuantitativas al 95%.

Tabla 4.3. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las manchas proteicas que presentaron diferencias de expresión cualitativas.

DIFERENCIAS CUALITATIVAS					
Células Libres			Células Coinmovilizadas		
<i>spot</i>	Pm (KDa)	pI	<i>spot</i>	Pm (KDa)	pI
5706	62,77	5,88	0113	17,93	4,42
			1007	14,87	4,96
			1107	20,66	4,78
			1108	20,13	4,97
			1112	18,33	5,15
			2106	17,60	5,24
			4103	16,28	5,69

Tabla 4.4. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las manchas proteicas que presentaron diferencias de expresión cuantitativas con un nivel de significación de $p < 0,05$.

DIFERENCIAS CUANTITATIVAS					
Células Libres			Células Coinmovilizadas		
<i>spot</i>	Pm (KDa)	pI	<i>spot</i>	Pm (KDa)	pI
0102	20,01	4,16	0011	11,70	4,77
3102	18,80	5,48	0107	16,74	4,29
3810	62,77	5,88	0112	17,39	4,57
4406	39,98	5,70	1021	37,60	4,86
5601	17,38	5,84	1201	24,72	4,70
6302	30,76	6,10	1203	24,57	4,83
6436	35,64	6,43	2003	42,72	6,03
6511	43,07	6,11	2006	12,00	5,91
7011	14,84	6,45	2109	16,01	5,62
7418	34,91	6,61	3103	21,90	5,54
7517	42,70	6,27	3203	23,34	5,62
7618	48,96	6,21	3407	31,42	5,74
9306	24,77	8,31	3408	32,27	5,59
			4101	18,01	5,62
			4102	16,95	5,65
			4104	16,88	5,75
			5101	21,64	5,87
			5106	17,38	6,18
			6104	17,01	6,19
			6108	18,18	6,22
			6202	28,85	6,12
			7004	14,45	6,41
			8004	15,02	7,25

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

El intervalo de las masas moleculares (Pm) de todas las manchas proteicas analizadas fue entre 6,5 y 97 KDa, y el de los puntos isoelectricos (pI) entre 3,5 y 9,2. La mayoría de las manchas proteicas en las que se detectaron diferencias presentaron una masa molecular comprendida entre 11,70 y 62,77 y un punto isoelectrico entre 4,16 y 8,31. En resumen, de todas las manchas proteicas analizadas (524), 51 presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los dos grupos de condiciones de estudio y fueron las proteínas totales analizadas e identificadas. Tras aplicar el análisis estadístico, 43 mostraron diferencias cuantitativas, es decir, un 84% del total fueron diferentes en cuanto a su intensidad de *spot*. De ellos, 36 correspondieron a un 84% de proteínas con diferencias cuantitativas con un nivel de significación de 0,05. El resto, 8, presentaron diferencias cualitativas que se correspondieron con el 19% del total de las proteínas analizadas e identificadas, como muestra la **Figura 4.5**.

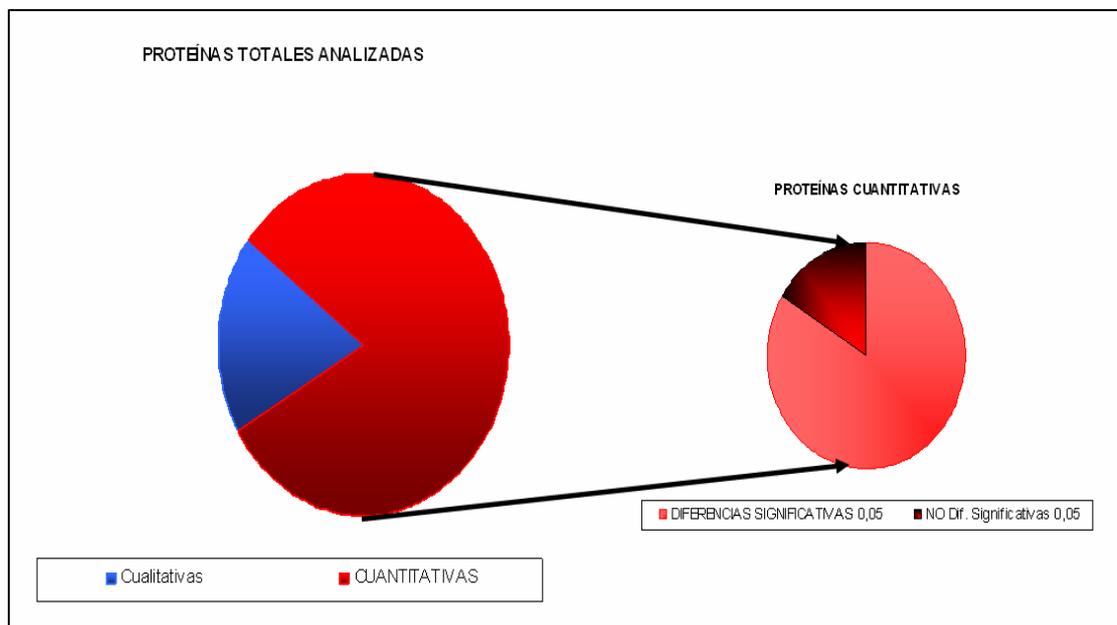


Figura 4.5. Porcentaje de las proteínas totales analizadas.

En la **Figura 4.6** se muestra la imagen de uno de los geles obtenidos por electroforesis bidimensional correspondiente a las levaduras en forma libre (L). Se señala la localización de los *spots* analizados según correspondan con diferencias cualitativas o cuantitativas.

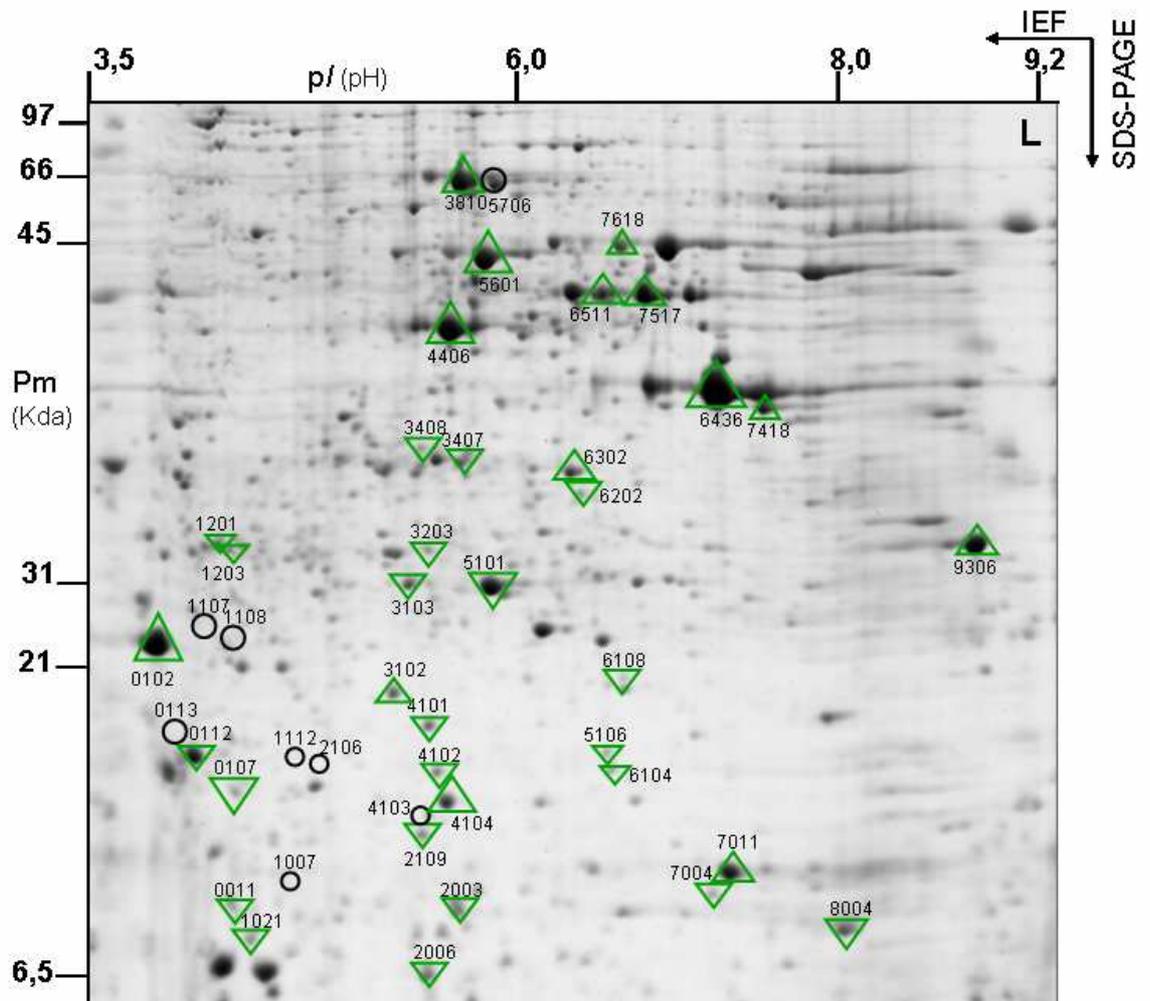


Figura 4.6. Localización de los *spots* analizados en uno de los geles con proteínas de levadura en forma libre. Sobre la imagen se muestran los *spots* analizados marcados con un círculo: indican los *spots* que aparecen y desaparecen en esta condición de estudio (diferencias cualitativas). Triángulo verde: indican los *spots* que están presentes en las dos condiciones (diferencias cuantitativas), si el nivel de expresión ha aumentado están señalados con el vértice hacia arriba, si ha disminuido el vértice está hacia abajo en la forma libre con respecto a la levadura en forma coinmovilizada.

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

En la **Figura 4.7** se representa uno de los geles obtenidos por electroforesis bidimensional correspondiente a las levaduras en forma coinmovilizada (B). Las diferencias que hubo con respecto al gel control, las levaduras en forma libre, aparecen marcadas según correspondan con diferencias cualitativas o cuantitativas.

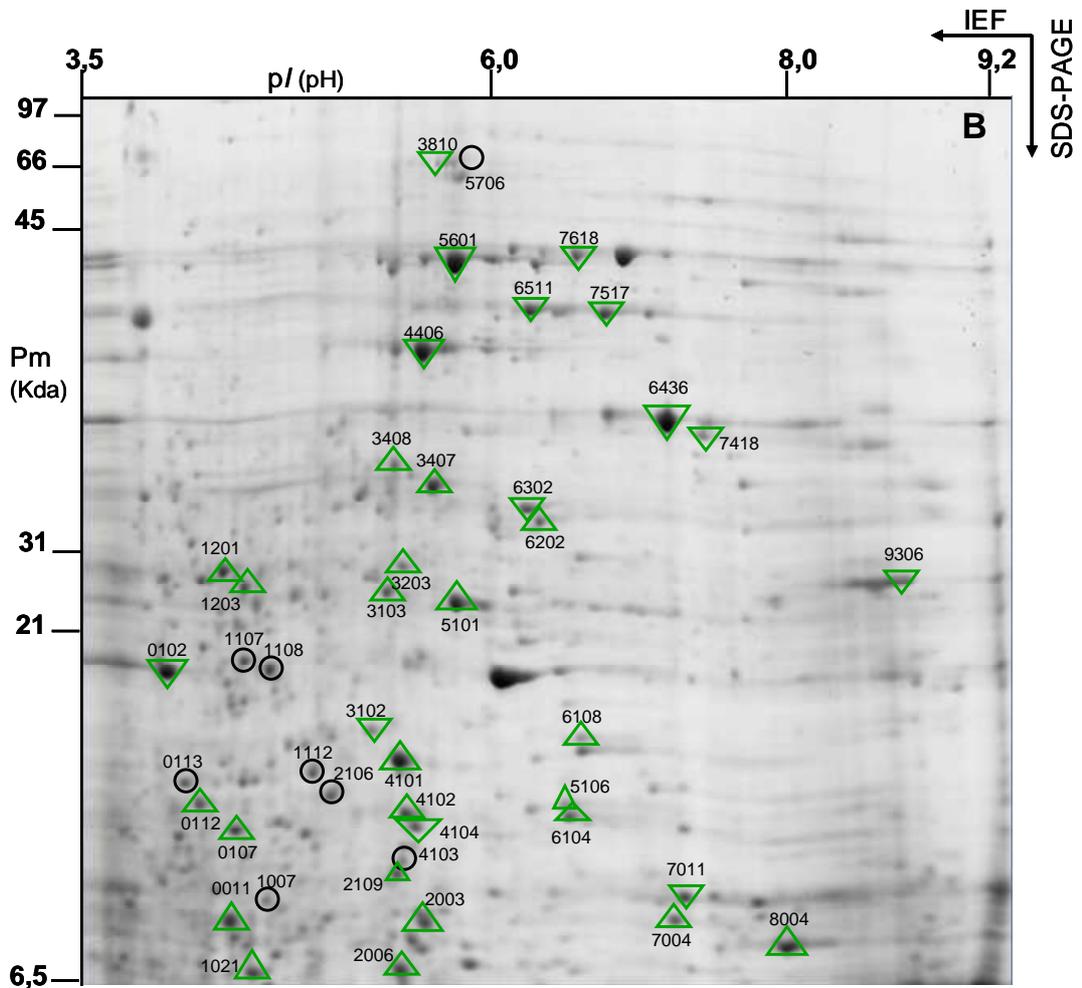


Figura 4.7. Localización de los *spots* analizados en uno de los geles con proteínas de levadura en forma coinmovilizada. Sobre la imagen se muestran los *spots* analizados marcados con un círculo: indican los *spots* que aparecen y desaparecen en esta condición de estudio (diferencias cualitativas). Triángulo verde: indican los *spots* que están presentes en las dos condiciones (diferencias cuantitativas), vértice hacia arriba representa los *spots* cuya expresión ha aumentado en la forma coinmovilizada con respecto a la levadura en forma libre, vértice hacia abajo corresponden a *spots* cuya expresión ha disminuido en esta condición biológica.

El perfil de expresión indica la intensidad de cada mancha proteica. La intensidad de cada *spot* se cuantificó como la media de la intensidad de la mancha proteica en los tres geles de cada tratamiento en unidades arbitrarias de densidad. Con estos valores se construyó un histograma en el que se representa la intensidad del *spot* en células libres (Figura 4.8.). La altura de cada barra está determinada por el volumen normalizado del *spot* de la condición control (L) con respecto a la experimental (B).

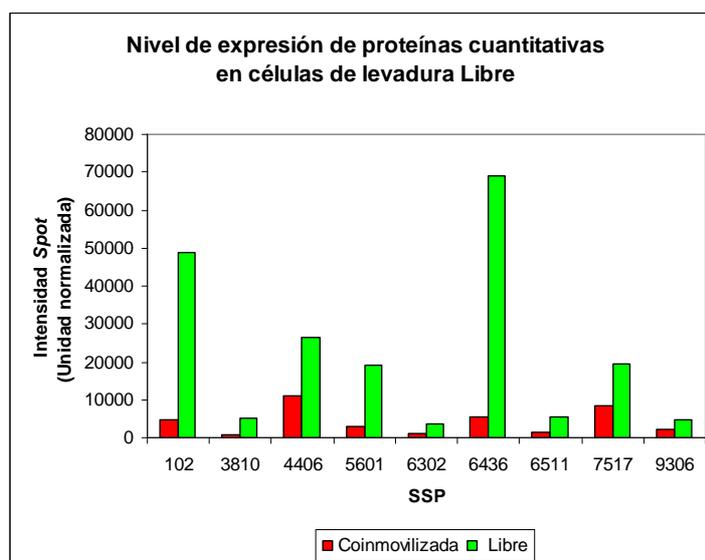


Figura 4.8. Histograma que representa la intensidad de cada mancha proteica existente en la levadura libre de las proteínas cuantitativas que son estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y con un *Fold change* $\geq 2,0$.

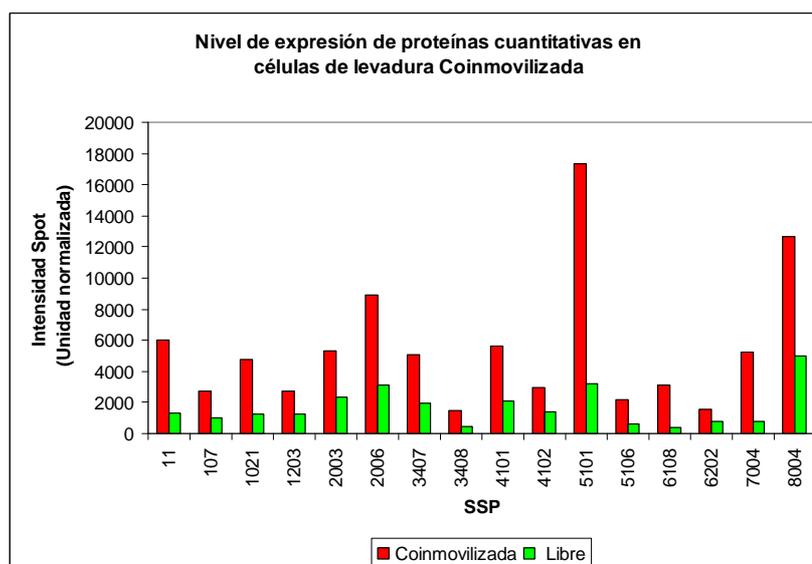


Figura 4.9. Histograma que representa la intensidad de cada mancha proteica existente en la levadura coinmovilizada de las proteínas cuantitativas que son estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y con un *Fold change* $\geq 2,0$.

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

Los niveles de intensidad de cada mancha se normalizaron expresando la intensidad de cada proteína como la proporción respecto a la intensidad total de todas las proteínas presentes en el gel. Los valores medios y los coeficientes de variación de los puntos de diferencia (en expresión o presencia/ausencia) fueron calculados con el mismo programa informático. Las coordenadas fueron expresadas en relación a un punto de referencia en cada gel de dos dimensiones.

El histograma de la **Figura 4.9** representa la intensidad de los *spots* en células de levadura en forma coinmovilizada. La altura de cada barra está determinada por el volumen normalizado del *spot* de la condición experimental (B) con respecto al control (L).

5.1.2.2. Identificación de proteínas en las dos condiciones estudiadas

La identificación de proteínas por espectrometría de masas es un paso esencial en los estudios proteómicos y normalmente se consigue por la masa de las huellas peptídicas (*PMF*). Es una técnica muy utilizada por ser un análisis rápido y de bajo coste, por su alta sensibilidad y por ser aplicable a un gran número de muestras, aunque también presenta algunas limitaciones como que las proteínas deben presentar un alto grado de homología con proteínas ya identificadas en la base de datos, no es aplicable a proteínas de bajo peso molecular (< 10 KDa), ni a proteínas con alto número de modificaciones, entre otras.

Se ha utilizado un programa informático cuyo motor de búsqueda es MASCOT para la comparación de los listados de masas de los péptidos experimentales con MALDI-TOF con las masas de péptidos de digestiones teóricas de proteínas recogidas en las bases de datos (*Swiss-Prot, UniProtKB*). El programa genera una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan una mayor probabilidad de corresponderse con la identidad de las proteínas analizadas. El programa informático muestra en la primera posición de la lista la proteína contenida en la base de datos utilizada que mayor similitud posee con la proteína analizada. Esta similitud se basa en la comparación de los listados de masas obtenidos mediante MALDI-TOF.

Los motores de búsqueda ordenan las proteínas identificadas asignándoles una puntuación en función del número de coincidencias. Para asignar una identificación lo más fiable posible a cada una de las proteínas analizadas se aplican los criterios ya indicados en el **Bloque 3. Metodología (Apartado 3.4.6)**.

En este estudio, además, se ha tenido en cuenta la comparación de los datos de los pesos moleculares y puntos isoelectrónicos teóricos y experimentales obtenidos para cada una de las posiciones que ocupan las proteínas en los geles bidimensionales para una mejor identificación.

Los *spots* seleccionados para su identificación mediante MALDI-TOF se extrajeron de los respectivos geles y se analizaron en el Servicio de Proteómica del SCAI, de la Universidad de Córdoba. Las **Tablas 4.5, 4.6 y 4.7** recogen todos los datos relativos al análisis e identificación de cada una de las proteínas correspondiente a cada *spot*.

En la **Tabla 4.5** se muestra sólo una proteína identificada obtenida que presenta diferencia cualitativa, puesto que se encuentra sólo en la condición de células de levadura en forma libre.

Tabla 4.5. Proteína que mostró diferencia cualitativa, estaba presente sólo en geles procedentes de la levadura Libre.

SSP spot	Nombre proteína (gen)	NºAcceso (Swiss Prot, UniProtKB)	Pm/pI Experimental (Teórico)	Puntuación/ Péptidos identificados	Protein score.C.I.
5706	Aldehído deshidrogenasa K ⁺ , mitocondrial (ALD4)	P46367	62,77/5,88 (56,97/6,31)	629/31	100

En la **Tabla 4.6** se muestran las proteínas identificadas obtenidas que presentan diferencias cualitativas que se encuentran sólo en la condición de levadura coinmovilizada.

Tabla 4.6. Proteínas que mostraron diferencias cualitativas, que estaban presentes sólo en geles procedentes de la levadura coinmovilizada.

SSP spot	Nombre proteína (gen)	NºAcceso (Swiss Prot, UniProtKB)	Pm/pI Experimental (Teórico)	Puntuación/ Péptidos identificados	Protein score.C.I.
0113	Proteína GRE1 (GRE1)	Q08969	17,93/4,42 (19,01/4,55)	79/2	99,999
1007	Proteína de unión a una sola hebra ADN (GBP2)	P25555	14,87/4,96 (49,04/5,95)	48/9	99,283
1107	Espermina sintasa (SPE4)	Q12455	20,66/4,78 (34,35/5,01)	43/11	99,989
1108	ATPasa vacuolar	P17255	20,13/4,97 (118,63/5,83)	46/10	99,899
1112	Proteína de reparación del ADN RAD50 (RAD50)	P12753	18,33/5,15 (15,30/5,78)	45/14	99,468
2106	Guanilato quinasa (GUK1)	P15454	17,60/5,24 (20,68/6,63)	54/6	99,798
4103	Proteína de unión a ARN (SBP1)	P10080	16,28/5,69 (33,02/5,48)	34/6	<u>82,811</u>

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

En la **Tabla 4.7** se recogen las proteínas que se han identificado y que presentan diferencias cuantitativas significativas al 95% y cuyo nivel de expresión es $\geq 2,0$, con lo cual estas proteínas como mínimo duplican su expresión en células de levadura libre con respecto a la inmovilizada.

Tabla 4.7. Proteínas cuantitativas en células de levadura Libres estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con un *Fold change* $\geq 2,0$ y un *Protein score C.I.* $> 99,899\%$.

SSP spot	Nombre proteína (gen)	Nº Acceso (Swiss Prot, UniProtKB)	Pm/pI Experimental (Teórico)	Puntuación / Péptidos identificados	Cambio intensidad (Fold change)
0102	Proteína secretada protoplasto (PST2)	Q12335	20,01/4,16 (20,96/5,46)	114/7	10,5
3810	Piruvato descarboxilasa (PDC1)	P06169	62,77/5,88 (61,68/5,80)	536/19	8,4
4406	Amino-desoxi-corismato liasa (ABZ2)	Q03266	39,98/5,70 (22,36/5,50)	39/8	2,4
5601	Enolasa 2 (ENO2)	P00925	17,38/5,84 (46,94/5,67)	178/20	6,4
6302	Alcohol deshidrogenasa2 (ADH2)	P00331	30,76/6,10 (37,03/6,26)	81/11	3,1
6436	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 3 (TDH3)	P00359	35,60/6,40 (35,83/6,46)	100/12	12,7
6511	Alcohol deshidrogenasa1 (ADH1)	P00330	43,07/6,11 (37,28/6,21)	107/13	4,2
7517	Alcohol deshidrogenasa1 (ADH1)	P00330	42,70/6,27 (37,28/6,21)	170/18	2,3
9306	Fosfoglicerato mutasa1 (GPM1)	P00950	29,77/8,31 (26,40/8,27)	366/22	2,2

La **Tabla 4.8** muestra las proteínas que se han identificado y que presentan diferencias cuantitativas significativas al 95% y cuyo nivel de expresión es $\geq 2,0$ (*fold change*).

Tabla 4.8. Proteínas cuantitativas en células de levadura Coinmovilizadas estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y con un *Fold change* $\geq 2,0$ y un *protein score C.I.* $> 99,899\%$.

SSP <i>spot</i>	Nombre proteína (gen)	NºAcceso (<i>Swiss Prot</i> , <i>UniProtKB</i>)	Pm/pI Experimental (Teórico)	Puntuación / Péptidos identificados	Cambio intensidad (<i>Fold change</i>)
0011	Proteína caja F COS111(<i>COS111</i>)	P38308	11,700/4,77 (10,50/9,65)	40/11	4,4
0107	Ribonucleasa P (<i>POP3</i>)	P53833	16,74/4,29 (22,61/9,59)	44/6	2,7
1021	Proteína SCP160 (<i>SCP160</i>)	P06105	37,60/4,86 (73,87/6,05)	43/10	3,8
1203	Fructosa-bisfosfato aldolasa (<i>FBA1</i>)	P14540	24,57/4,83 (39,74/5,51)	60/8	2,1
2003	Enolasa 1 (<i>ENO1</i>)	P00924	42,72/6,03 (19,11/5,01)	48/8	2,2
2006	Factor de Pre- empalme CWC2 (<i>CWC2</i>)	Q12046	12,00/5,91 (38,74/7,09)	23/5	2,8
3407	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa 3 (<i>TDH3</i>)	P00359	31,42/5,74 (35,83/6,46)	100/12	2,5
3408	Factor elongación 2 (<i>EFT1</i>)	P32324	32,270/5,59 (93,686.4/5,92)	60/13	3,1
4101	Fructosa-bisfosfato aldolasa (<i>FBA1</i>)	P14540	18,01/5,62 (39,88/5,51)	195/8	2,6
4102	Fructosa-bisfosfato aldolasa (<i>FBA1</i>)	P14540	16,95/5,65 (39,88/5,51)	148/11	2,1
5101	Proteína ribosomial 60S L21-A (<i>RPL21-A</i>)	Q02753	21,64/5,87 (13,61/10,25)	30/4	5,4
5106	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa 3 (<i>TDH3</i>)	P00359	17,38/6,18 (35,83/6,46)	54/6	3,4
6108	Glutamil-ARNt sintetasa (<i>GUS1</i>)	P46655	18,18/6,22 (15,80/9,169)	15/2	8,2
6202	Golgin IMH1 (<i>IMH1</i>)	Q06704	28,85/6,12 (10,53/5,52)	59/14	2,1
7004	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa 3 (<i>TDH3</i>)	P00359	14,45/6,41 (35,83/6,46)	136/76	7,0
8004	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa 3 (<i>TDH3</i>)	P00359	15,02/7,25 (35,83/6,46)	131/4	2,5

De los 51 *spots* analizados e identificados, se descartaron un total de 18 por no arrojar resultados concluyentes. En cambios cuantitativos se descartaron 7 por no presentar diferencias significativas ($p < 0,05$) y 11 cuando se aplicó el cambio de intensidad $\geq 2,0$ a los *spots* que presentaron diferencias significativas.

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

4.1.2.3. Clasificación funcional de las proteínas identificadas

Las proteínas identificadas en ese trabajo pueden ser englobadas en distintas categorías de acuerdo a su función biológica.

El conjunto de las identificaciones obtenidas en los diferentes geles bidimensionales realizados procedentes de células de levadura libre con respecto a coinmovilizadas, que son significativas ($p < 0,05$) y con un nivel de expresión de ≥ 2 , se puede agrupar en dos grupos funcionales diferentes: respuesta a estrés y metabolismo de carbohidratos (**Tabla 4.9.**). La respuesta a estrés puede ser debida a que las levaduras se encuentran en un medio pobre, no fermentativo. La segunda función biológica, posiblemente, se deba a la procedencia de las células del inóculo, debido a una actividad enzimática residual puesto que las levaduras en estas condiciones no llegaron a dividirse o se dividieron sólo una vez.

Tabla 4.9. Proteínas identificadas agrupadas según su función y/o proceso en el que participa, SSP, denominación, abreviatura utilizada y localización dentro de la célula de levadura en forma Libre.

FUNCIÓN BIOLÓGICA	SSP	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ABREVIATURA (nº Acceso)	ORGÁNULO CELULAR
Respuesta a estrés	0102	Proteína secretada de protoplasto	Q12335	Mi
	5706	Aldehído deshidrogenada mitocondrial	P46367	Mi
Metabolismo carbohidratos	3810	Piruvato descarboxilasa	P06169	C,N
	4406	Amino-desoxi-corismato liasa	Q03266	C
	5601	Enolasa 2	P00925	C
	6302	Alcohol deshidrogenasa2	P00331	C
	6436	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P00359	C
	6511	Alcohol deshidrogenasa1	P00330	C
	7517	Fosfoglicerato mutasa 1	P00950	C
	9306			

N: Núcleo; C: Citoplasma; Mi: Mitocondria

SSP: proteínas cuantitativas, SSP: proteínas cualitativas

En cuanto a las identificaciones obtenidas en los diferentes geles bidimensionales realizados en células de levadura coinmovilizada con respecto a libres, que son significativas ($p < 0,05$) y con un nivel de expresión de ≥ 2 , se pueden agrupar de acuerdo a nueve grupos funcionales diferentes (**Tabla 4.10.**).

El primer grupo está formado por proteínas que controlan el ciclo celular y la degradación de las proteínas anómalas, el segundo grupo está constituido por proteínas implicadas en la síntesis de ARN ribosómico y transferente, el tercer grupo pertenece a la maduración del ADN, es una proteína de unión a una sola hebra de ADN para permitir la replicación, el cuarto grupo está relacionado con la reparación del ADN en la que la proteína repara la ruptura de la doble cadena de ADN, el quinto grupo comprende enzimas relacionadas con procesos de estrés osmótico, oxidativo, al calor o cuando existen deficiencia hídrica en levaduras, el sexto grupo contiene enzimas implicadas en el transporte vesicular entre el endosoma y el aparato de Golgi transportando material que se acaba de incorporar por endocitosis y vacuolar, el séptimo grupo engloba enzimas que participan en diferentes rutas del metabolismo de carbohidratos, el octavo grupo incluye proteínas relacionadas con el metabolismo energético. El último grupo contiene enzimas que intervienen en las rutas del metabolismo macromolecular relacionadas con la síntesis y traducción de proteínas.

Tabla 4.10. Proteínas identificadas agrupadas según su función y/o proceso en el que participa, SSP, denominación, abreviatura utilizada y localización dentro de la célula de levadura *Coinmovilizada*.

FUNCIÓN BIOLÓGICA	SSP	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ABREVIATURA (Nº ACCESO)	ORGÁNULO CELULAR
Control ciclo celular	1107	Espermina sintasa	Q12455	C
	0011	Proteína F-Box COS111	P38308	N,C
	1021	Proteína SCP160	P06105	N
	2006	Factor de Pre- empalme CWC2	Q12046	N
Síntesis de ARNr y ARNt	0107	Ribonucleasa P	P53833	N
Maduración ADN	1007	Proteína de unión a una sola hebra ADN	P25555	N
Reparación ADN	1112	Proteína de reparación del ADN RAD50	P12753	Mi
Respuesta a estrés	4104	Superóxido dismutasa	P00445	C,Mi
	0113	Proteína GRE 1	Q08969	C
	4103	Proteína de unión a ARN	P10080	C,N
Transporte	6202	Golgin IMH1	Q06704	C
	1108	ATPasa vacuolar	P17255	V
Metabolismo de Carbohidratos (Glicolisis/ Gluconeogénesis)	1203	Fructosa-bisfosfato aldolasa	P14540	C
	4101			
	4102	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P00359	C
	3407			
	5106			
	6104			
	7004	Enolasa 1	P00924	C
8004				
2003				
Metabolismo energético	2106	Guanilato quinasa	P15454	N
Metabolismo macromolecular: Síntesis y traducción de proteínas	6108	Glutamil-ARNt sintetasa	P46655	C
	3408	Factor elongación 2	P32324	C
	5101	Proteína ribosomial 60S L21-A	Q02753	C

N: Núcleo; C: Citoplasma; Mi: Mitocondria; V: Vacuola

SSP: son proteínas cuantitativas, SSP: son proteínas cualitativas

4. Resultados

Publicaciones científicas y Resultados pendientes de publicación

En conclusión, el análisis proteómico de los geles bidimensionales en las dos condiciones estudiadas indica que las proteínas expresadas en las células de levadura coinmovilizada tienen funciones relacionadas con la reparación y maduración del ADN, con el control del ciclo celular; además de la síntesis y traducción de proteínas, funciones implicadas en el control tanto a nivel de ciclo celular como de transcripción. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe una defensa de las levaduras coinmovilizadas frente al hongo bajo las condiciones ensayadas, marcada a través de una serie de controles a nivel de ADN, de ARN y de proteínas.

4.2. CAPÍTULO II: Aislamiento y caracterización de levaduras osmotolerantes y coinmovilización con *Penicillium chrysogenum*

En el primer apartado del Capítulo II, se incluyen los resultados que se han publicado con respecto a los aislamientos, caracterización y selección de unas cepas de levaduras de *Saccharomyces* de mostos naturales de uva pasificadas de la DOP Montilla-Moriles en el libro “Avances en Ciencia y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al sector vitivinícola” del IX Congreso Nacional de Investigación Enológica.

En el segundo apartado del Capítulo II, se muestran los resultados que se han publicado sobre la producción de etanol y reutilización de seis tipos de biocápsulas de diferentes cepas de levaduras en la revista científica *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.

4.2.1. Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares

En este apartado se desarrollan los resultados obtenidos con respecto a los aislamientos, caracterización y selección de unas cepas de levaduras de *Saccharomyces* de mostos naturales de uva pasificadas de la D.O.P. Montilla-Moriles. Las cepas se seleccionaron por su capacidad de tolerar altas concentraciones de azúcares, ser resistentes al etanol y poder llevar a cabo fermentaciones en estas condiciones de estrés. En estos ensayos primeros se seleccionaron las cepas X4 y X5 que han sido la base de los experimentos de esta Tesis Doctoral por sus características osmoetanol tolerantes y se comenzaron estudios sobre la inmovilización con dichas cepas por primera vez. Estos resultados quedan publicados en el libro “Avances en Ciencia y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al sector vitivinícola” del IX Congreso Nacional de Investigación Enológica (2007, ISBN: 978-84-690-6060-5. pp. 102-104) cuyo título es “Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares”.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES

Teresa García-Martínez¹, Oscar Maestre¹, Rafael Andrés Peinado², Juan José Moreno²,
Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa.
Tif: 957218640, e-mail: mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Marie Curie.

Resumen:

Mostos con elevada concentración de azúcares sufren a menudo paradas de fermentación o fermentaciones lentas. Esto puede favorecer el desarrollo de microorganismos indeseables, que aumentan la acidez volátil y originan vinos de baja calidad. El objetivo ha sido seleccionar levaduras capaces de fermentar mostos procedentes de uva pasificada "Pedro Ximénez", e intentar inmovilizar a las más adecuadas para la producción de vinos dulces. Se han aislado siete levaduras procedentes de un mosto de uva pasificada después de su fermentación (11,5%, v/v, de etanol y azúcares iniciales 480 g/L), y se ensayaron microfermentaciones en medios con concentraciones crecientes de glucosa (25-50% p/v). Se ha estudiado el crecimiento celular, cinética de fermentación, contenido final de etanol y glucosa residual. Los resultados se compararon con los obtenidos por tres levaduras con alta tolerancia al etanol. Con la excepción de la cepa X2P, todas las cepas aisladas son potencialmente idóneas para fermentar mostos de uva pasificada. Las cepas X5 y G1 fueron seleccionadas para su inmovilización con el hongo filamentoso H3, y se realizaron fermentaciones con 500 g/L de glucosa. Las fermentaciones con células inmovilizadas resultaron más eficientes que las mismas con células libres, y se demostró que la muerte del hongo ocurre por contacto entre célula-hifa.

Palabras clave: glucosa, levadura, tolerancia, inmovilización.

1. INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es un hongo sacarofílico y en su hábitat se encuentra con elevadas concentraciones de azúcares. Sin embargo, cuando se usa para fermentar mostos con alta concentración en azúcares se presentan una serie de problemas como son paradas de fermentación y fermentaciones lentas, que son debidas a la elevada presión osmótica y al efecto tóxico del etanol sobre las levaduras. La parada prematura de fermentación produce vinos de baja calidad y estabilidad que favorece el crecimiento de microorganismos no deseables, que pueden producir una elevada acidez volátil [1]. Así, se recomienda el uso de cepas de levaduras tolerantes a la presión osmótica y al etanol. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* exhiben diferentes comportamientos de fermentación bajo condiciones de estrés [2]. Zuzuarregui y Del Olmo [3] describieron un sistema de selección de levaduras basado en la resistencia a las condiciones de estrés que se producen durante la producción de vino. También, se ha investigado la expresión de genes de respuesta a estrés de azúcares, con el objetivo de analizar los efectos debido a la particular hiperosmolaridad generada por las altas concentraciones de glucosa en los mostos [4]. Los resultados indican que la respuesta molecular a estas condiciones es compleja y está influenciada por multitud de factores. Una posible solución a la parada y enlentecimiento de la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcares podría ser la aplicación de células de levadura inmovilizadas tolerantes a altas concentraciones de azúcar y etanol. Así, el objetivo de este trabajo ha sido por un lado aislar, caracterizar y seleccionar levaduras osmo-etanol tolerantes, y

por otro lado inmovilizar células de levadura mediante un nuevo sistema de inmovilización desarrollado por nuestro equipo de investigación y realizar fermentaciones con elevada concentración de glucosa.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos, medios de cultivo y fermentaciones

A partir de un mosto de uva pasificada Pedro Ximénez con 480 g/L de azúcares y fermentado hasta 11,5% (v/v) de etanol, se han aislado y seleccionado 7 cepas de levadura (X2P, X2, X3, X4, X5, X6 y X9). También se han utilizado para este estudio tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de nuestra colección (E1, F12 y G1) tolerantes al etanol, la primera aislada de un mosto en fermentación y las dos últimas de un velo de flor de la D.O. de Montilla-Moriles. Las inoculaciones se realizaron con 4×10^6 células/mL. Para los experimentos de inmovilización se ha usado el hongo filamentoso H3 (*Penicillium*) aislado del ambiente y las cepas de levadura G1 y X5. El medio de crecimiento ha sido YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 5% de glucosa, p/v), las células se incubaron a 28°C durante 24 horas en un agitador orbital a 200 rpm. Se han realizado microfermentaciones con cada cepa de levadura en medio YPD, previamente esterilizado a vapor fluente durante 30 minutos, con una concentración creciente de glucosa de 25 a 50% (p/v) en tubos Falcon de 50 mL pinchados con una aguja hipodérmica a 24°C y a 150 rpm hasta que se dio por finalizada la fermentación. El procedimiento y el medio de inmovilización celular



fue el mismo que el descrito por Peinado *et al.* [5], formándose las correspondientes biocápsulas de levadura. Se han realizado dos fermentaciones con células inmovilizadas en un medio YPD con 50% (p/v) de glucosa. Previamente a la inoculación con las biocápsulas, éstas habían fermentado un medio YPD con 50% (p/v) de glucosa durante 4 días y luego se lavaron dos veces con el mismo medio fresco. Para comprobar que el hongo filamentoso muere, durante la primera fermentación, por contacto célula de levadura-hifa se han realizado fermentaciones con tubos de diálisis según Nissen *et al.*, [6], donde las esferas de hongo filamentoso se introdujeron dentro de los tubos y las células de levadura se mantuvieron fuera de los mismos.

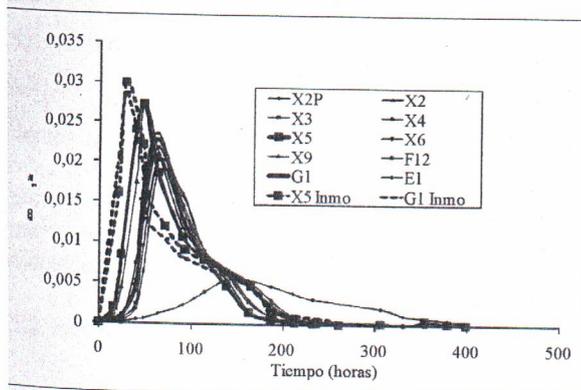
2.2. Métodos analíticos

El recuento de células se ha realizado en un contador de partículas Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman). La cinética de fermentación se ha seguido según la pérdida de peso de cada tubo de fermentación. La glucosa y el etanol se han cuantificado según los kits enzimáticos específicos de Boehringer-Mannheim, Alemania.

3. RESULTADOS

Como se ha descrito en la sección material y métodos se han usado diez cepas de levaduras para realizar microfermentaciones con distintas concentraciones de glucosa, entre 25 y 50% (p/v), en medio YPD. El número de generaciones alcanzado por todas las cepas cuando fermentaron entre 25 y 38% (p/v) de glucosa fue alrededor de 6, y éste comenzó a disminuir ligeramente a partir de esta última concentración, excepto para las cepas X2P y X4 que mostraron una disminución más drástica. Se sabe que el crecimiento celular de las levaduras se inhibe con concentraciones elevadas de azúcar y por la acumulación de etanol.

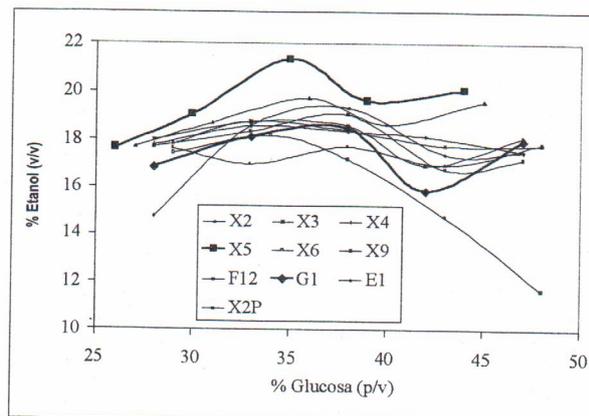
Fig. 1. Velocidad de fermentación de las células libres e inmovilizadas frente al tiempo en medio YPD con un 50 % (p/v) de glucosa. La monitorización se realizó por pérdida de peso de los tubos de fermentación debido al desprendimiento de CO₂



Una elevada concentración de azúcares también afecta la actividad fermentadora de las levaduras. En este trabajo se ha estudiado la evolución de la velocidad de producción de CO₂ en medio YPD con diferentes concentraciones

de glucosa. Las cepas mostraron velocidades de fermentación similares a concentraciones de glucosa menores de 38% (p/v), con la excepción de la cepa X2P, que fue menor. A partir de esta concentración las velocidades de fermentación disminuyeron. En la Fig. 1 se representa la velocidad de fermentación de cada cepa de levadura en la fermentación con un 50% (p/v) de glucosa, las velocidades más rápidas de fermentación se observaron para las cepas X2 y X5.

Fig. 2. Contenido en etanol alcanzado por las cepas en las fermentaciones comprendidas entre 25 y 50 % (p/v) de glucosa



La cepa que produjo una mayor concentración de etanol en todos los casos fue la cepa X5 (Fig. 2). Así pues, se ha seleccionado la cepa X5, como mayor productora de etanol, y la cepa G1, como altamente tolerante a éste, para los experimentos con células inmovilizadas. Ambas levaduras se co-inmovilizaron separadamente con el hongo H3 de una manera natural sin usar soportes externos. La velocidad de fermentación fue más rápida en las fermentaciones realizadas con células inmovilizadas (Fig. 1).

La Tabla 1 representa los contenidos en etanol y glucosa residual en los medios fermentados con un 50% (p/v) de glucosa.

Tabla 1: Contenido en etanol y glucosa residual en las fermentaciones con un 50% (p/v) de glucosa

CEPA	ETANOL (% v/v)	GLUCOSA RESIDUAL (g/L)
X2P	9 ± 1	278 ± 35
X2	17 ± 1	145 ± 40
X3	16 ± 1	166 ± 20
X4	17 ± 0	175 ± 30
X5	18 ± 2	128 ± 20
X6	17 ± 1	189 ± 25
X9	17 ± 1	161 ± 15
F12	16 ± 1	162 ± 30
G1	17 ± 1	175 ± 20
E1	17 ± 1	174 ± 17
X5 Inmovilizada	18 ± 0	128 ± 10
G1 Inmovilizada	17 ± 1	155 ± 30

También se ha demostrado en este trabajo mediante experimentos con tubos de diálisis que durante la primera fermentación las células de levadura matan al hongo filamentoso mediante el contacto físico célula-hifa.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas X5 y G1 tanto en forma libre como inmovilizada, son potencialmente útiles para la elaboración de vinos dulces naturales a partir de mostos con elevada concentración de azúcares como los obtenidos a partir de uva pasificada.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. CARIDI, A.; CRUCITTI, P.; RAMONDINO, D. 1999. **Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast.** *Biotechnol. Lett.* 21, 617-620.
2. ZUZUARREGUI, A.; DEL OLMO, M. 2004. **Expression of stress genes in wine strains with different fermentative behavior.** *FEMS Yeast Res.* 4, 699-710.
3. ZUZUARREGUI, A.; DEL OLMO, M. 2004. **Análisis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion from wine yeast selection.** *Antonie Leeuwenhoek* 85, 271-280.

4. ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. 2003. **Genome-wide expresión analices: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress.** *FEMS Yeast Res.* 2, 375-399.
5. PEINADO, R.A.; MORENO, J.J.; MAESTRE, O.; MAURICIO, J.C. 2005. **Use of a novel immobilization yeast system for winemaking.** *Biotechnol. Lett.* 27, 1421-1424.
6. NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. 2003. **Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism.** *Yeast* 20, 331-341.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL2005-01232/ALI concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia de España y Fondos FEDER.

4.2.2. Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production

En este segundo apartado, se estudió la producción de etanol con estas cepas (X4 y X5) y otras cuatro más (G1, P29, QA23 y Uvaferm BC) que se coinmovilizaron con el hongo filamentoso bajo las condiciones especiales de inmovilización descritas. Se han obtenido seis tipos de biocápsulas diferentes con cada una de las cepas de levadura ensayadas, y posteriormente, éstas se han usado para realizar sucesivas microfermentaciones alcohólicas en un medio semi-sintético con un 18% (p/v) de glucosa. Durante la coinmovilización, el diámetro de las biocápsulas de levadura disminuye y el número de biocápsulas es mayor a medida que aumenta la velocidad de agitación. Por otro lado, se examinó la reutilización de las correspondientes biocápsulas formadas de cada cepa ensayada, de modo que las biocápsulas de X4 y Uvaferm BC se reutilizaron hasta 7 veces sin disminuir la producción de etanol, las biocápsulas de P29 y QA23 5 veces y las biocápsulas de G1 y X5 realizaron 3. Los resultados de producción de etanol se han relacionado directamente con la viabilidad de las células de levadura en los inmovilizados.

Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production

Teresa García-Martínez,^a Anna Puig-Pujol,^b Rafael A. Peinado,^c Juan Moreno^c and Juan C. Mauricio^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Six different wine yeast strains (G1, X4, X5, P29, QA23, Uvaferm BC) were co-immobilized in a natural, spontaneous way with *Penicillium chrysogenum* under special conditions without the need for an external support or chemical binder and provided six different 'yeast biocapsules'. The purpose was to characterize and evaluate the biocapsules obtained in terms of yeast cell viability, ethanol production and reusability to assess their suitability for ethanol production and the development of industrially competitive alternative wine and beer production methods.

RESULTS: Biocapsule size was found to decrease and quantity to increase with increasing shaking rate during the immobilization process. The fermentations were realized in YPD medium containing 18% (w/v) glucose with repeated fermentations reaching 10% (v/v) ethanol. X4 and Uvaferm BC biocapsules afforded at least seven uses with no significant decrease in ethanol production; P29 and QA23 biocapsules five times; and G1 and X5 three times each. Seemingly, ethanol production was directly related to the viability of yeast cells in the immobilizate under defined assay conditions.

CONCLUSIONS: X4 and Uvaferm BC may be the most suitable yeast strains for autoimmobilization on *P. chrysogenum* with a view to their use in alcoholic fermentation processes.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: immobilized cells; *S. cerevisiae*; *P. chrysogenum*; ethanol fermentation

INTRODUCTION

The energy crisis caused by the dependence on fossil fuels, and the environmental effects of their use, has raised the demand for biofuels. Bioethanol fuel has been deemed the great alternative to fossil fuels; also, it is currently considered a profitable commodity, and is being increasingly used as a renewable energy source and car fuel.¹ The increasing demand for ethanol has raised the need for more cost-effective technologies for its production. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism most widely used in alcoholic fermentation; however, the bacterium *Zymomonas mobilis*, which is currently being used mostly in sugar fermentation processes, might be an advantageous alternative.^{2,3}

Immobilization procedures allow cells to be confined in a well-defined spatial region in order to preserve their catalytic properties and make them reusable.^{4,5} Ethanol production by immobilized yeasts has been the subject of extensive research during the last few decades as an alternative procedure, with technical and economic advantages over traditional systems based on free cells. Using immobilized cells for fermentation avoids the inhibitory effects of high concentrations of substrate and product, thereby enhancing ethanol productivity and yield.^{6–10} Cells can be immobilized by natural or artificial means. Artificial immobilization is the more common and can be accomplished by binding to a support, cross-linking through binding to bifunctional compounds, trapping in a semi-permeable membrane or a

polymer,^{5,8,11,12} or a combination of the three methods. Because the cells used in artificial immobilization methods are not in their natural form, they can experience strong changes in metabolism and viability. However, some microorganisms can be spontaneously immobilized naturally under special conditions by aggregation into small pellets, flocs, microspheres, mycelia or biofilms. No immobilization treatment is required, so no metabolic alteration in the immobilized cells is to be expected, which can open the door to advantageous uses relative to artificially immobilized cells.^{5,13–20} In addition, the natural adhesion method has been paid more and more attention, because maximum cell viability and biochemical activity were obtained due to the formation of biofilms.²¹

* Correspondence to: Juan C. Mauricio, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Edificio Severo Ochoa, Campus Universitario de Rabanales, Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba, Spain. E-mail: mi1gamaj@uco.es

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Spain

^b INCAVI-IRTA, Estació de Viticultura i Enologia. Secció d'Investigació Enològica, Vilafranca del Penedès (Barcelona), Spain

^c Departamento de Química Agrícola y Edafología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Spain

One of the most critical requirements for successful immobilization of cells is the use of an appropriate material as support, i.e. one that is simple, inexpensive, easy to use, naturally abundant, long-lasting, stable and fit for nutritional purposes if used by the food industry.^{11,14} A number of organic and inorganic supports of widely variable origin (alginates, gluten balls, delignified cellulose, porous volcanic rocks) have been used with dissimilar success as yeast supports for the production of various fermentation products including ethanol, wine and beer.^{8,10,22–32} In any case, an effective support should allow efficient diffusion of the substrate and product.^{5,14}

Our research group has developed a new natural, spontaneous immobilization system using a flor yeast¹³ and a filamentous fungus in the absence of physico-chemical external supports to produce ethanol.³³ Our system provides smooth hollow spheres designated 'yeast biocapsules' whose walls consist of fungal hyphae containing trapped yeast cells. Recently, Yang *et al.*³⁴ reported co-immobilization of *Pseudomonas sp.* with *Aspergillus oryzae* to remove malachite green from aqueous solution.

One potentially effective strategy to reduce production costs and make ethanol fuel economically competitive with fossil fuels could be the use of wild yeast with osmotolerance, ethanol resistance and low nutritional requirements.^{1,35,36} In addition, immobilization of wild yeast on an appropriate support can enhance their economic advantages. The primary purposes of this work were to immobilize various yeast strains on a filamentous fungus and to assess their efficiency and suitability for ethanol production. The results of this study might open up new avenues for the use of yeast biocapsules in industrial fermentation processes.

EXPERIMENTAL

Microorganisms

Five different strains of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* were used, namely: G1 (ATCC : MYA-2451), a yeast isolated from the flor film on a wine under biological aging in the Montilla–Moriles winemaking region (WR); P29 (CECT11770), which is used in the production of sparkling wines such as cava, was isolated in the Penedés WR and obtained from the INCAVI yeast collection; X4 (CECT13014) and X5 (CECT131015), which were isolated from partially fermented musts from sun-dried Pedro Ximenez grapes grown in the Montilla–Moriles WR and selected in terms of their high osmotolerance;³⁷ and QA23, an isolated and selected yeast by the University Tras-os-Montes e Alto Douro in Portugal and commercially available from the firm Lallemant. In addition, we used Uvaferm BC, a *Saccharomyces bayanus* strain selected and marketed as a wine yeast by Lallemant Inc.

The yeasts were co-immobilized with *Penicillium chrysogenum* H3 strain, an isolated filamentous fungus from the environment and identified by the Spanish Type Culture Collection (CECT). This fungal strain was used to obtain six different types of biocapsules by immobilization with each of the individual yeast strains for subsequent use in micro-alcoholic fermentations in a semi-synthetic medium containing 18% (w/v) glucose.

Immobilization medium and conditions

Biocapsules were obtained under special conditions in a formation medium consisting of yeast nitrogen base without amino acids (YNB, Difco) containing a 5 g L⁻¹ concentration of gluconic acid as carbon source. The medium was buffered at pH 7 with sodium

and potassium phosphate. Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 100 mL of sterilized medium obtained by autoclaving at 121 °C for 15 min were inoculated with a viable yeast cell concentration of 4 × 10⁶ cells mL⁻¹ and supplied with *P. chrysogenum* spores twice via an inoculation loop. The flasks were thermostated at 28 °C and shaken on an orbital shaker from New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA) for 7 days. This afforded spontaneous co-immobilization between the microorganisms in the absence of an external support and resulted in yeast biocapsules for each strain.^{33,38}

Fermentation medium and conditions

Once formed, the biocapsules were removed from their formation medium with a sterile strainer, washed once with cold sterile water and twice with sterile fresh YPD medium at 4 °C, and then placed in YPD fermentation medium, all under aseptic conditions (alcohol and burner flame). Free cells of each yeast strain were also prepared similarly to the biocapsules, except that no fungus was used and the cells were collected by centrifugation at 3500 g.

The six types of biocapsules obtained with 5–6 mm diameter size were used in microfermentations conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of semi-synthetic YPD medium (10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ peptone and 180 g L⁻¹ glucose) at 28 °C that were stoppered with hydrophobic cotton and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. Each flask was inoculated with the amount of biocapsules needed to obtain a yeast concentration of 10 × 10⁶ cells mL⁻¹. Microfermentations were stopped at 10% (v/v) ethanol concentration in the medium. Then, biocapsules were easily removed from the medium using a sterilized strainer, and washed twice with the same sterile fresh YPD medium for reuse in the next fermentation run. Reuse was considered finished when the time needed to reach a 10% (v/v) ethanol concentration exceeded that of the first fermentation run. The fermentation kinetics was monitored via the weight loss resulting from CO₂ release.^{27,39,40} The ethanol content in the medium after each fermentation run was measured with the method of Crowell and Ough.⁴¹ Ethanol productivity was calculated as the grams of ethanol per liter liquid volume produced per hour. All fermentations were performed in triplicate.

Total and viable yeast cell counts

The total number of cells (in millions per gram biocapsule, wet weight) and the proportion of viable cells were determined according to Plessas *et al.*,³¹ in the immobilizates from the biocapsule formation medium (YNB) and in the biocatalysts at the end of each fermentation run. One additional determination was the count of free viable cells per millilitre of fermentation broth. Immobilized cell counts were obtained as follows: yeast cells were isolated by placing 1 g of mechanically broken biocapsules in a mortar and blending them with 9 mL of sterilized 1/4 strength Ringer's solution (Merck, Darmstadt, Germany) on a DSG 304 shaker (Heidolph, Schwabach, Germany) at 100 rpm for 30 min with sonication for 1 min in an Ultrasons apparatus (Selecta, Barcelona, Spain), all at 4 °C.⁴² Viewing under the light microscope revealed that not all yeast cells were thus released from fungal hyphae; in any case, this was the most efficient procedure for this purpose. In parallel, a volume of 0.1 mL of fermentation broth was added to 9 mL of sterilized Ringer's solution to determine cell leakage. The starting suspensions were subjected to serial dilution and the total concentration of cells counted on a Z2 Coulter particle counter and analyser (Beckman). Previously, the samples were passed through a filter of 180 µm pore size and then

through one of 30 μm , both from Millipore, to remove loose fungal hyphae and collect yeast cells only. Cell viability was determined by spreading 100 μL volumes of diluted suspension onto YPD agar plates and counting clones after 48 h at 28 °C. The results were expressed as colony-forming units (cfu) per gram of immobilized biocatalyst (wet weight) or millilitre of fermentation broth.

Scanning electron microscopy (SEM)

Yeast biocapsules from *S. cerevisiae* strain G1 were examined both freshly and after use in fermentation. Previously, the biocapsules were washed with distilled water twice, followed by cutting of their walls into 1–2 mm cubes and fixing in 2% glutaraldehyde at 4 °C for 6–8 h. Following decanting of the fixative, the material was dehydrated serially with ethanol and gold-coated with an SCD005 Sputter Coater (Bal-Tec, Los Angeles, CA, USA). The resulting samples were examined and photographed with a 6300 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

Immobilization of yeast strains

The proposed immobilization system was previously examined and optimized by co-immobilizing *S. cerevisiae* strain G1^{43,44} and *P. chrysogenum* strain H3.^{33,38} The resulting system was successfully used in alcoholic fermentation processes.³³

One might wonder if developing one more immobilization system to add to the many already available^{5,8} was in fact necessary. The greatest originality of our system is that it uses no external, artificial support or chemical binder; rather, it exploits natural immobilization mechanisms in which a filamentous fungus and yeast cells co-immobilize spontaneously under appropriate conditions leading to forced symbiosis of the two microorganisms.^{33,38} In addition, the proposed immobilization system provides some advantages over existing alternatives that are discussed in detail below. The specific conditions required for *Saccharomyces* cells to autoimmobilize on *Penicillium* hyphae are as follows:

- The presence of a carbon source readily available to the filamentous fungus, but not to the yeast, such as gluconic acid. This source makes *S. cerevisiae* growth difficult (in fact, only one generation was observed) but not fungus growth. If a carbon source such as glucose is used, growth of free yeast cells is observed resulting in a medium not suitable for biocapsules formation.
- A culture medium buffered at neutral pH. Otherwise, no suitable biocapsule formation is obtained. Probably, the typical release of acids by *Penicillium* would cause yeast cells to die and this produces lax, fibrous, rugged spheres containing the filamentous fungus alone. Recently, in other co-immobilizations it has been reported that pH is crucial to the immobilization process, and influence the growth and activity of immobilized microorganisms.³⁴
- Continuous stirring to facilitate the formation of spheres and aeration of the medium in order to keep the filamentous fungus alive. Although agitating submerged fungal cultures is known to facilitate the formation of non-hollow pellets, the special conditions used here surprisingly enabled spontaneous co-immobilization of *S. cerevisiae* and *P. chrysogenum* in the form of smooth, hollow, elastic spheres. Therefore, the presence of yeasts is seemingly indispensable to obtain these

new structures (yeast biocapsules). We have assayed other filamentous fungi for biocapsule formation such as *Aspergillus*, but they were discarded because they produced weak, unstable biocapsules unfit for use in fermentation processes.

- Another operating parameter for biocapsule formation was the temperature at 28 °C, because it was appropriate for optimum growth of the tested microorganisms.
- Minimum time for the biocapsule formation was 7 days. Visually, the formation of biocapsules can be noticed 3 days after inoculation, and at 7 days the broth was fully transparent and contained no free yeast cells. This indicates that all yeast cells were autoimmobilized on the filamentous fungus, which was verified by microscope. If biocapsules were given more time in the formation medium, they were slightly larger in size due to the growth of the *Penicillium* hyphae and they also showed increased density and consistency. This is an operating parameter to keep in mind, depending on the use proposed for the biocapsules (e.g. for the production of sparkling wines it will be necessary that the biocapsules are very consistent to support the high pressures reached in the bottles, 6–7 atmospheres).
- The optimum concentration of yeast cells for formation of biocapsules in the reported conditions was 4×10^6 cells mL^{-1} . At higher concentrations the medium remains turbid for a longer time, and the immobilization process is not suitable.

In this work, we developed six different types of biocapsules from as many different yeast strains (G1, X4, X5, P29, QA23 and Uvaferm BC) and *P. chrysogenum* strain H3 under the above-described conditions. The resulting immobilizates were assessed as biocatalysts for alcohol fermentation.

In the immobilization medium, the quantity and diameter of the biocapsules were found to depend on the shaking rate. At the higher rate used (200 rpm) biocapsules were produced with uniform size *ca* 3 mm in diameter, but at 150 rpm different sizes were obtained (5–16 mm) between yeast strains (Fig. 1) and the number of biocapsules was 10-fold decreased (about 20 biocapsules per Erlenmeyer flask at 150 rpm). This may be because the hyphae of the filamentous fungus became more separated or fragmented into small particles at high shaking rate as a consequence of shear force acting on more smaller biocapsules than at low shaking rate.

Once formed, the biocapsules were easily removed from the medium using a sterile strainer, washed with cold sterile water and placed in the fermentation broth. Figure 2 shows two flasks holding YPD medium containing 18% (w/v) glucose after 24 h of active fermentation in the presence of immobilized yeasts (A) and free yeast cells (B). During fermentation, the filamentous fungus died and remained as an inert support for subsequent reuses. As previously confirmed by dialysis tests,³⁸ the fungus was probably killed via a cell–hypha contact mechanism. This was the likely result of an increase in the number of yeast cells and of their invading and colonizing fungal hyphae (Table 1 and Fig. 3). This finding is consistent with previous results of Lachance and Pang,⁴⁵ who detected predacious yeasts, and Nissen *et al.*,⁴⁶ who observed early growth arrest in *Kluyveromyces thermotolerans* and *Torulaspora delbrueckii* caused by a cell–cell contact-mediated mechanism relying on the presence of viable *S. cerevisiae* cells at high concentrations. Figure 3 shows scanning electron micrographs of a freshly formed biocapsule exhibiting cells bound to intact fungal hyphae (A) and a section of a biocapsule used after fermentation (B). As can be seen, no fungal hyphae remained intact in (B);

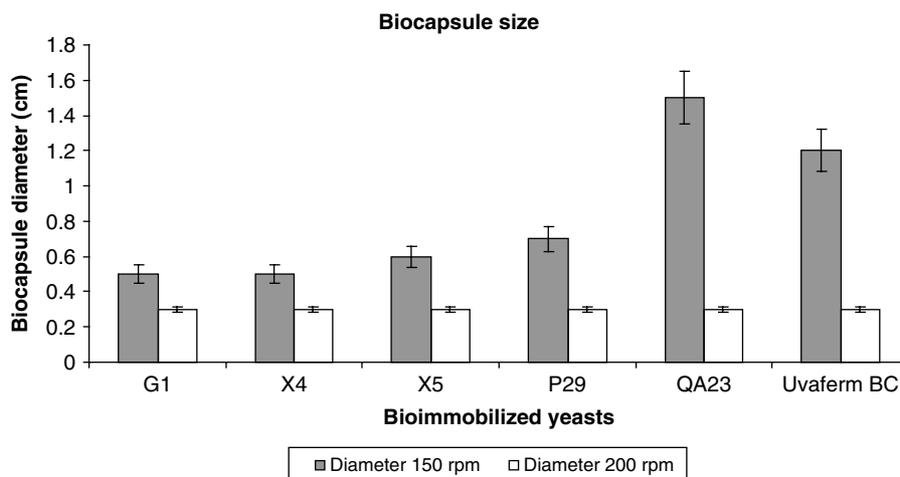


Figure 1. Biocapsules of variable size obtained by orbital shaking at 150 and 200 rpm for 7 days.

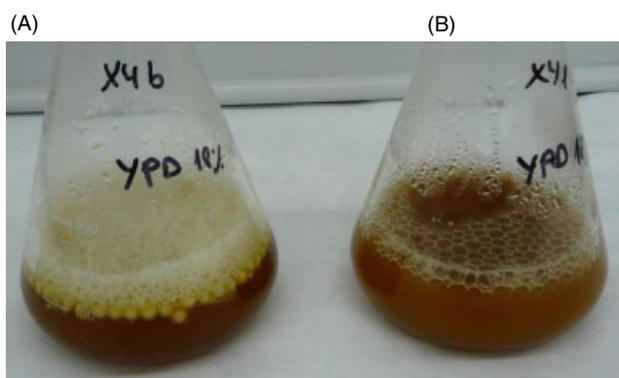


Figure 2. Fermentation flasks containing fully active yeast biocapsules (A) and fully active free yeast cells (B) 24 h after inoculation.

rather, all hyphae were empty, distorted, flattened, amorphous and compacted. So, the filamentous fungus died and remained as an inert support in the fermentation broth. Yeast cells were retained by the fungus by entrapment and also, possibly, by biospecific binding.³⁸

Repeated batch fermentations

Effective autoimmobilization of the six yeast strains on *P. chrysogenum* and the suitability of the resulting biocatalysts for alcohol fermentation were confirmed by their acceptable operational stability during repeated fermentations in a YPD medium containing 18% (w/v) glucose. Each fermentation run was stopped at an ethanol concentration of 10% (v/v) in the medium (i.e. at $79.9 \pm 0.4 \text{ g L}^{-1}$) and reuse of each biocatalyst was considered finished when the time needed to reach this alcohol level increased beyond that of the first fermentation run.

The variation of viable cells was measured via the number of colony-forming units (cfu) in the fermentation broth (cell leakage) and on the biocatalysts (immobilized cells) which were also analysed for total cells during the repeated fermentation runs. Based on Table 1, concentration of immobilized cells on *P. chrysogenum* after 7 days in the immobilization medium indicated that the microbial populations were in the range $13\text{--}20 \times 10^6 \text{ cells g}^{-1}$ biocatalyst for all yeast strains. The fact that the viability of yeast cells in the fresh immobilizate was only moderate suggested

that the biocapsule formation medium was unsuitable for the yeast strains; in fact, their inoculation in the absence of the filamentous fungus resulted in a single replication (results not shown). In conclusion, the medium with gluconic acid was good for yeast autoimmobilization on the filamentous fungus, but inappropriate for the growth and viability of yeast. The lowest viability was that of strains G1 and X5 (ca 5%), followed by Uvaferm BC (13%) and, with a proportion around 50%, X4, P29 and QA23. Once the biocapsules were placed in the fermentation broth (YPD containing 18% w/v glucose), the number of cells attaching to the support increased over the first two fermentation runs as the yeasts invaded and colonized fungal hyphae (Table 1). Viability was found to depend on the particular yeast strain; it was minimal for G1, P29 and X5, and maximum for X4, Uvaferm BC and QA23. In all cases, cell viability decreased through repeated use in the fermentation process. This may be explained by the nature of yeast cells, one yeast cell does not have the capacity to divide indefinitely. Entrapped yeast cells after repeated fermentation become resting cells. Resting cells are cells that are not actively in the process of dividing, but their metabolism may continue to be active. On the other hand, the number of viable cells released into the fermentation broth decreased with increasing reuse (Fig. 4), consistent with previous results of Liang *et al.*,²⁷ on sugarcane pieces as yeast support, who deemed immobilization a time-dependent process, due to the effect of cell multiplication and strong, irreversible attachment.

Table 2 shows the fermentation time and ethanol productivity obtained after repeated fermentations with the six immobilized yeast strains. As in previous work, a delay in the first run was observed with respect to all others as a result of the need for immobilized yeasts to adapt to the fermentation medium.^{27,33} The longest fermentation time was that for G1; this strain is suitable for fermentation but is a flor yeast typically growing in wines under biological aging and hence better adapted to living on ethanol rather than fermentable sugars. All other strains fermented more rapidly and exhibited higher ethanol productivity values. Ethanol productivity was higher in the second fermentation run than in the first with all strains, possibly as a result of the increase in the amount of biomass produced during the first fermentation run (Table 1).

The yeast biocapsules from strains X4 and Uvaferm BC were successfully used at least seven times without significant losses in ethanol production; these two strains were those exhibiting the

Table 1. Total cell counts (10^6 cells g^{-1} wet biocapsule) and percentage of viable cells (%) in both fresh biocapsules and after repeated use in batch fermentation runs

Biocapsules formation medium	G1		X4		X5		P29		QA23		Uvaferm BC	
	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage	Total cells (10^6 cells g^{-1})	Viability percentage
F 1	13 ± 3	5 ± 1	18 ± 2	50 ± 3	14 ± 2	4 ± 1	24 ± 5	40 ± 2	15 ± 2	47 ± 3	10 ± 2	13 ± 2
F 2	1400 ± 90	43 ± 3	825 ± 30	97 ± 3	583 ± 30	67 ± 5	571 ± 20	50 ± 5	2600 ± 95	92 ± 3	629 ± 31	91 ± 3
F 3	1322 ± 53	52 ± 3	1700 ± 25	95 ± 3	1008 ± 32	64 ± 2	905 ± 21	50 ± 2	2404 ± 40	90 ± 4	1315 ± 20	92 ± 3
F 4	1404 ± 64	42 ± 6	2001 ± 32	92 ± 5	1403 ± 31	48 ± 5	1112 ± 25	48 ± 5	2333 ± 58	90 ± 6	1212 ± 30	90 ± 5
F 5			1998 ± 21	90 ± 3			980 ± 13	50 ± 1	2200 ± 94	82 ± 9	1400 ± 73	89 ± 3
F 6			1900 ± 34	85 ± 5			1000 ± 32	42 ± 5	1998 ± 53	51 ± 8	1502 ± 83	90 ± 5
F 7			1893 ± 50	70 ± 3					1444 ± 34		1444 ± 34	75 ± 3
			1904 ± 33	62 ± 5					1500 ± 50		1500 ± 50	65 ± 5

F: Fermentation run.

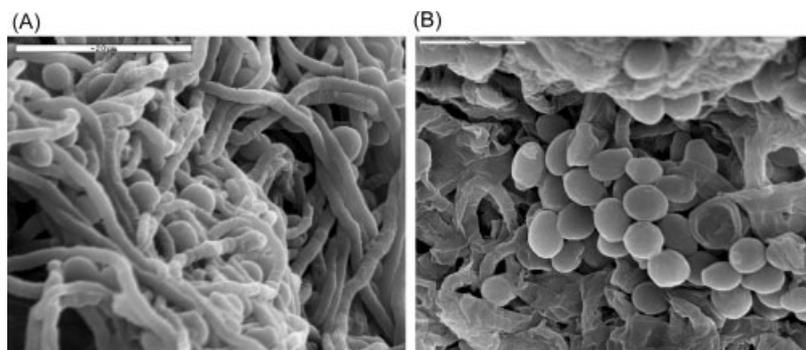


Figure 3. Scanning electron micrographs of two yeast biocapsules. (A) Wall section of a fresh biocapsule exhibiting attached yeast cells (spherical structures) and intact hyphae (filamentous structures). (B) Wall section of a yeast biocapsule used after fermentation – unlike (A), hyphae were no longer intact. Reference bar: 20 μm in (A), but 10 μm in (B) for easier viewing.

highest ethanol productivity, stability and mechanical strength throughout the process. On the other hand, strain X5 proved the weakest.

The proposed yeast immobilization system departs from conventional alternatives in some respects. Thus, current microorganism co-immobilization techniques use supports such as cellulose, layered agar structures, semi-permeable membranes of synthetic polymers or liposomes.^{47–50} In our system, the support (i.e. the immobilization matrix) is provided by one of the microorganisms to be immobilized, which dispenses with the need for an external support and reduces the associated costs. Ours is therefore a simple, inexpensive method. Also, the microorganisms bind naturally, which helps preserve their catalytic properties, rather than by an artificial forced interaction. The resulting biocapsules can be used with no loss of integrity in fermentation processes. Worth special note is the fact that the filamentous fungus dies during the fermentation process and remains as an inert support facilitating subsequent reuse of the biocapsules. Recent tests with dialysis tubes conducted by our group revealed that the death of the filamentous fungus is caused by direct contact of the yeast cells with the fungal hyphae.³⁸ It is well known that alginate gel is among the most widely used support for immobilized yeasts. However, there are several weaknesses of alginate immobilized yeast for commercial scale operations.^{5,27,51,52} Gel entrapment has the disadvantage of limited mechanical stability. It has been frequently observed that the gel structure is easily destroyed by cell growth in the gel matrix and carbon dioxide production.⁵ Another problem of immobilization in a gel matrix may lead to mass transfer limitations by diffusion. Our biocapsules immobilization system has advantages over immobilization in a gel matrix, such as the use of one of the microorganisms to be immobilized as support, thereby avoiding the costs associated with the need for an external matrix; also, the porous structure of a filamentous fungus facilitates the diffusion of nutrients and products in the culture medium.⁵

Natural materials including apple pieces, orange peel, dried figs, grape skin and sugarcane pieces have also been assessed as biocatalysts for ethanol.^{25,27,31,53–55} Most batch fermentations resulted in glucose consumption of 98–99% from a juice containing 134–187 g sugar L⁻¹, and stable ethanol production with 1.0–5.4 g L⁻¹ h⁻¹ ethanol productivity at 30 °C. Based on the results of this work, our biocapsules are as efficient or even more so in terms of conversion of sugars into ethanol. Therefore, our biocapsule-based catalysts might provide an industrially competitive alternative to Ca alginate-entrapped yeasts, and other supports.

CONCLUSIONS

The results obtained in this work demonstrate the potential of biocapsules consisting of immobilized yeast cells as fermentation catalysts. The greatest originality of the proposed system is that the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are co-immobilized in a natural, spontaneous manner without the need for external support or physico-chemical binder. The procedure provides strong hollow spheres, ‘biocapsules’, whose walls consist of fungal hyphae and yeast cells. Immobilization is accomplished by supplying the culture medium with gluconic acid, a nutrient available to the fungus, but not to the yeast, in a buffered, agitated medium. Therefore, the proposed immobilization method is simple and inexpensive, and allows the yeasts to be reused, which makes it especially attractive for the production of ethanol and other alcoholic beverages such as wine or beer. Also, the two microorganisms interact in a natural manner rather than via artificial forces as in most alginate and carraginate systems,⁸ which helps preserve most of the catalytic activity of the yeasts. In addition, the porous nature of the filamentous fungus may reduce diffusion problems with respect to other supports. Interestingly, the filamentous fungus dies during the fermentation process and remains as an inert support that facilitates subsequent reuse of the biocapsules.

Six types of biocapsules obtained were used to ferment a semi-synthetic medium containing 18% (w/v) glucose to an ethanol concentration of 10% (v/v) and reused in further runs. The strains exhibiting the highest viability and mechanical strength were those affording the greater numbers of reuses (X4 and Uvaferm BC); these are probably the most suitable for immobilization and

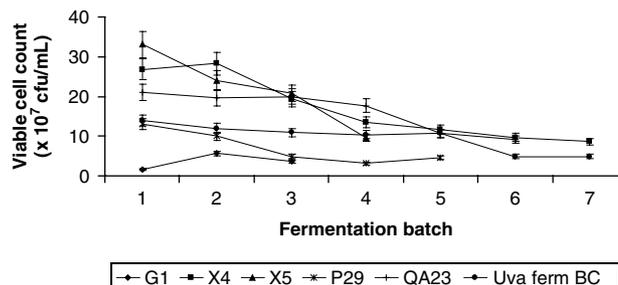


Figure 4. Viable cell counts of free cells in broth (cell leakage) during repeated batch fermentation runs with the six yeast strains as immobilized on *P. chrysogenum*.

Table 2. Fermentation time (h) and ethanol productivity ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) of repeated anaerobic batch fermentations with free cells and biocapsules from the six yeast strains as immobilized on *P. chrysogenum*

	G1		X4		X5		P29		QA23		Uvaferm BC	
	Time (h)	Productivity	Time (h)	Productivity	Time (h)	Productivity						
Free cells	37.5 ± 0.7	2.1 ± 0.0	24.5 ± 0.7	3.2 ± 0.1	22.5 ± 0.9	3.5 ± 0.1	27.5 ± 0.7	2.8 ± 0.1	20 ± 0.0	3.9 ± 0.0	25.5 ± 0.7	3.1 ± 0.1
F1	41.5 ± 2.1	1.9 ± 0.1	26.0 ± 1.4	3.0 ± 0.2	26.5 ± 0.7	3.0 ± 0.7	32.5 ± 3.5	2.4 ± 0.3	21.5 ± 0.7	3.7 ± 0.1	21.5 ± 2.1	3.7 ± 0.4
F2	21.5 ± 2.1	3.7 ± 0.4	13.5 ± 0.7	5.9 ± 0.3	16.5 ± 0.7	4.8 ± 0.2	22.0 ± 1.4	3.6 ± 0.2	21.5 ± 2.1	3.7 ± 0.4	15.0 ± 1.4	5.3 ± 0.5
F3	26.0 ± 1.4	3.0 ± 0.2	12.0 ± 1.4	6.6 ± 0.8	13.3 ± 0.4	6.0 ± 0.2	16.0 ± 1.4	5.0 ± 0.4	17.5 ± 3.5	4.6 ± 0.9	11.5 ± 3.5	7.2 ± 2.2
F4			12.5 ± 0.7	6.3 ± 0.4			13.5 ± 2.1	5.9 ± 0.9	20.5 ± 0.7	3.9 ± 0.1	12.5 ± 0.7	6.3 ± 0.4
F5			10.5 ± 2.1	7.7 ± 1.6			18.0 ± 2.1	4.4 ± 0.3	20.5 ± 0.7	3.9 ± 0.1	9.5 ± 0.7	8.4 ± 0.6
F6			12.5 ± 0.7	6.3 ± 0.4							11.5 ± 2.1	7.0 ± 1.3
F7			15.5 ± 3.5	5.2 ± 1.2							16.5 ± 4.9	5.0 ± 1.5

F: Fermentation run.

use in fermentation processes, even though the other strains may also be effective alternatives, depending on the particular fermentation process.

Some advantages of the cell immobilization include: prolonged activity and stability of the biocatalyst due to the protective effect of the immobilization support against physicochemical effects, increased tolerance to high substrate concentration and reduced end-product inhibition, increased tolerance against toxic and inhibitory compounds, and stress tolerance.^{8,56,57} Further investigations of these topics using the proposed immobilization system would be interesting.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge co-funding of this work by Spain's Ministry of Science and Innovation (Grant RTA2008-00056-C02-02, MICINN-INIA) and FEDER. We would like to give special thanks to José María Heras (Lallemand, Inc, Península Ibérica) for providing us with yeast strains.

REFERENCES

- Silva Filho EA, Melo HF, Antunes DF, Santos SKB, Monte Resende A, Simoes DA, *et al*, Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**:481–486 (2005).
- Bekers M, Linde R, Upite D, Kaminska E and Viesturs U, Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres. *Acta Biotechnol* **21**:89–96 (2001).
- Zaldivar J, Nielsen J and Olsson L, Minireview fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:17–34 (2001).
- Karel SF, Libicki SB and Robertson CR, The immobilization of whole cells-engineering principles. *Chem Eng Sci* **40**:1321–1354 (1985).
- Willaert R, Cell immobilization and its applications in biotechnology: current trends and future prospects, in *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, 2nd edn, ed by El-Mansi EMT, Bryce CFA, Demain AL and Allman AR. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 287–361 (2007).
- Williams D and Munnecke DM, The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnol Bioeng* **23**:1813–1825 (1981).
- Sakurai A, Nishida Y, Saito H and Sakakibara M, Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *J Biosci and Bioeng* **90**:526–529 (2000).
- Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R and Koutinas AA, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* **21**:377–397 (2004).
- Strehaiano P, Portugal FR, Tailandier P, Yeast as biocatalysts, in *Yeasts in Food and Beverages*, ed by Querol A and Fleet GH. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 243–285 (2006).
- Baptista CMSG, Cóias JMA, Oliveira ACM, Oliveira NMC, Roche JMS, Dempsey MJ, *et al*, Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme Microbiol Technol* **40**:127–131 (2006).
- Webb C, Fukuda H and Alkinson B, The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. *Biotechnol Bioeng* **28**:41–50 (1986).
- Tanaka A and Kawamoto T, Cell and enzyme immobilization, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd edn, ed by Demain AL, *et al*, ASM Press, Washington, pp. 94–102 (1999).
- Peinado RA and Mauricio JC, Biologically aged wines, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, ed by Moreno-Arribas MV and Polo MC. Springer, New York, pp. 81–101 (2009).
- Webb C, Black GM and Alkinson B, *Process Engineering Aspects of Immobilised Cell Systems*. The Institution of Chemical Engineers, Rugby (1986).
- Fontana A, Chraibi M, Guiraud JP and Ghommidh C, Diffusivity measurement in a flocculating yeast layer. *Biotechnol Techniques* **5**:133–138 (1991).
- Wieczorek A and Michalski H, Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidized bed bioreactor. *FEMS Microbiol Rev* **14**:69–74 (1994).
- Paiva TC, Sato S, Visconti AE and Castro LA, Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Appl Biochem Biotechnol* **57–58**:535–541 (1996).
- Martínez P, Pérez L and Benítez T, Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino Sherry wine. *Am J Enol Vitic* **48**:160–168 (1997).
- Yasuda H, Koga T and Fukuoka T, *In vitro* and *in vivo* models of bacterial biofilms. *Methods Enzymol* **310**:577–595 (1999).
- Gutiérrez P, Roldán A, Caro I and Pérez L, Kinetic study of the velum formation by *Saccharomyces cerevisiae* (*beticus* ssp.) during the biological aging of wines. *Process Biochem* **45**:493–499 (2010).
- Robledo-Ortiz JR, Ramírez-Arreola DE, Gomez C, González-Reynoso O and González-Núñez R, Bacterial immobilization by adhesion onto agave-fiber/polymer foamed composites. *Bioresource Technol* **101**:1293–1299 (2010).
- Kiran Sree N, Sridhar M, Suresh K, Banat IM and Venkateswar Rao L, High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **24**:222–226 (2000).
- Corton E, Piuri M, Battaglini F and Ruzal SM, Characterization of *Lactobacillus* carbohydrate fermentation activity using immobilized cells technique. *Biotechnol Prog* **16**:59–63 (2000).
- Nursevin HO, Yasemin A, Karadag E, Isikver Y and Saraydin D, Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme Microbiol Technol* **32**:114–119 (2003).
- Kourkoutas Y, Kanellaki M and Koutinas AA, Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT* **39**:980–986 (2006).
- Chronopoulos G, Bekatorou A, Bezirtzoglou E, Kalifas A, Koutinas AA and Marchant R, Lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* in free cell form and immobilized on gluten pellets. *Biotechnol Lett* **24**:1223–1236 (2002).
- Liang L, Zhang Y, Zhang L, Zhu M, Liang S and Huang Y, Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**:1605–1613 (2008).
- Nguyen DN, Ton NMN and Le VVM, Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bacterial cellulose by 'adsorption-incubation' method. *Int Food Res J* **16**:59–64 (2009).
- Kandylis P, Manousi ME, Bekatorou A and Koutinas AA, Freeze-dried wheat supported biocatalyst for low temperature wine making. *LWT-Food Sci Technol* **43**:1485–1493 (2010).
- Reddy LV, Reddy LP, Wee YJ and Reddy OVS, Production and characterization of wine with sugarcane piece immobilized yeast biocatalyst. *Food Bioprocess Technol* **4**:142–148 (2011).
- Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM and Marchant R, Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technol* **98**:860–865 (2007).
- Tsakiris A, Kandylis P, Bekatorou A, Kourkoutas Y and Koutinas AA, Dry red wine making using yeast immobilized on cork pieces. *Appl Biochem Biotechnol* **196**:1316–1326 (2010).
- Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, Gonzalez-Reyes JA, Ortega JM and Mauricio JC, Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications. *Enz Microbiol Technol* **40**:79–84 (2006).
- Yang Y, Hu H, Wang G, Li Z, Wang B, Jia X, *et al*, Removal of malachite green from aqueous solution by immobilized *Pseudomonas* sp. DY1 with *Aspergillus oryzae*. *Int Biodeter Biodegrad* **65**:429–434 (2011).
- Ortiz-Muñiz B, Carvajal-Zarrabal O, Torrestiana-Sanchez B and Aguilar-Uscanga MG, Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *J Chem Technol Biotechnol* **85**:1361–1367 (2010).
- Zheng DQ, Wu XCh, Tao XL, Wang PM, Li P, Chi XQ, *et al*, Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresource Technol* **102**:3020–3027 (2011).
- García-Martínez T, Maestre O, Peinado R, Moreno J and Mauricio JC, Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares, in *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas, Spain*, ed Junta de Extremadura, Badajoz, pp. 102–104 (2007).

- 38 García-Martínez T, Peinado R, Moreno J, García-García I and Mauricio JC, Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilisation of yeast. *J Chem Technol Biotechnol* **86**:812–817 (2011).
- 39 Bely M, Sablayrolles JM and Barre P, Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng* **70**:246–252 (1990).
- 40 Sablayrolles JM, Barre P and Grenier P, Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol Tech* **1**:181–184 (1987).
- 41 Crowell EA and Ough CS, A modified procedure for alcohol determination by dichromate oxidation. *Am J Enol Vitic* **30**:61–63 (1979).
- 42 Vargas A, Duque Z and Romero M, Sonication parameters for detachment and study of biocorrosion's biofilms. *Rev Tec In Univ Zulia* **30**:216–224 (2007).
- 43 Mauricio JC and Ortega JM, Nitrogen compounds in wine during its biological aging by two flor film yeasts: an approach to accelerated biological aging of dry sherry-type wines. *Biotechnol Bioeng* **53**:159–167 (1997).
- 44 Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Ortega JM and Mauricio JC, Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* **110**:34–42 (2006).
- 45 Lachance MA and Pang WM, Predacious yeasts. *Yeast* **13**:225–232 (1997).
- 46 Nissen P, Nielsen D and Arneborg N, Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* **20**:331–341 (2003).
- 47 Scott JA and O'Reilly AM, Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem* **31**:111–117 (1996).
- 48 Lebeau T, Jouenne T and Junter GA, Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by coimmobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**:309–313 (1998).
- 49 Fujii N, Oki T, Sakurai A, Suye S and Sakakibara M, Ethanol production from starch by immobilized *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus* using cellulose carriers. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**:52–57 (2001).
- 50 El-Komy HMA, Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol Biotechnol* **43**:19–27 (2005).
- 51 Najafpour G, Younesi H, Syahidah K and Ismail K, Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol* **92**:251–260 (2004).
- 52 Rakin M, Mojovic L, Nikolic S, Vukasinovic M and Nedovic V, Bioethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells. *Afr J Biotechnol* **8**:464–471 (2009).
- 53 Bekatorou A, Sarellas A, Ternan NG, Mallouchos A, Komaitis M, Koutinas AA, *et al*, Low-temperature brewing using yeast immobilized on dried figs. *J Agric Food Chem* **50**:7249–7257 (2002).
- 54 Nigam JN, Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J Biotechnol* **80**:189–193 (2000).
- 55 Mallouchos A, Reppa P, Aggelis G, Kanellaki M, Koutinas AA and Komaitis M, Grape skins as a natural support for yeast immobilization. *Biotechnol Lett* **24**:1331–1335 (2002).
- 56 Ma M and Liu ZL, Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:829–845 (2010).
- 57 Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ and Stanley GA, The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **109**:13–24 (2010).

4.3. CAPÍTULO III: Aplicación de levaduras seleccionadas osmotolerantes libres y coinmovilizadas para la producción de vinos dulces

En este último capítulo, dividido en dos apartados, se presentan las aplicaciones de las cepas de levaduras seleccionadas en la producción de vinos dulces con fermentación parcial.

En el primer apartado del Capítulo III, se incluyen los resultados que se han publicado de la fermentación parcial de mostos dulces con las dos cepas seleccionadas osmoetanol tolerantes en forma libre y la discriminación de los vinos resultantes por cromatografía de gases y nariz electrónica en la revista científica Food Chemistry.

En el segundo apartado del Capítulo III, se muestran los resultados que están pendientes de publicación sobre la aplicación de las biocápsulas de estas cepas seleccionadas como osmotolerantes para la producción de vino dulce parcialmente fermentado. Este trabajo de investigación ha sido enviado a la revista científica Food Chemistry. Actualmente, se encuentra en “estado de revisión”.

4.3.1. Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose

En este apartado se estudia la diferenciación de los vinos dulces obtenidos por fermentación parcial procedentes de uva Pedro Ximénez pasificada con alta concentración en azúcares con respecto los vinos no fermentados. Para ello, mostos muy azucarados (371 g/L de azúcares) se fermentaron parcialmente con dos cepas de levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* (X4 y X5) hasta un 12 % (v/v) de etanol. Las cinéticas de fermentación con ambas cepas fueron parecidas, pero los vinos obtenidos con la cepa X4 mostraron menor acidez volátil, además de mayor concentración en metanol, 1-propanol, 2 feniletanol, acetaldehído, 2,3 butanodiol y glicerol. Mediante el uso de nariz electrónica y cromatografía de gases se ha podido distinguir entre los vinos dulces parcialmente fermentados de los elaborados de forma tradicional.



Analytical Methods

Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol-tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose

Teresa García-Martínez^a, Andrea Bellincontro^b, María de las Nieves López de Lerma^c, Rafael Andrés Peinado^c, Juan Carlos Mauricio^a, Fabio Mencarelli^b, Juan José Moreno^{c,*}

^a Departamento de Microbiología, University of Córdoba, Spain

^b DISTA, Laboratorio Postraccolta, Tuscia University, Italy

^c Departamento de Química Agrícola y Edafología, University of Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2010

Received in revised form 29 December 2010

Accepted 27 January 2011

Available online 3 February 2011

Keywords:

Sweet wine

Partial fermentation

Osmotolerant yeasts

Volatile compounds

Polyols

Electronic nose

ABSTRACT

Some special sweet wines are obtained by partial fermentation of musts from off-vine dried grapes containing large amounts of sugars. This process is very slow and subject to serious stop problems that can be avoided by using osmo-ethanol-tolerant yeasts. Musts containing 371 g/l of sugars were partially fermented with selected *Saccharomyces cerevisiae* strains, X4 and X5, to 12% (v/v) and the wines obtained with X5 exhibited a higher volatile acidity but lower concentrations of higher alcohols, carbonyl compounds and polyols than those obtained with X4. A principal component analysis (PCA) of the data provided by an electronic nose (E-nose) afforded discrimination between fermented and unfermented musts, but not between wines obtained with X4 or X5. The PCA applied to the major volatile compounds and polyols shows similar results, but a clear discrimination between wines is obtained by removing the polyols glycerol and 2,3-butanediol from the PCA.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Musts from off-vine dried grapes contain large amounts of sugars and are used to obtain special sweet wines in some semi-arid viticultural areas around the world. Alcoholic fermentation in these wines is very slow and subject to serious stop problems that can be avoided by using yeasts tolerant of high sugar and ethanol concentrations. Off-vine dried grapes of the Pedro Ximenez variety provide special sweet wines of a high quality. Musts from such grapes are dark brown in colour, highly dense and viscous, and possess a typical aroma and sugar content in the region of 400 g/l. Such high sugar content alters yeast activity and can substantially delay or even stop alcoholic fermentation through the adverse effects of a high osmotic pressure and ethanol toxicity on the viability of yeasts, which exhibit a decreased activity in glucose transfer under these conditions (Salmon, Vincent, Mauricio, Bely, & Barre, 1993). Fermentation in sugar-rich media is known to lead to wines with a high volatile acidity (Caridi, Crucitti, & Ramondino, 1999) and impaired quality, as a result.

Saccharomyces cerevisiae strains exhibit an altered fermentation activity under stressing conditions (Zuzuarregui & Del Olmo, 2004a). Some authors have proposed strain selection procedures based on tolerance of such conditions (Zuzuarregui & Del Olmo,

2004b) and others have examined gene expression in response to high concentrations of glucose (Erasmus, Van Der Merwe, & Van Vuuren, 2003). In any case, the response of yeasts to such special conditions is rather complex and influenced by a number of factors, so selecting the optimum strain for each purpose entails using appropriate winemaking tests.

Identification sensors capable of detecting metabolic changes during fermentation, or in end-products, such as wine, can be highly useful for oenological research. Thus, an electronic nose (E-Nose) is an effective compendium tool for studying volatile compounds, with wide adoption by the food industry (Di Natale et al., 1999; Schaller, Bosset, & Escher, 1998). Especially with wine, E-noses have been used for vintage or variety discrimination (Aleixandre et al., 2008; Buratti, Benedetti, Scampicchio, & Pangerod, 2004; Di Natale, Davide, D'Amico, Nelli, & Sberveglieri, 1995; García, Aleixandre, Gutiérrez, & Horrillo, 2006; Lozano et al., 2006), vineyard recognition (Di Natale et al., 1996), quality characteristic discrimination in combination with an electronic tongue (Di Natale et al., 2004) or near infrared spectroscopy (Cozzolino et al., 2006) and the detection of *Brettanomyces* contamination (Cynkar, Cozzolino, Damberg, Janik, & Gishen, 2007). Comparatively less attention has been paid to the use of E-noses for discriminating sweet wines obtained by fermentation with various types of yeasts or unfermented musts from dried grapes of the same variety, fermentation processes for sweet wines or the monitoring of metabolic changes in grape musts and wines.

* Corresponding author. Tel.: +34 957 218636; fax: +34 957 212146.

E-mail address: qe1movij@uco.es (J.J. Moreno).

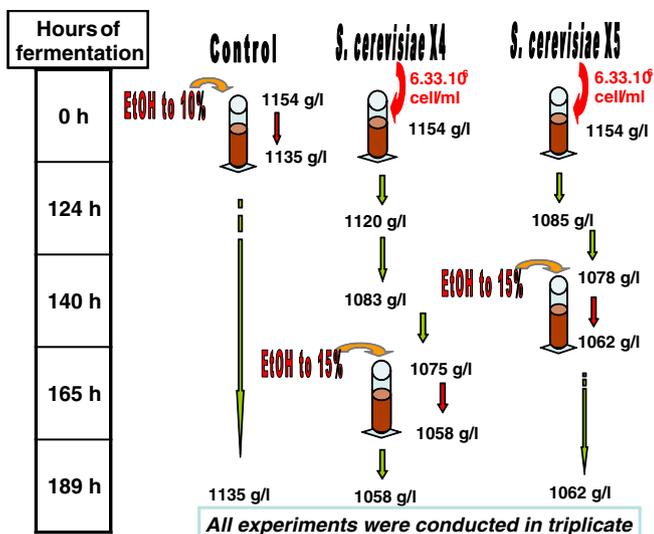


Fig. 1. Experiments designed to study partial fermentation with two *S. cerevisiae* osmo-ethanol-tolerant strains.

Nevertheless, the last application has been used recently to study the postharvest dehydration process of wine grapes (Bellincontro et al., 2009; Santico, Bellincontro, De Santis, Di Natale, & Mencarelli, 2010).

This paper reports the results obtained by using an E-nose in combination with gas chromatography, to identify changes in fermentation processes effected by pure starter cultures of osmo-ethanol-tolerant *S. cerevisiae* yeasts (strains X4 and X5) added to musts from off-vine dried Pedro Ximenez grapes.

2. Material and methods

2.1. Must, prefermentative corrections and fermentation conditions

The must used, obtained from Pedro Ximenez partially dried grapes, had a density of 1154.3 ± 1.5 g/l, equivalent to a reducing sugar content of 373 ± 4 g/l and a 22% (v/v) ethanol potential, in addition to a titratable acidity of 3.31 ± 0.07 g/l (expressed as tartaric acid), a volatile acidity (as acetic acid) of 0.07 ± 0.01 and a pH of 4.30 ± 0.02 .

Prior to fermentation, the must was corrected by addition of tartaric acid to a pH of 3.8, and supplied with potassium metabisulphite to a concentration in SO_2 of 50 mg/l. The available volume of must was split into nine fractions (750 ml each) that were placed in 1 l cylinders, 3 of the 9 samples being subjected to no fermentation by adding ethanol up to 10% v/v and used as controls. The other six samples were split into two batches of three for application of the two strain yeasts. All cylinders were plugged with hydrophobic cotton and immersed in a thermostatted water bath at 24 °C.

2.2. Yeasts and starter cultures

Fermentation tests were conducted with *S. cerevisiae* strains X4 (CECT13014) and X5 (CECT13015) previously isolated during spontaneous fermentation of musts from partially dried Pedro Ximenez grapes. These strains were selected on the grounds of their tolerance of high osmotic pressures and ethanol contents by García-Martínez, Maestre, Peinado, Moreno, and Mauricio (2007). The starter cultures were prepared by growing each strain separately in YPD medium at 28 °C for 2 h, which was followed by centrifugation and washing with distilled water. The yeast

population inoculated to each must sample contained 6.33×10^6 cells/ml and each fermentation run was performed in triplicate. Samples of the same must, fortified with wine alcohol to 10% (v/v) ethanol content, were used as controls. Fig. 1 depicts the experimental procedure.

2.3. Analytical methods

2.3.1. Cell counts

Cell counts were obtained with Z2 Coulter equipment from Beckman and the fermentation kinetics monitored via the density measures.

2.3.2. Oenological analyses

Ethanol, titratable acidity, pH and volatile acidity were determined in accordance with the European Union Official Methods (CEE, 1990).

2.3.3. Major volatile aroma compounds and polyols

Methanol and major higher alcohols (propan-1-ol, isobutanol, isoamyl alcohols and 2-phenyl-ethanol), carbonyl compounds (acetaldehyde and acetoin), various esters (ethyl acetate, ethyl lactate and ethyl succinate) and the polyols glycerol and 2,3-butane-diol were quantified with a Model 6890 gas chromatograph from Agilent (Palo Alto, CA) using the method of Peinado, Moreno, Muñoz, Medina, and Moreno (2004). A CP-WAX 57 CB capillary column (60 m long \times 0.25 mm i.d., 0.4 μm film thickness) from Varian (Palo Alto, CA) was used, and 0.5 μl aliquots from 10 ml samples (previously supplied with 1 ml of 1 g/l 4-methyl-2-pentanol as internal standard) were injected into the split/splitless injector of the GC instrument. Tartaric acid in the wine was removed by precipitation with 0.2 g of calcium carbonate and centrifugation at 4100g and 4 °C. Quantitation was based on the response factors for standard solutions of each compound. A split ratio of 30:1, an FID type detector, and a temperature programme involving an initial temperature of 50 °C (15 min), a 4 °C/min ramp and a final temperature of 190 °C (35 min) were used. The injector and detector temperatures were 270 and 300 °C, respectively. The flow rate of carrier gas (helium) was initially set at 0.7 ml/min (16 min) and followed by a 0.2 ml/min ramp to the final value (1.1 ml/min), which was held for 52 min.

2.3.4. Electronic nose

The E-nose used was designed, developed and assembled at the University of Rome Tor Vergata. The nose uses an array of eight quartz microbalances (QMBs), each QMB being an electromechanical resonator, the resonant frequency of which changes in proportion to the material adsorbed onto its sensor surface. The sensors were AT-cut quartz plates oscillating at a resonance frequency of 20 MHz in the thickness shear mode. Quartz drives electronic oscillators whose frequency is barely similar to the mechanical resonance frequency. QMBs were functionalised by deposition of solid state layers of metalloporphyrins. Metalloporphyrins have been widely investigated as fundamental blocks for artificial olfactory receptors (Di Natale, Paolesse, & D'Amico, 2007). All metalloporphyrins were metal complexes of 5,10,15,20-tetrakis-(4-butylphenoxy)porphyrin; the metals, which differed between sensors, included cobalt, zinc, iron, tin, copper, manganese, ruthenium and chromium. Sensing layers were deposited onto both faces of each QMB by spray-casting of the metalloporphyrins dissolved in a suitable solvent (10^{-3} M in CHCl_3). In order to control the amount of metalloporphyrin film deposited, the resonance frequency of each QMB was measured on-line with a high-stability frequency counter during deposition. A frequency variation of ca. 60 kHz was obtained for all deposited layers. The array was controlled by software run on a computer that was used to acquire and

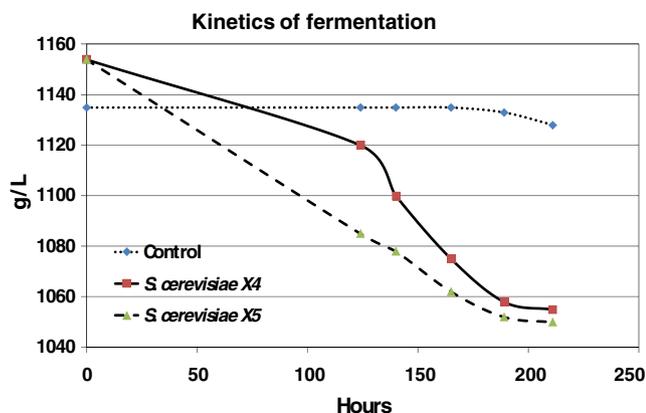


Fig. 2. Density (g/l) during the testing of control (unfermented) must and fermentation with two selected osmo-ethanol-tolerant *S. cerevisiae* yeast strains X4 and X5.

process the sensor signals. The sampling protocol for must and wines measurement involved the following steps: a volume of 5 ml of sample was collected in a flask to which 5 ml of saturated CaCl_2 solution was added; the flasks were then placed in a thermostatted bath at 20 ± 2 °C, under continuous stirring provided by a small magnetic bar for 30 min; then, the equilibrated headspace was extracted using a stream of air filtered through a trap filled with granular anhydrous calcium chloride and delivered into the E-nose sensor cell. Finally, a pure nitrogen stream was used to clean the sensors for establishment of the reference signal. Sensor signals were calculated as the resonant frequency shifts between the two steady conditions corresponding to sensors exposed to pure nitrogen and to the sample diluted in filtered air. The body of sensor signals formed a pattern (fingerprint) encoding the global composition of the headspace. Three different samples collected from the three cylinders prepared for each treatment (one control and two yeast strain applications) were analysed in triplicate. The mean values of the obtained results were successively used for principal component analysis (PCA) calculations.

2.3.5. Statistical analysis

Each sample was measured in triplicate and the resulting mean used for analysis. The data provided by both the E-nose and GC analysis were subjected to PCA, using The Unscrambler® v. 9.2 soft-

ware (CAMO ASA, Oslo, Norway). In data matrices employed for multivariate statistical applications, the variable sets were represented by the eight averaged measurements of different sensors for each sample, and by the 13 averaged quantifications of volatile compounds for each sample, respectively, for E-nose and GC analyses. Data coming from E-nose detection were linearly normalised before PCA application. Results were validated by full internal cross validation.

3. Results and discussion

Figs. 1 and 2 show the procedure followed for the partial fermentation of the musts and their fermentation kinetics. As can be seen, the musts supplied with strain X5 exhibited an increased fermentation rate; thus, their density amounted to 1078 g/l (versus 1083 g/l with X4) after 140 h.

Fermentation was stopped by adding wine alcohol to 15% (v/v) when the density of each must fell to about 1075 g/l. This took 140 h with strain X5 and 165 h with X4. The amounts of ethanol produced, until then, by both yeasts were identical: 12% (v/v).

The addition of ethanol reduced the density to 1055 g/l. At that point, the content in sugars of the musts was 170 g/l. Following addition of the alcohol, the density exhibited a small decrease due to settling of suspended particles in the bottom of the musts.

The control tests involved the addition of ethanol to the initial unfermented must to a content of 10% (v/v), as is the traditional method used for the elaboration of these special wines, avoiding their alcoholic fermentation. This reduced the density, initially to 1135 g/l and then to 1127 g/l by effect of settling of solid particles during the test.

All completed tests were finished 211 h after the starter cultures – or ethanol in the control test – were added. Then, the samples were subjected to non-destructive analysis with E-nose and destructive analysis with chemical methods. Table 1 shows the results obtained with the chemical and gas chromatographic analysis, as well as those of a multiple comparison procedure to identify any means significantly different from the others by using Bonferroni's method.

The average contents of titratable and volatile acidity allowed the three homogeneous groups, in accordance with the three types of musts, to be accurately discriminated at the 95% confidence level (CL). By contrast, the ethanol content and density only distinguished between fermented and unfermented musts, and pH values were essentially identical for all must types. The volatile

Table 1

Chemical analysis of wines obtained by fermentation with osmo-ethanol-tolerant yeast strains X4 and X5, and a control consisting of unfermented must.

Fraction or compound	Control			<i>S. cerevisiae</i> X4			<i>S. cerevisiae</i> X5		
	Mean	SD	HG	Mean	SD	HG	Mean	SD	HG
Titratable acidity (g/l)	4	0.2	a	7.1	0.2	c	6.13	0.02	b
Volatile acidity (g/l)	0.32	0.06	a	1.2	0.0	b	1.8	0.3	c
pH	3.83	0.01	a	3.8	0.09	a	3.86	0.04	a
Density (g/l)	1127	7	b	1055	4	a	1050	10	a
Ethanol% v/v	9.9	0.2	a	14.7	0.5	b	15.2	0.2	b
Methanol (mg/l)	124	9	a, b	163	25	b	113	10	a
1-Propanol (mg/l)	ND	0	a	57	3	c	17	2	b
Isobutanol (mg/l)	ND	0	a	29	1	b	27	2	b
Isoamyl alcohol (mg/l)	4	0.5	a	146	2	b	146	4	b
2-Phenylethanol (mg/l)	13	2	a	28	1	c	20	1	b
Acetaldehyde (mg/l)	10	0.3	a	76	2	c	56	3	b
Acetoin (mg/l)	121	4	b	82	12	a	70	2	a
Ethyl acetate (mg/l)	19	2	a	29.4	0.5	b	30	2	b
2,3-Butanediol <i>m + l</i> (g/l)	0.14	0.01	a	2.4	0.2	c	1.9	0.1	b
Glycerol (g/l)	2.24	0.06	a	12	1	c	9	1	b

ND = not detected. H.G.: homogeneous groups among three wine types for each compound. Different letters denote significant differences at the 95% level in Bonferroni's test.

compounds studied are known to be produced during alcoholic fermentation and related to the particular yeast species or race used (Moreno, Millan, Ortega, & Medina, 1991; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2000). In fact, 7 of the 11 volatiles exhibited significant differences in content (95% CL) between the unfermented must and the two fermented musts. The methanol contents in the control musts can be grouped (95% CL) in each homogeneous group formed by every fermented must. Three compounds (1,1-diethoxyethane, ethyl lactate and diethyl succinate) exhibited no significant differences in this context and they showed no detectable contents in any samples, so they are not shown in the Table 1. The musts fermented with the two yeast strains exhibited significantly different contents of four volatiles (namely methanol, propanol, 2-phenylethanol and acetaldehyde), but statistically identical contents of isobutanol, isoamyl alcohols and acetoin. Especially prominent among carbonyl compounds were acetoin in the control must, in accordance with the results obtained by Franco, Peinado, Medina, and Moreno (2004), studying the grape drying process of Pedro Ximenez grapes and those obtained by Bellincontro et al. (2009) and Chkaiban et al. (2007). In contrast, the fermented musts exhibited increased contents of acetaldehyde and typical levels for acetoin; both compounds were produced to a slightly greater extent by the X4 yeast strain. Finally, the mean contents of the polyols, 2,3-butanediol and glycerol, differed significantly between musts and formed three homogeneous sample groups at CL = 95%. As is known, the osmo-tolerant yeasts, are able to synthesise and to retain high quantities of polyols, particularly glycerol (Nevoigt & Stahl, 1997) and some yeasts even possess pumps for the active reception of glycerol of the media (Myers, Lawlor, & Attfield, 1997).

In summary, the results of the chemical analysis show that strain X4 produces wine with a decreased volatile acidity and increased contents of propanol, 2-phenylethanol, 2,3-butanediol and glycerol relative to strain X5; also, the former strain exhibits slower fermentation kinetics.

The data values obtained by the sensors of the E-nose, for both fermented musts yeast strains, and also those for the control must (unfermented) were all very similar. The multiple sample comparison procedure reveals no significant differences, for each sensor, between different samples, and a greater difference between sensor values within each sample type.

The wines obtained were subjected to blind tasting by experts from the collaborating winemaker; the tasters successfully discriminated the three types of wine and gave the highest score to that obtained by partial fermentation with strain X5.

Both the results obtained with the E-nose and those provided by gas-chromatographic analysis suggest the need to use advanced statistical procedures to distinguish the three types of wine, with a view to approaching the discriminating sensory ability of the tasters.

We chose to use PCA of linearly normalised data for this purpose. Normalising the data ensured efficient suppression of quantitative effects on the multivariate data. The efficiency of this procedure is a result of the linear dependence of the sensor signal on the amount of molecules in air penetrating through the E-nose. In order to illustrate the procedure, let us consider that sensors are exposed to a single gas whose concentration is c and that each sensor responds with a frequency shift $- \Delta f_i$, where i is related to the array sensor; if the linearity assumption holds, then each sensor will possess a characteristic sensitivity K_i to the gas in question. In this way, the signal of the i -th sensor can be defined as $\Delta f_i = K_i \cdot c$

Linear normalisation here involves calculating a reduced variable by dividing each sensor signal into the sum of the signals for all sensors in the array:

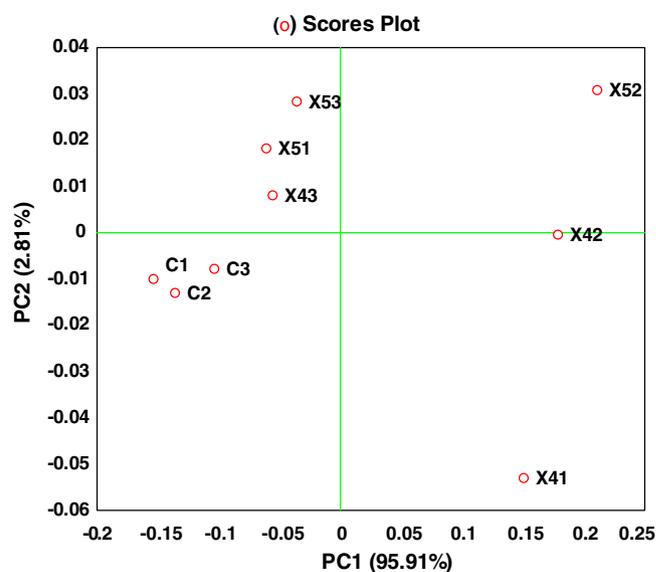


Fig. 3. Plot of sample scores in the principal components obtained with the electronic nose data C1; C2; C3: control sweet wines (unfermented). X41; X42; X43: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X4. X51; X52; X53: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X5.

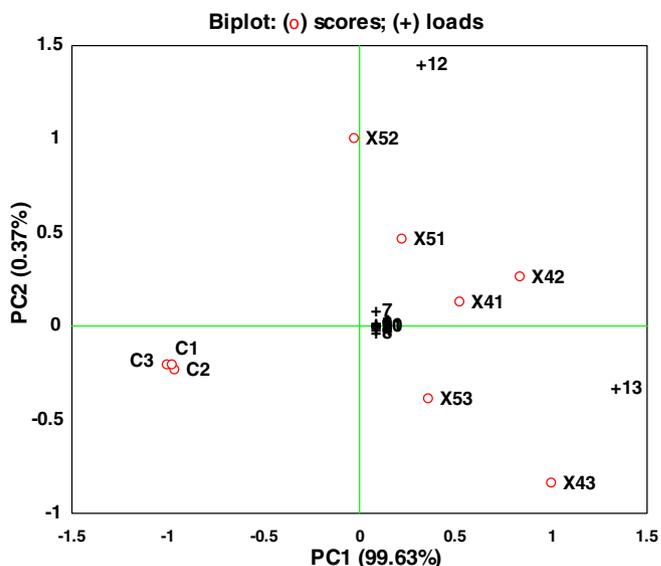


Fig. 4. Biplot of sample scores and variable loads obtained by principal components analysis of all the compounds quantified by GC-analysis. C1; C2; C3: control sweet wines (unfermented). X41; X42; X43: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X4. X51; X52; X53: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X5.

$$\Delta f_{N_i} = \frac{\Delta f_i}{\sum_j \Delta f_j} = \frac{K_i \cdot c}{\sum_j K_j \cdot c} = \frac{K_i}{\sum_j K_j}$$

where the summation is extended to the $-j-$ sensors. As a result of the normalisation, the variable Δf_N is no longer dependent on the concentration. The efficiency of this procedure has been demonstrated with an experiment involving the identification of gases and vapours at different concentrations (Di Natale et al., 1999). Since linear normalisation reduces the influence of the concentrations of volatiles in the sample, it also reduces correlation between sensor responses. As a consequence, applying PCA to the normalised

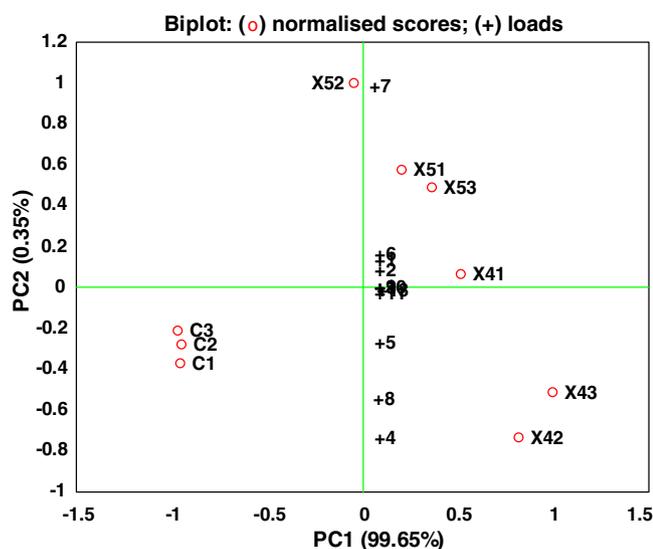


Fig. 5. Biplot of sample scores and variable loads obtained by principal components analysis of all the compounds quantified by GC-analysis excluding 2,3-butanediol (+12) and glycerol (+13). C1; C2; C3: control sweet wines (unfermented). X41; X42; X43: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X4. X51; X52; X53: sweet wines obtained by must fermented with *S. cerevisiae* strain X5.

data results in the number of significant principal components exceeding that for a PCA of the original responses.

As can be seen in Fig. 3 for the PCA of sensor data, principal component 1 (PC1) explained 95.91% of the overall variance and the sensor numbered 5 had the strongest effect on it. In addition, PC2 accounted for only 2.81% of the variance and sensor 3 was its greatest contributor.

Fig. 4 shows results of the PCA for the gas chromatographic analysis, using, as variables: acetaldehyde (1); ethyl acetate (2); methanol (4); 1-propanol (5); isobutanol (6); isoamyl alcohol (7); acetoin (8); 2-phenylethanol (11); 2,3-butanediol (*meso* + *levo* forms) (12); glycerol (13). This figure shows that PC1 explains 99.63% of the overall variance and the variables numbered 12 and 13 were its most significant contributors. On the other hand, PC2 accounted for only 0.37% of the variance.

The score plots of the samples in relation to the PCA results for the E-nose and gas chromatographic analysis are shown in Figs. 3 and 4. Based on Fig. 3, it seems difficult to properly discriminate between wines obtained by partial fermentation of must in the presence of yeast strains X4 and X5, even though distinction of the control (unfermented) wine from the two fermented wines is indeed possible with the E-nose. This is also the case with the gas chromatographic method, with which only the 2,3-butanediol and glycerol, among volatiles, contribute significantly to the variance, whereas other volatiles are completely overlapped.

Taking into account the similarity in the groups (established by PCA of the GC and E-nose data for the must types), we can draw some conclusions. Regarding the results obtained from the PCA of GC-quantified compounds, elimination of glycerol and 2,3-butanediol, the compounds with the highest values of explained variance in PC1, provides a clear discrimination between the two strains and between these and the control (Fig. 5). The same result is obtained by excluding each compound (glycerol or 2,3-butanediol) one at a time. Close to strain X5 we found volatile compound number 7 (isoamyl alcohol) while, in the same quadrant of strain X4, volatiles 4, 5 and 8 are localised (methanol, 1-propanol, and acetoin); 2,3-butanediol and glycerol, as polyols, are strong osmotic compounds and their presence in an osmotic strain is natural; their effects in terms of compounds quantified by GC was already evident. Indeed, PCA completely separated the two compounds in

Fig. 4, where no elimination was done. They were localised far from each other and also even from the other volatile compounds. When the elimination of the two polyols was performed, the higher concentrations of the compounds methanol, 1-propanol, and acetoin in wine produced from the X4 strain determined their presence in the same quadrant of this yeast strain, while isoamyl alcohol concentrations are similar in the two strains but, in the PCA, move with X5 strain. This result is important because it emphasises the difference between analyses performed by GC and by the E-nose. The latter is based on pattern recognition, and is unable to discriminate single compounds, regardless of the concentration.

4. Conclusions

Partial fermentation of musts from off-vine dried grapes with *S. cerevisiae* strains X4 and X5, selected by their tolerance of high sugar and ethanol contents, revealed that X4 had slower fermentation kinetics, and produced less volatile acidity, but more 2-phenylethanol, 2,3-butanediol and glycerol, than X5. However, the sweet wines obtained with X5 were better scored in a blind sensory test. The results of a PCA of the data obtained with an E-nose and those of major volatile compounds and polyols quantified by gas chromatography reveal that distinguishing of fermented and unfermented musts is possible. A discrimination between wines produced by the two yeast strains is obtained by excluding 2,3-butanediol and glycerol from the PCA of the compounds quantified by GC.

Acknowledgements

This work was funded by Spain's Ministry of Science and Innovation (INIA, Project RTA 2008-00056-C02-02), FEDER, the Spanish-Italian Integrated Action HI 2007-0017 and by an FPU scholarship of the Ministry of Education (announcement 2008). The authors are also grateful to Cooperativa San Acacio (Montemayor, Córdoba, Spain) and Bodega Alvear S.A. for their kind cooperation.

References

- Aleixandre, M., Lozano, J., Gutiérrez, F. J., Sayago, I., Fernández, M. J., & Horrillo, M. C. (2008). Portable electronic nose to classify different kind of wines. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 131, 71–76.
- Bellincontro, A., Nicoletti, I., Valentini, M., Tomas, A., De Santis, D., Corradini, D., & Mencarelli, F. (2009). Integration of non-destructive techniques with destructive analyses to study postharvest water stress of wine grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 348 60(1), 57–65.
- Buratti, S., Benedetti, S., Scampicchio, M., & Pangerod, E. C. (2004). Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 525, 133–139.
- Caridi, A., Crucitti, P., & Ramondino, D. (1999). Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. *Biotechnological Letters*, 21, 617–620.
- CEE, 1990. Diario oficial de la comunidad europea L-272. Mundi-Prensa, Madrid.
- Chkaiban, L., Botondi, R., Bellincontro, A., De Santis, D., Kefalas, P., & Mencarelli, F. (2007). Influence of postharvest water stress on LOX, ADH and aroma biochemistry of Gewürztraminer grape dehydrated under controlled and uncontrolled thermohygro-metric conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 142–149.
- Cozzolino, D., Smyth, H. E., Lattey, K. A., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R., et al. (2006). Combining mass spectrometry based electronic nose, visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 319–324.
- Cynkar, W., Cozzolino, D., Damberg, R., Janik, L., & Gishen, M. (2007). Feasibility study on the use of a head space mass spectrometry electronic nose (MS e_nose) to monitor red wine spoilage induced by *Brettanomyces* yeasts. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 124, 167–171.
- Di Natale, C., Davide, F. A. M., D'Amico, A., Nelli, P., Groppelli, S., & Sberveglieri, G. (1996). An electronic nose for the recognition of the vineyard of a red wine. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 33, 83–88.
- Di Natale, C., Davide, F. A. M., D'Amico, A., Nelli, P., & Sberveglieri, G. (1995). Complex chemical pattern recognition with sensor array: the discrimination of vintage year of wine. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 25, 801–804.

- Di Natale, C., Paolesse, R., Burgio, M., Martinelli, E., Pennazza, G., & D'Amico, A. (2004). Application of metalloporphyrins-based gas and liquid sensor arrays to the analysis of red wine. *Analytica Chimica Acta*, *513*, 49–56.
- Di Natale, C., Paolesse, R., & D'Amico, A. (2007). Metalloporphyrins based artificial olfactory receptors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *121*(1), 238–246.
- Di Natale, C., Paolesse, R., Macagnano, A., Troitsky, V. I., Berzina, T. S., & D'Amico, A. (1999). Pattern recognition approach to the study of the interactions between metalloporphyrin Langmuir–Blodgett films and volatile organic compounds. *Analytica Chimica Acta*, *384*, 249–259.
- Erasmus, D. J., Van Der Merwe, G. K., & Van Vuuren, H. J. J. (2003). Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, *2*, 375–399.
- Franco, M., Peinado, R. A., Medina, M., & Moreno, J. (2004). Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximenez grape variety. *Journal Agricultural Food Chemistry*, *52*, 3905–3910.
- García, M., Aleixandre, M., Gutiérrez, J., & Horrillo, M. C. (2006). Electronic nose for wine discrimination. *Sensors and Actuators B*, *113*, 911–916.
- García-Martínez, T., Maestre, O., Peinado, R. A., Moreno, J., & Mauricio, J. C. (2007). Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares. In: Consejería de Economía y Trabajo (Ed.), *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red Gienol al sector Vitivinícola. Gienol 2007*. Junta de Extremadura. ISBN: 978-84-690-6060-05. Badajoz, Spain.
- Lozano, J., Fernández, M. J., Fontecha, J. L., Aleixandre, M., Santos, J. P., Sayago, I., et al. (2006). Wine classification with a zinc oxide SAW sensor array. *Sensor and Actuators B: Chemical*, *120*, 166–171.
- Moreno, J. J., Millan, C., Ortega, J. M., & Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal Industrial Microbiology*, *7*, 181–189.
- Myers, D. K., Lawlor, D., & Attfield, P. V. (1997). Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *S. cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, *63*(1), 145–150.
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *21*(3), 231–241.
- Peinado, R. A., Moreno, J. A., Muñoz, D., Medina, M., & Moreno, J. (2004). Gas-chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *52*, 6389–6393.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2000). *Handbook of enology (Vol. 1)*. New York: Wiley.
- Salmon, J. M., Vincent, O., Mauricio, J. C., Bely, M., & Barre, P. (1993). Sugar-transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *American Journal Enology Viticulture*, *1*, 56–64.
- Santonico, M., Bellincontro, A., De Santis, D., Di Natale, C., & Mencarelli, F. (2010). Electronic nose to study postharvest dehydration of wine grapes. *Food Chemistry*, *121*, 789–796.
- Schaller, E., Bosset, J. O., & Escher, F. (1998). Electronic noses and their application to food: a review. *Food Science Technology – Lebensm-Wiss Technology*, *31*, 305–316.
- Zuzuarregui, A., & Del Olmo, M. (2004a). Expression of stress genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Research*, *4*, 699–710.
- Zuzuarregui, A., & Del Olmo, M. (2004b). Analysis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion from wine yeast selection. *Antonie Leeuwenhoek*, *85*, 271–280.

4.3.2. Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes

En este trabajo se ha estudiado y comparado los compuestos volátiles de los vinos obtenidos por fermentación parcial con cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* X4 y X5 coinmovilizadas con el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum*, los vinos obtenidos con las mismas cepas osmotolerantes sin inmovilizar y los vinos dulces obtenidos de forma tradicional sin fermentación del mosto.

El análisis de los compuestos volátiles agrupados según las series aromáticas reveló que los mostos fermentados parcialmente mostraron una mayor complejidad aromática que aquellos obtenidos de forma tradicional, destacando las series fruta madura, láctea y química. Los volátiles con mayor impacto en el aroma, en términos de actividad odorante, fueron etil hexanoato, etil octanoato, butirolactona, alcoholes isoamílicos, acetaldehído, etil acetato, 2,3-butanodiol, acetoína y 2,3-butanodiona.

Se aplicó un análisis de conglomerados según el método de Ward para evaluar la semejanza entre los vinos dulces elaborados de forma tradicional y los vinos obtenidos por fermentación parcial con células de levadura libre e inmovilizada, reveló por un lado, pequeñas diferencias entre los vinos obtenidos con las dos formas de inocular la levadura, y por otro, marcó grandes diferencias entre la forma de elaboración de los vinos dulces, distinguiendo entre los vinos parcialmente fermentados de los elaborados tradicionalmente. Según el análisis sensorial, los vinos mejor valorados fueron con levadura coinmovilizada, especialmente aquellos elaborados con la cepa X4.

1 **Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro**
2 **Ximénez grapes.**

3

4 **García-Martínez, T.**²; López de Lerma, N.¹; Moreno, J.¹; Mauricio, J.C.²; Peinado,
5 R.A.^{1*}

6

7 ¹ Departamento de Química Agrícola y Edafología. Edificio Marie Curie. Campus
8 Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba.

9 ² Departamento de Microbiología. Edificio Severo Ochoa. Campus Universitario de
10 Rabanales. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba.

11

12 **Running title:** Volatile composition of partially fermented wines.

13 **Keywords:** Coimmobilization, osmotolerant yeast, sweet wines, volatile compounds.

14

15

16 *Corresponding author

17 e-mail: qe1peamr@uco.es

18 Tlf.: +34 957 218 534

19 Fax: +34 957 212 146

20

21 **ABSTRACT**

22 In this work, we used a cell immobilization system consisting of *Penicillium*
23 *chrysogenum* fungi (GRAS) bound to the osmotolerant yeast strains *Saccharomyces*
24 *cerevisiae* X4 and X5 for the partial fermentation of raisin musts. The resulting wines
25 were compared with others obtained by partial fermentation of musts with free yeasts
26 and with a traditionally produced sweet wine (*i.e.* without fermentation of the must).
27 The analysis of volatile compounds grouped by aroma series showed the partially
28 fermented musts to have a more complex aroma than the traditional wine. Specially
29 prominent among aroma series was that of ripe fruit, followed by the milky and
30 chemical series. The volatiles with the greatest impact on wine aroma as assessed in
31 terms of odour activity were ethyl hexanoate, ethyl octanoate, butyrolactone, isoamyl
32 alcohols, acetaldehyde, ethyl acetate, 2,3-butanediol, acetoin and 2,3-butanedione. A
33 cluster analysis according to the Ward method was performed to assess similarity
34 between the traditional sweet wine and those obtained by partial fermentation with free
35 and immobilized yeasts revealed small differences between the wines obtained with free
36 and immobilized yeasts, and marked differences between partially fermented and
37 traditionally obtained sweet wine. The wines provided by immobilized yeasts were the
38 most appreciated in the sensory analysis (especially those obtained with X4 yeasts).

39

40 1. INTRODUCCION

41 The use of immobilized cells for vinification purposes is growing at a steady pace as a
42 result of its technical and economic advantages over that of free yeasts. Cell
43 immobilization procedures successfully confine cells in space to facilitate preservation
44 of their biocatalytic activity and reuse (Karel, Libicki & Robertson 1985). Immobilized
45 cells have a number of advantages over free cells in traditional fermentation processes,
46 namely: (a) they are easier to incorporate and remove when required; (b) they can be
47 used at high concentrations, which increases productivity and throughput, and decreases
48 contamination risks; and (c) they reduce costs and enable continuous processing
49 (Margaritis & Merchant, 1984; Webb, Black & Atkinson 1986; Kourkotas, Bekatorou,
50 Banat, Marchant & Koutinas 2004; Plessas, Bekatorou, Koutinas, Soupioni, Banat &
51 Marchant 2007). Cells can be immobilized naturally or artificially. Artificial cell
52 immobilization can be accomplished by (a) binding to a support, (b) cross-linking via
53 bifunctional compounds and (c) entrapment in a semi-permeable membrane of a
54 suitable polymer (Webb et al. 1986; Tanaka & Kawamoto 1999). Under specific
55 conditions, some microorganisms can be spontaneously immobilized in a natural
56 manner by molecular aggregation into small pellets, flocs, microspheres, filamentous
57 fungal mycelia, biofilms on solid substrates or films on liquid surfaces (e.g. those of
58 acetic bacteria or flor yeasts on wine) (Peinado & Mauricio 2009).

59 Calcium alginate gels are currently the most widely used supports for immobilizing
60 winemaking yeasts. In fact, they are commonly used to obtain sparkling wines with the
61 traditional, *champenoise* method, and also to reduce the content in malic acid of highly
62 acid musts. These gels can increase the calcium content of wine and cause calcium
63 tartrate to precipitate, thereby altering wine pH and increasing production costs as a
64 result of the need for tartaric stabilization.

65 A number of natural and synthetic compounds including cellulose, semi-permeable
66 membranes of synthetic polymers, liposomes, fruit pieces and grape skin have been
67 explored as immobilization substrates for winemaking purposes (Kourkotas et al 2004;
68 Kandyliis, Manousi, Bekatorou & Koutinas 2010). However, some can alter the flavour
69 and aroma of the resulting wine.

70 The production of sweet wines involves grape dehydration to increase the sugar
71 concentration. There are several procedures around the world (López de Lerma &
72 Peinado 2011): (i) Sauternes and Tokay wines are produced from grapes by the *Botrytis*
73 *cinerea*; (ii) German and Austrian *eiswein* or Canadian icewine are produced from
74 partially frozen grapes; (iii) *paille* French wines, *vin santo*, *passitos* or *Marsala* wines
75 are obtained from grapes dried in sun-shaded places; (iv) some Mediterranean countries
76 as Greece, Cyprus, Italy and Turkey, as well as in the Montilla–Moriles winemaking
77 region (Spain) produced sweet wines from grapes dried by sun-light exposure.

78 The Montilla–Moriles region is the greatest Spanish producer of sweet wine from dried
79 grapes (Franco, Peinado, Medina & Moreno 2004). Fermenting must from dried grapes
80 present many challenges for wine yeast. The high sugar concentration of the must place
81 yeast under osmotic stress, which can modify its metabolism (Caridi, Crucitti &
82 Ramondino 1999), could cause fermentation difficulties and spoilage by undesirable
83 microorganism. On the other hand, once the fermentation begin is quite difficult to stop
84 it once the yeast has produced the appropriate ethanol concentration (usually 8%). The
85 method used included (i) must centrifugation (ii) to add wine alcohol (iii) temperatures
86 below 4°C. So, to avoid the fermentation the must is initially fortified at least with
87 ethanol to a final concentration of 8% (v/v). The wine this way obtained is known as
88 “base wine”. After some stabilisation treatments the base wine can be fortified again
89 with ethanol to a final concentration of 15% (v/v) given rise to the “Pedro Ximénez”

90 vintage wine which are highly fragrant, with honey, raisins and dry figs nuances. Base
91 wine can be also be subjected to an oxidative aging. The aroma of such wine is
92 dominated by coffee and chocolate notes (López de Lerma, Peinado, Moreno &
93 Peinado. 2010). However, the fortified wines lack the typical aroma notes of the
94 fermentation and frequently exhibit an imbalance between acidity and sweetness (López
95 de Lerma & Peinado, 2011; López de Lerma, Bellicontro, Mencarelli, Moreno &
96 Peinado. 2012).

97 One potential solution to the above-described problems can be to ferment must with
98 osmotolerant yeasts in order to prevent fermentation stuck and sluggish fermentation
99 delays, or contaminations. In addition, the use of immobilized yeast cells facilitate the
100 retreat of yeasts. According to Peinado, Moreno, Villalba, González-Reyes, Ortega &
101 Mauricio (2006) a special procedure to immobilize two osmotolerant yeast strains (X4
102 and X5) has been recently carried out (García-Martinez, Peinado, Moreno, García-
103 García & Mauricio 2011; García-Martinez, Puig, Peinado, Moreno & Mauricio 2012)
104 with show some advantages in relation to the use of free yeast (i) the ability to withdraw
105 the yeast cells when desired, (ii) reuse them in other fermentation runs –where the
106 process will start earlier and last shorter thanks to the activated state of the yeasts–, as
107 well as (iii) a reduced risk of contamination and decreased costs.

108 In this work, we used *Saccharomyces cerevisiae* strains X4 and X5 selected on the
109 grounds of their resistance to high sugar concentrations to partially ferment must from
110 Pedro Ximénez dried grapes. The yeasts were inoculated in free and immobilized form
111 and the production of volatile aroma compounds and sensory properties of the resulting
112 wines are examined here.

113 **2. MATERIAL AND METHODS**

114 **2.1. Microorganisms, media and immobilization procedure**

115 *Saccharomyces cerevisiae* strains X4 (CECT13014) and X5 (CECT13015) were
116 isolated as described (García-Martínez et al. 2012) from spontaneously fermented Pedro
117 Ximénez sweet musts on the grounds of their resistance to high sugar concentrations
118 and ability to produce large amounts of ethanol. The filamentous fungus *Penicillium*
119 *chrysogenum* H3 was isolated from the environment; this fungus was selected by staff
120 members of the Department of Microbiology of the University of Córdoba on the
121 grounds of its providing a highly suitable support for yeasts to be used in fermentation
122 processes; yeast biocapsules were obtained according to Peinado et al (2006). Free yeast
123 cells were used under the same conditions as immobilized cells except for the absence
124 of the filamentous fungus.

125 The count of free viable microorganisms per milliliter of must or fermentation broth
126 was determined by spreading 100 µL volumes of the adequate diluted suspension onto
127 YPD agar plates and counting clones after 48 h at 28 °C.

128 **2.2. Must and fermentation conditions**

129 The must used was obtained from Pedro Ximénez grapes harvested in the year 2010 and
130 sun-dried in the Montilla–Moriles region (Córdoba, Spain). It contained 470 ± 10 g/L of
131 reducing sugars and had an initial pH of 4.2 ± 0.1 that was adjusted to 3.9 by addition of
132 tartaric acid. The must was divided into ten 400 mL aliquots that were placed in 500 mL
133 flasks. Two of the flasks were treated as the traditional way (control wine), no inoculum
134 was supplied and wine alcohol was added to a 15% (v/v) concentration; two were
135 inoculated with a 4×10^6 cell/mL concentration of yeast strain X4 in free form (sample
136 X4F); two with an identical concentration of the strain X5, also in free form (sample
137 X5F); Lastly two flask were inoculated with the strain X4 in immobilized form (X4I)
138 and two with the X5 (X5I). All flasks were plugged with hydrophobic cotton, and were
139 partially immersed in a thermostated water bath at 23 ± 1 °C. Fermentations were

140 stopped when the ethanol content reached approximately 8% (v/v) by adding wine
141 alcohol to a final ethanol content of 15% (v/v) and refrigerating at 2 °C. Fermentations
142 were monitored by measuring the amount of CO₂ released via the weight loss of the
143 medium.

144 **2.3. General enological determinations**

145 pH and titratable acidity were measured according to the official methods (CEE, 1990).
146 Reducing sugars (glucose and fructose), acetic acid (volatile acidity) and succinic acid
147 were determined by using specific enzymatic kits from Boehringer Mannheim Roche,
148 S.A. (Barcelona, Spain). Finally, ethanol was quantified by oxidation with dichromate.

149 **2.4. Identification and quantitation of major aroma compounds and polyols**

150 Major volatiles were identified on an HP 6890 Series II gas chromatograph equipped
151 with a CP-WAX 57 CB fused silica capillary column (60 m long × 0.25 mm I.D., 0.4
152 µm film thickness) and a flame ionization detector (FID). The chromatographic
153 conditions used were described in detail by Peinado, Moreno, Muñoz, Medina &
154 Moreno (2004). For quantitation, a 10 mL wine aliquot was supplied with 1 mL of
155 internal standard (1 g/L 4-methyl-2-pentanol in a 14% alcoholic solution) and about 0.2
156 g of calcium carbonate to neutralize tartaric acid present in the wine. The suspension
157 was centrifuged at 300 g for 5 min and a 1 µL aliquot of the resulting supernatant
158 injected in the gas chromatograph.

159 Major volatiles aroma compounds were identified and quantified by comparison with
160 standards containing known concentrations of the target compounds and processed in an
161 identical manner as the samples.

162 **2.5. Identification and quantitation of minor aroma compounds**

163 Volatile compounds were determined according to Rapp, Hastrich & Engel (1976) in a
164 capillary column, using GC-MS after the continuous extraction of 100 mL of wine with

165 100 mL of freon-11 for 24 h. Samples were previously adjusted to pH 3.5 and supplied
166 with 5 mL of 2-octanol as an internal standard at a concentration of 30 mg/L. The Freon
167 extracts containing volatile compounds were concentrated to 0.2 mL in a Kuderna-
168 Danish microconcentrator and 5 μ L aliquots injected into a HP-6890 gas chromatograph
169 from Agilent Technologies equipped with a HP MS 5972A mass detector. A
170 CPWAX57CB capillary column (60 m long x 0.25 mm i.d., 0.4 μ m film thickness) was
171 used for this purpose. The temperature program was as follows: initial temperature 40
172 $^{\circ}$ C, hold 10 min, ramp to 180 $^{\circ}$ C at 1 $^{\circ}$ C min^{-1} , hold 50 min. Helium was used as carrier
173 gas and injections done in the splitless mode. The flow-rate program was as follows:
174 initial setting 0.9 mL min^{-1} , hold 154 min, ramp to 1.2 mL min^{-1} at 1 mL min^{-1} , hold 46
175 min. The mass detector was used at 1850 V in the scan mode and the studied mass
176 range spanned values from 39 to 300 amu. Retention times, spectral libraries supplied
177 by Wiley (version 7N) and pure chemical compounds obtained from Merck, Sigma-
178 Aldrich, Riedel de Haën, and Fluka were used for identification, confirmation, and
179 preparation of standard solutions of the volatile compounds quantified. Each compound
180 was quantified from its response factor, which was obtained by using standard solutions
181 of known concentration previously subjected to the same treatment as the samples in
182 conjunction with the target and qualifier ions selected for each compound by the
183 Hewlett-Packard Chemstation (Palo Alto, CA).

184 **2.6. Statistical processing**

185 Significant differences in winemaking variables and in the volatile aroma compounds
186 among wines were identified by one-way analysis of variance (ANOVA). Whether the
187 production of the volatile compounds depended on the particular yeast type used (factor
188 1), its form (free or immobilized, factor 2) or both, was determined by multifactor
189 analysis of variance (MANOVA). Finally, wines were classified by means of a Ward

190 cluster analysis and principal component analysis. All statistical analyses were done
191 with the software Statgraphics Centurion XV.II from StatPoint Technologies, Inc.
192 (Warrenton, Virginia).

193 **2.7. Sensory analysis**

194 The effect of fermentation on the sensory properties of the wines was examined by
195 subjecting samples to a sensory analysis for aroma and flavour, which were scored on a
196 three-step ordinal scale: undesirable, acceptable and desirable. Each sample was
197 labelled with a key consisting of three randomly chosen letters providing no clue to the
198 tasters. The keys differed between tests and the results were processed in terms of
199 absolute frequencies.

200 Samples were prepared for analysis according to UNE 87-020-93 (AENOR 1997). All
201 were stored refrigerated and allowed to warm to 20 °C in the tasting room one hour
202 before testing. The glass wines used met the design criteria of UNE 87-022-92
203 (AENOR 1997). The influence of visual sensations was avoided by using black glasses.
204 The panel consisted of 15 tasters of both sexes and between 20 and 55 years old who
205 were previously instructed about the test goal and the procedure to be followed.

206 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

207 **3.1. Winemaking variables**

208 Sweet wines obtained from sun-dried grapes possess a high sugar concentration, a pH
209 above 4 and a low titratable acidity (Franco et al. 2004; Peinado, López de Lerma,
210 Moreno & Peinado 2009). These values are similar to those for the starting must, but the
211 pH was lowered to 3.9 (Table 1). Fermentation increased titratable acidity and the
212 content in acetic acid (Table 1). The latter effect was the result of osmotic stress in the
213 yeasts in response to the high sugar concentrations present in the medium (Caridi et al.
214 1999).

215 **3.2. Aroma compounds**

216 **3.2.1. Chemical families**

217 Table 2 shows the contents in minor and major volatiles as grouped into chemical
218 families. The control wine had a much lower content in volatiles than the other wines
219 and an overall lactone content accounting for 70% of all volatiles. By contrast, the
220 proportion of lactones in the partially fermented wines was only 40% and essentially
221 similar in all. As regards carbonyl compounds, aldehyde contents increased
222 significantly in the wines fermented with X4 yeasts and so did the ketone contents in
223 all. Alcohol contents also increased significantly in all wines; however, they were
224 higher with X5 yeasts than with X4 yeasts. Carboxylic acids increased significantly in
225 relation to the control wine by effect of partial fermentation. The wines obtained with
226 immobilized X5 yeasts exhibiting the highest contents. Esters evolved similarly to
227 carboxylic acids but were found at higher concentrations in the wines obtained with free
228 X4 yeasts.

229 Differences in major volatiles by chemical family were very similar to those in minor
230 volatiles and especially marked in polyols, which play a central role in glyceropyruvic
231 fermentation (Moreno & Peinado 2010).

232 **3.2.2. Volatile compounds**

233 Table 3 shows the contents in major (mg/L) and minor ($\mu\text{g/L}$) volatiles. Among major
234 volatiles, propanol, isobutanol and isoamyl alcohols, which increase the complexity of
235 wine aroma, are produced by yeasts from sugars or aminoacids (Ehrlich reaction) during
236 alcoholic fermentation. On the other hand, 2-phenylethanol is formed via shikimic acid
237 (Sefton, Francis & Williams 1993). The overall concentration of the previous alcohols
238 ranged from 20 to 300 mg/L. The wines obtained with immobilized yeasts exhibited
239 lower contents in isoamyl alcohols and isobutanol. Also, 2-phenylethanol was more

240 concentrated in the wines obtained with free yeasts. Methanol is formed by hydrolysis
241 of pectins in grape skin walls (Moreno & Peinado, 2010); its content was significantly
242 higher in the partially fermented musts, possibly as a result of the yeasts possessing
243 some pectinase activity.

244 Acetoin is a by-product of glyceropyruvic fermentation (Moreno & Peinado, 2010). The
245 acetoin contents of the wines obtained by partial fermentation were slightly higher than
246 those of dry wines from the same grape variety, which typically range from 16 to 80
247 mg/L (Muñoz, Peinado, Medina Moreno 2005). Worth special note was the increased
248 production of acetoin by free X5 yeasts. Glycerin formation (Table 1) is associated to
249 glyceropyruvic fermentation. However, the traditionally produced, control wine
250 exhibited a high content in this compound. Some authors (Chkaiban, Botondi,
251 Bellincontro, De Santis, Kefalas & Mencarelli 2007; López de Lerma et al. 2012a) have
252 shown that water stress during sun-drying alters grape metabolism. This increases the
253 contents in glycerin and glyceropyruvic fermentation products in the must. The wines
254 obtained by partial fermentation of raisins have even higher contents in glycerin by
255 effect of the high concentration of sugars in the medium placing yeasts under osmotic
256 stress (Malacrino, Tosi, Caramia, Prisco & Zapparoli 2005). Finally, the fermented
257 musts exhibited increased ethyl acetate concentrations relative to the control wine. The
258 content in this ester is associated to that of acetic acid, which was high as a result of
259 osmotic stress in the yeasts (Caridi et al. 1999). Although an increased content in ethyl
260 acetate can detract from sensory quality in dry wines, it was recently found to have no
261 such effect on sweet wines (López de Lerma et al. 2011).

262 Among the minor volatiles, benzyl alcohol was the sole volatile determine exhibited no
263 significant differences between wines. Except for 2-butanol, *E*-2-hexen-1-ol and ethyl
264 furoate, all minor volatiles were present in greater amounts in the partially fermented

265 musts than in the control wine. Hexenal increased significantly in the wines fermented
266 with X4, but decreased in those fermented with X5. On the other hand, *E*-3-hexen-1-ol
267 increased significantly in all wines except that partially fermented with X4 yeasts,
268 whereas *Z*-3-hexen-1-ol decreased in all wines except that obtained with free X4 yeasts.
269 3-Ethoxy-1-propanol, 1-hexanol, pentanol, furfural, propanoic acid, ethyl octanoate,
270 diethyl malate, 4-valerolactone and 4-butyrolactone exhibited no significant differences
271 between yeast strains or their form. Only furfuryl alcohol and ethyl benzoate differed
272 only with yeast strain. All other minor volatiles departed from the above-described
273 trends.

274 **3.3. Aroma series**

275 The aroma fraction of wine is highly complex in both qualitative and quantitative terms.
276 It is therefore advisable to establish a sensory profile for each wine including the
277 volatiles it contains and their impact on its aroma. This entails assessing the individual
278 contribution of each compound and subsequently including it in an aroma series
279 encompassing substances with a common odour descriptor.

280 One way of assessing the contribution of a compound to wine aroma is calculating its
281 odour activity value (OAV) by dividing its analytical concentration into its perception
282 threshold. Those compounds with a high OAV can be assumed to contribute markedly
283 to wine aroma. OAVs can be used to establish the sensory profile of a wine by grouping
284 volatiles into aroma series in terms of their odour descriptors. The OAV for each series
285 is obtained by combining those for its individual components. A given compound may
286 belong to one or more aroma series depending on whether it possesses a single or
287 several descriptors. This considerably simplifies the number of variables to be
288 processed and facilitates assessing the impact of specific practices on wine aroma since
289 it allows the profiles for different wines to be obtained in an identical manner. This

290 procedure was previously used by a number of authors (Peinado, Moreno, Bueno,
291 Medina & Moreno 2004; García-Carpintero, Sanchez-Palomo, Gomez & González-
292 Viñas 2012; López de Lerma et al. 2012; López de Lerma, García-Martinez, Moreno,
293 Mauricio & Peinado 2012).

294 As can be seen from figure 1, all series exhibited an increase in OAV by effect of
295 fermentation, which resulted in an increased complexity of the aroma of the fermented
296 wines. This was especially so with the chemical, ripe fruit and milky series –and with
297 X5 yeasts in the latter two. The highest values in the chemical series were those for the
298 musts fermented with X5 yeasts and immobilized X4 yeasts.

299 Isoamyl alcohols, acetaldehyde and ethyl acetate were the compounds most markedly
300 contributing to the chemical series. The formation of isoamyl alcohols is associated to
301 nitrogen metabolism in yeasts during fermentation. Acetaldehyde and ethyl acetate are
302 usually assigned to glyceropyruvic fermentation. The ripe fruit series comprised 2,3-
303 butanediol (*levo* and *meso*), ethyl hexanoate and ethyl octanoate in addition to isoamyl
304 alcohols and acetaldehyde. Esters formed in proportion to their parent carboxyl acids
305 (hexanoic and octanoic). 2,3-Butanediol comes from glyceropyruvic fermentation
306 (Moreno & Peinado, 2010). Finally, the OAV for the milky series was influenced by all
307 compounds in it, which are also formed during glyceropyruvic fermentation (Moreno &
308 Peinado, 2010). Next in significance were the toasted and floral series. The former
309 exhibited no significant differences between the partially fermented musts. This series
310 was largely influenced by 4-butyrolactone, which is typically formed during
311 fermentation processes. The floral series peaked in the wines obtained with free X5 and,
312 especially, X4 yeasts, and was largely influenced by 2-phenylethanol. All other series
313 had $OAV < 1$. The fresh grass and green fruit series in the partially fermented musts

314 obtained with X5 yeasts were those with the lowest OAVs, the former exhibiting no
315 significant differences between the partially fermented musts.

316 **3.4. Statistical analysis**

317 ***3.4.1. Cluster analysis***

318 The term “cluster analysis” encompasses a large variety of algorithms and methods used
319 to classify samples into groups in such a way that the degree of association between two
320 samples will be maximal if they fall in the same group and minimal otherwise (Shaw,
321 2003). In this work, we used the method of Ward to subject our results to cluster
322 analysis in order to assess similarity between a traditionally produced wine and others
323 obtained by partial fermentation with free or immobilized yeasts (figure 2). We used
324 aroma series as classifying variables. The smaller the distance between clusters is, the
325 greater is their similarity. This allowed the wines obtained with immobilized yeasts to
326 be isolated from those obtained with free yeasts. The two groups formed a cluster
327 containing the partially fermented musts, which, based on their distance, were highly
328 similar. A separate cluster was formed by the traditionally produced wine, which
329 departed markedly from the partially fermented wines.

330 ***3.4.2. Principal component analysis.***

331 The specific aroma series of greatest use towards distinguishing the different types of
332 wine were identified by principal component analysis (figure 3). The first two PCs
333 accounted for 94.11% of the total variance. PC1, which explained 81.0% by itself,
334 clearly discriminated between the traditionally produced wine and those obtained by
335 partial fermentation of the must. All aroma series contributed similarly to the
336 distinction, with the dry grass and green fruit series as the greatest and least contributor,
337 respectively (see table 4). PC2 accounted for 13.11% of the variance and helped
338 distinguish the partially fermented wines irrespective of the yeast form used. The unripe

339 fruit and fresh grass series were the greatest contributors to discriminating between the
340 wines partially fermented with free yeasts; and so were the chemical, ripe fruit and
341 milky series in relation to those obtained with immobilized yeasts.

342 **3.4.3. Multiple regression analysis**

343 Multiple regression analysis allowed us to assess the statistical significance of the
344 influence of yeast strain and form on each aroma series in order to identify interactions
345 between the two factors. As can be seen from table 5, neither the chemical, dry grass
346 and toasty series were influenced by the type of yeast or its form. On the other hand, the
347 green fruit, fresh grass and fatty series were dependent on both factors and exhibited a
348 significant interaction, which suggests that their OAVs are influenced by both the type
349 of yeast and its form (free or immobilized). The ripe fruit and milky series were
350 dependent on the way of use, and so was the floral series on yeast strain.

351 **3.5. Sensory analysis**

352 Wine samples were subjected to sensory analyses in order to assess the effect of
353 fermentation on their aroma and flavour, which were classed as undesirable, acceptable
354 or desirable.

355 The frequency distributions of the aroma test (figure 4) revealed that all samples were
356 deemed acceptable. However, both the control wine and the sample obtained by partial
357 fermentation with free X5 yeasts were classed as undesirable in 33% of cases. Also, the
358 wines obtained with immobilized yeasts were better scored than those obtained with
359 free yeasts. The results of the flavour test (figure 5) exhibited a similar trend to those of
360 the aroma test. These results can be ascribed to the increased complexity of the aroma of
361 the partially fermented musts, which included secondary components but retained most
362 of the primary components typical of the grape variety concerned: Pedro Ximénez.
363 Also, the fermented samples possessed a better acidity–sweetness balance by effect of

364 their increased acidity. An imbalance in these two sensory properties favouring
365 sweetness occasionally leads to traditionally produced sweet wines from raisins being
366 deemed sickly sweet.

367 **3.6. Conclusions**

368 The partial fermentation of raisin musts provides wines with an increased concentration
369 of volatiles that results in a complex aroma relative to traditionally produced wines. The
370 chemometric methods used in this work revealed slight differences between partially
371 fermented musts and marked differences between these and the traditionally obtained
372 wine. The sensory properties of the wines obtained with immobilized yeasts were better
373 scored for aroma than were those provided by free yeasts; also, the aroma of the wines
374 obtained with strain X4 was deemed more desirable than that of the wines provided by
375 X5. Therefore, the cell immobilization system used in this work provides an effective
376 means for the partial fermentation of raisin musts and can help diversify the current
377 supply of Andalusian sweet wines with a new one obtained from partially fermented
378 must.

379 **ACKNOWLEDGEMENTS**

380 This work was part of a research project funded by Spain's Ministry of Science and
381 Innovation (Grant RTA2011-00020-C02-02, MICINN-INIA). Additional funding was
382 provided by a research training fellowship from Spain's Ministry of Education (2008
383 call).

384 **REFERENCES**

- 385 AENOR. (1997). *Análisis sensorial* (Tomo I. Alimentación). Madrid: AENOR.
- 386 Caridi, A.; Crucitti, P.; & Ramondino, D. (1999). Winemaking of must at high osmotic
387 strength by thermotolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 21, 617-620.
- 388 CEE (1990). *Diario Oficial de la Comunidad Europea L-272*. Madrid: Mundi-Prensa.

389 Chkaiban, L., Botondi, R., Bellincontro, A., De Santis, D., Kefalas, P., & Mencarelli, F.
390 (2007). Influence of postharvest water stress on lipoxygenase and alcohol
391 dehydrogenase activities, and on the composition of some volatile compounds of
392 Gewürztraminer grapes dehydrated under controlled and uncontrolled
393 thermohygro-metric conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13,
394 142–149

395 Etievant P. X. (1991) *Volatile compound in food and beverages*. New York: Marcel
396 Dekker.

397 Franco, M., Peinado, R. A., Medina, M. and Moreno, J. (2004) Off vine grape drying
398 effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape
399 variety. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3905–3910.

400 García-Martínez, T., Peinado, R. A., Moreno, J., García-García, I., & Mauricio, J. C.
401 (2011). Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading
402 to the immobilisation of yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86,
403 812-817.

404 García Martínez, T.; Puig-Pujol, A.; Peinado, R. A.; Moreno, J.; & Mauricio, J. C.
405 (2012). Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for
406 ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 351-359.

407 García-Carpintero, E., Sanchez-Palomo, E., Gomez, M. A., & González-Viñas, M. A.
408 (2012). Characterization of impact odorants and sensory profile of Bobal red wines from
409 Spain's La Mancha region. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 60-68.

410 Gemert, L. (2003) *Compilation of odour thresholds in air, water and others media*.
411 Zeist: Bacis.

412 Gómez-Minguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007).
413 Volatile composition of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473

414 Kandyliis, P., Manousi, M. E., Bekatorou, A., & Koutinas, A. A. (2010). Freeze-dried
415 wheat supported biocatalyst for low temperature wine making. *LWT-Food Science and*
416 *Technology*, *43*, 1485–1493.

417 Karel, S. F., Libicki, S. B., & Robertson C. R. (1985). The immobilization of whole
418 cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*, *40*, 1321–1354.

419 Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004).
420 Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages
421 production: a review. *Food Microbiology*, *21*, 377–397

422 López de Lerma, N., Peinado, J., Moreno, J., & Peinado, R. A. (2010). Antioxidant
423 activity browning and volatile Maillard compounds in Pedro Ximénez sweet wines
424 under accelerated oxidative aging. *LWT Food Science and Technology*, *43*, 1557-1563.

425 López de Lerma, N., & Peinado R. A. (2011). Use of two osmoethanol tolerant yeast
426 strain to ferment must from Tempranillo dried grapes. Effect on wine composition.
427 *International Journal of Food Microbiology*, *145*, 342-348.

428 López de Lerma, N., Bellicontro, A., Mencarelli, F., Moreno, J., & Peinado R. A.
429 (2012a). Use of electronic nose, validated by GC-MS, to establish the optimum off-vine
430 dehydration time of wine grapes. *Food Chemistry*, *130*, 447-452.

431 López de Lerma, N., García-Martinez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., & Peinado R. A.
432 (2012b). Sweet wines with great aromatic complexity obtained by partial fermentation
433 of must from Tempranillo dried grapes. *European Food research and Technology*, *234*,
434 695-701.

435 Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas M. R. (2008).
436 Differentiation of co-winemaking wine by their aroma composition. *European Food*
437 *research and Technology*, *227*, 777-787

438 Malacrino, P.; Tosi, E.; Caramia, G.; Prisco, R., & Zapparoli G. (2005). The
439 vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of
440 *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. *Letters of Applied*
441 *Microbiology*, 40, 466-472.

442 Margaritis, A., & Merchant F. J. A. (1984). Advances in ethanol production using
443 immobilized cell systems. *Critical Review in Biotechnology*, 2, 339–393.

444 Moreno, J. (2005) Influencia del tipo de envejecimiento sobre el perfil aromático de
445 vinos generosos andaluces. University of Córdoba: PhD thesis.

446 Moreno, J., & Peinado R. A. (2010). *Química Enológica*. Madrid: AMV-Mundi Prensa.

447 Muñoz, D.; Peinado, R. A.; Medina, M. & Moreno, J. (2005). Biological aging of sherry
448 wines using pure cultures of two flor yeast strains under controlled microaeration.
449 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5258-5264.

450 Muñoz, D., Peinado, R. A., Medina, M., & Moreno, J. (2007). Biological aging of
451 sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces*
452 *cerevisiae* var. *capensis*: effect on odorant series. *Food Chemistry*, 100, 1188-1195.

453 Peinado, R. A., Moreno, J. A., Muñoz, D., Medina, M., & Moreno, J. (2004). Gas
454 chromatographic quantification of mayor volatile compounds and polyols in wines by
455 direct injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6389-6393

456 Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004).
457 Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-
458 fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585–590.

459 Peinado, R. A., Moreno, J. J., Villalba, J. M., González-Reyes, J. A., Ortega, J. M., &
460 Mauricio, J. C. (2006). Yeast biocapsules: A new immobilization method and their
461 applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 79-84.

462 Peinado, R. A., & Mauricio, J. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:
463 Springer.

464 Peinado, J., López de Lerma, N., Moreno, J., & Peinado R. A. (2009). Antioxidant
465 activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximénez grapes at
466 different stages of the off-vine drying process. *Food Chemistry*, *114*, 1050-1055

467 Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A. A., Soupioni, M., Banat, I. M., & Marchant, R.
468 (2007). Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as
469 biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, *98*, 860–865.

470 Rapp, A., Hastrich, H., & Engel, L. (1976). Gas-chromatographic determination of
471 aromas in wines. I. Analysis by capillary gaschromatography. *Vitis*, *15*, 183-192.

472 Rocha, S. M., Rodrigues, F., Coutinho, P., Delgadillo, I., Coimbra, M. A. (2004).
473 Volatile composition of Baga red wine. Assessment of the identification of the would be
474 impact odorants. *Analytical Chimica Acta*, *513*, 257-262.

475 Sefton, M. A., Francis, I. L., & Williams, P. J. (1993). The volatile composition of
476 Chardonnay juices: a study by flavour precursor analysis. *American Journal of Enology*
477 *and Viticulture*, *44*, 359-370.

478 Shaw, P. J. A. (2003). *Multivariate statistics for the Environmental Sciences*. London:
479 Hodder-Arnold.

480 Tanaka, A., & Kawamoto, T. (1999). *Manual of Industrial Microbiology and*
481 *Biotechnology*. Washington: ASM Press.

482 Webb, C., Black, G.M., & Atkinson, B. (1986). *Process engineering aspects of*
483 *immobilised cell systems*. Oxford: Pergamon Press Ltd.

484 www.leffingwell.com. (2010).

485

486 **Figure legends**

487 Figure 1. Aromatic series values obtained in wine elaborated traditionally (control), and
488 in those obtained with the selected yeast (X4 and X5) in free (F) and immobilized (In)
489 form. Different letters indicate significant differences at 95% confidence level.

490 Figure 2. Cluster analysis according to the Ward´s method using as classifying variables
491 the aromatic series.

492 Figure 3. Principal component analysis using as classifying variables the aromatic series
493 to distinguish among wines elaborated traditionally (control), and in those obtained with
494 the selected yeast (X4 and X5) in free (F) and immobilized (In) form. Only the series
495 that contribute the most to the differentiation of partially fermented must are showed.

496 Figure 4. Distribution of absolute frequencies obtained by the tasting panel for the
497 aroma of wines elaborated traditionally (control), and in those obtained with the
498 selected yeast (X4 and X5) in free (F) and immobilized (In) form.

499 Figure 5. Distribution of absolute frequencies obtained by the tasting panel for the taste
500 of wines elaborated traditionally (control), and in those obtained with the selected yeast
501 (X4 and X5) in free (F) and immobilized (In) form.

502

503 Table 1. Winemaking variables determined in wine elaborated traditionally (control),
 504 and in those obtained with the selected yeast (X4 and X5) in free (F) and immobilized
 505 (In) form.

	Control	X4F	X5F	X4In	X5In
Sugars (g/L)	402±9 ^a	306±9 ^b	310±5 ^b	313.6±0.7 ^b	314±7 ^b
pH	3.88±0.04 ^a	3.50±0.07 ^b	3.68±0.04 ^c	3.65±0.02 ^c	3.62±0.05 ^c
Titrateable acidity (g tartaric /L)	3.25±0.07 ^a	4.70±0.07 ^b	4.3±0.1 ^c	4.4±0.1 ^c	4.45±0.07 ^c
Acetic acid (g/L)	0.50±0.04 ^a	1.4±0.1 ^b	1.17±0.04 ^c	1.23±0.01 ^c	1.21±0.04 ^c
Succinic acid (mg/L)	19.9±0.8 ^a	211±14 ^b	179±11 ^c	179±29 ^c	138±10 ^d
Glycerol (g/L)	4.4±0.4 ^a	17±1 ^b	21.9±0.5 ^c	18±1 ^b	17±2 ^b

506 Different letters indicate significant differences at 95% confidence level.

507
 508

509 Table 2. Major and minor aroma compounds grouped in chemical families in wine
 510 elaborated traditionally (control), and in those obtained with the selected yeast (X4 and
 511 X5) in free (F) and immobilized (In) form.

Major volatile aroma compounds grouped in chemical families ($\mu\text{g/L}$)						
	Alcohols	Aldehydes	Ketones	Carboxylic acids	Esters	Lactones
Control	372 \pm 14 ^a	40 \pm 3 ^a	59 \pm 3 ^a	140 \pm 4 ^a	94 \pm 3 ^a	1373 \pm 34 ^a
X4F	1333 \pm 52 ^b	104 \pm 1 ^b	89 \pm 3 ^b	1425 \pm 34 ^b	723 \pm 25 ^b	2557 \pm 138 ^b
X5F	1454 \pm 21 ^c	29 \pm 2 ^a	81 \pm 2 ^b	1351 \pm 24 ^b	625 \pm 11 ^c	2442 \pm 160 ^b
X4In	1101 \pm 5 ^d	88 \pm 5 ^c	92 \pm 6 ^b	1432 \pm 60 ^b	630 \pm 17 ^c	2344 \pm 301 ^b
X5In	1465 \pm 44 ^c	36 \pm 2 ^a	136 \pm 6 ^c	1553 \pm 45 ^c	592 \pm 19 ^c	2295 \pm 47 ^b
Minor volatile aroma compounds grouped in chemical families (mg/L)						
	Alcohols	Aldehydes	Ketones	Esters	Polyols	
Control	66 \pm 1 ^a	110 \pm 21 ^a	37 \pm 4 ^a	16 \pm 3 ^a	191 \pm 18 ^a	
X4F	326 \pm 13 ^{bc}	240 \pm 37 ^b	139 \pm 17 ^b	57 \pm 3 ^b	4021 \pm 694 ^b	
X5F	344 \pm 19 ^c	347 \pm 31 ^c	234 \pm 19 ^c	71 \pm 6 ^c	7115 \pm 544 ^c	
X4In	300 \pm 7 ^b	270 \pm 30 ^b	168 \pm 16 ^b	83 \pm 5 ^d	4562 \pm 265 ^b	
X5In	304 \pm 16 ^b	278 \pm 27 ^{bc}	168 \pm 12 ^b	85 \pm 2 ^d	4979 \pm 30 ^b	

512 Different letters indicate significant differences at 95% confidence level.

513
 514

Table 3. Odor perception thresholds (OPT), aromatic series (AS) and concentration of the volatile aroma compounds determined in wine elaborated traditionally (control), and in those obtained with the selected yeast (X4 and X5) in free (F) and immobilized (In) form.

	Control	X4F	X5F	X4In	X5In	Aroma descriptor	OPT ($\mu\text{g/L}$)	AS
ALCOHOLS								
Metanol (mg/L)	57.5 \pm 0.6 ^a	144 \pm 6 ^b	160 \pm 4 ^b	161 \pm 15 ^b	156 \pm 9 ^b	solvent, pungent fruity	500000 ^I	1,2
Propanol (mg/L)	8.4 \pm 0.3 ^a	76 \pm 5 ^b	88 \pm 9 ^c	69 \pm 4 ^b	85 \pm 4 ^c	fusel alcohol, ripe fruit	306000 ^I	1,2
3-ethoxy-1-propanol ($\mu\text{g/L}$)	9.50 \pm 0.02 ^a	335 \pm 32 ^b	349 \pm 26 ^b	299 \pm 9 ^b	304 \pm 6 ^b	overripe pear	50000 ^{II}	2
1-Butanol ($\mu\text{g/L}$)	79 \pm 5 ^a	497 \pm 19 ^b	688 \pm 28 ^c	280 \pm 15 ^d	717 \pm 25 ^c	like wine, medicine	150000 ^{III}	1
2-Butanol ($\mu\text{g/L}$)	4.6 \pm 0.5 ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	like wine, medicine	3300 ^{III}	1
Isobutanol (mg/L)	ND ^a	24 \pm 2 ^b	22 \pm 1 ^b	18.2 \pm 0.8 ^c	16.7 \pm 0.7 ^c	like wine, nail polish	40000 ^{II}	1
1-Pentanol ($\mu\text{g/L}$)	5.7 \pm 0.5 ^a	11 \pm 1 ^b	12 \pm 1 ^b	11.2 \pm 0.6 ^b	13.0 \pm 0.8 ^b	bitter almond, synthetic	64000 ^{III}	1
Isoamyl alcohols (mg/L)	ND ^a	59 \pm 2 ^b	54 \pm 4 ^b	38 \pm 3 ^c	32 \pm 1 ^c	like wine, nail polish, whisky, ripe fruit	30000 ^{II}	1, 2
1-Hexanol ($\mu\text{g/L}$)	90 \pm 6 ^a	183 \pm 1 ^b	197 \pm 11 ^b	206 \pm 6 ^b	189 \pm 8 ^b	grass just cut	2500 ^{III}	5
E-2-Hexen-1-ol ($\mu\text{g/L}$)	23 \pm 1 ^a	2.8 \pm 0.3 ^b	10 \pm 1 ^c	5.2 \pm 0.4 ^d	13.3 \pm 0.9 ^e	green tomato	400 ^{III}	5
E-3-hexen-1-ol ($\mu\text{g/L}$)	1.07 \pm 0.01 ^a	ND ^b	53 \pm 5 ^c	33.1 \pm 0.5 ^d	62.8 \pm 0.5 ^e	Green	1000 ^I	5
Z-3-Hexen-1-ol ($\mu\text{g/L}$)	1.37 \pm 0.02 ^a	2.4 \pm 0.3 ^b	ND ^c	ND ^c	ND ^c	Green, kiwi	400 ^{IX}	5,7
Furfuryl alcohol ($\mu\text{g/L}$)	8.7 \pm 0.3 ^a	21.8 \pm 0.7 ^b	18 \pm 1 ^c	22.5 \pm 0.9 ^b	19.4 \pm 0.1 ^c	varnish	15000 ^{II}	1,6
Benzyl alcohol ($\mu\text{g/L}$)	71 \pm 7 ^a	72 \pm 3 ^a	69 \pm 5 ^a	69 \pm 2 ^a	75.6 \pm 0.8 ^a	Floral, rose, phenolic, balsamic	200000 ^{VIII}	1,4
2-Phenylethanol (mg/L)	ND ^a	23 \pm 2 ^b	19 \pm 1 ^b	14.6 \pm 0.8 ^c	14 \pm 1 ^c	rose, talc, honey	10000 ^{II}	4
ALDEHYDES								
Acetaldehyde (mg/L)	110 \pm 21 ^a	240 \pm 37 ^b	347 \pm 31 ^c	270 \pm 30 ^b	278 \pm 27 ^b	Pungent, stewed apple	110000 ^{II}	1,2
Hexanal ($\mu\text{g/L}$)	27 \pm 3 ^a	74 \pm 1 ^b	ND ^c	54 \pm 4 ^d	ND ^c	herbaceous, green apple	350 ^{IV}	5,7
Furfural ($\mu\text{g/L}$)	9.1 \pm 0.3 ^a	17.9 \pm 0.5 ^b	17.5 \pm 0.5 ^b	19.8 \pm 0.6 ^b	20 \pm 2 ^b	fusel alcohol, toasted bread	770 ^{III}	1,6
5-methyl furfural ($\mu\text{g/L}$)	0.575 \pm 0.007 ^a	0.53 \pm 0.03 ^b	0.56 \pm 0.04 ^b	0.65 \pm 0.05 ^b	0.75 \pm 0.06 ^b	Toasted	1100 ^{VIII}	6
Benzaldehyde ($\mu\text{g/L}$)	3.1 \pm 0.3 ^a	11.9 \pm 0.1 ^b	11 \pm 1 ^b	13.9 \pm 0.4 ^c	14.9 \pm 0.4 ^c	Bitter almond, nutty, smoked	2000 ^{XI}	6

KETONES

Acetoin (mg/L)	37±4 ^a	139±17 ^b	234±19 ^c	168±16 ^b	168±12 ^b	sour yogurt, sour milk	30000 ^{II}	3
2,3-Butanedione (µg/L)	59±3 ^a	89±3 ^b	81±2 ^b	92±6 ^b	136±6 ^c	ripe fruit, yogurt, butter	100 ^{II}	2,3

CARBOXYLIC ACID

Propanoic acid (µg/L)	80±4 ^a	1259±35 ^b	1237±20 ^b	1241±71 ^b	1371±53 ^b	fat	8100 ^V	8
Isobutanoic acid (µg/L)	8.5±0.1 ^a	2.8±0.2 ^b	4.8±0.4 ^c	3.5±0.3 ^b	3.6±0.5 ^b	cheese, rancid, fat	230 ^{IX}	8
Butanoic acid (µg/L)	11±1 ^a	61±4 ^b	23±1 ^c	71±2 ^d	73±5 ^d	aged cheese, rancid	173 ^{IX}	8
Hexanoic acid (µg/L)	30±2 ^a	61±2 ^b	49.4±0.3 ^c	69±6 ^d	59±2 ^b	cheese, rancid	420 ^{IX}	8
Octanoic acid (µg/L)	3.13±0.03 ^a	35±2 ^b	26±2 ^c	42±2 ^d	33±1 ^b	cheese, rancid, fat	500 ^{IX}	8
Decanoic acid (µg/L)	7.7±0.3 ^a	6.9±0.3 ^a	10.7±0.4 ^b	4.8±0.4 ^c	14.8±0.5 ^d	rancid, waxen, plasticine	1000 ^{IX}	8

ESTERS

Ethyl acetate (mg/L)	16±3 ^a	56±3 ^b	70±6 ^c	82±5 ^d	84±2 ^d	glue	7500 ^{II}	1
Ethyl succinate (µg/L)	61±2 ^a	545±28 ^b	478±14 ^c	467±11 ^c	422±16 ^d	Toffee, coffee	1000000 ^{II}	6
Ethyl 3-hydroxybutyrate (µg/L)	2.38±0.01 ^a	6.8±0.5 ^b	4.6±0.3 ^c	5.6±0.3 ^d	7.1±0.4 ^b	grape, green apple, marshmallow	20000 ^I	4,7
Ethyl hexanoate (µg/L)	5.1±0.8 ^a	13.0±0.8 ^b	16±1 ^c	16.9±0.5 ^c	21±1 ^d	green apple	14 ^{VI}	2
Ethyl octanoate (µg/L)	1.7±0.1 ^a	7.8±0.3 ^b	8.4±0.4 ^b	7.9±0.3 ^b	8.7±0.6 ^b	Sweet, banana, pineapple	5 ^{IX}	2
Ethyl furoate (µg/L)	0.14±0.03 ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	fruity (plum, ciruela), floral	1000 ^{II}	2,4
Ethyl benzoate (µg/L)	1.6±0.2 ^a	3.5±0.4 ^b	4.6±0.2 ^c	3.0±0.1 ^b	5.0±0.4 ^c	sweet, fruity, medicinal, wintergreen (floral), anise	5000 ^{II}	1,2,4,9
Diethyl succinate (mg/L)	0.12±0.02 ^a	1.02±0.04 ^b	0.98±0.07 ^b	0.97±0.06 ^b	1.01±0.04 ^b	overripe melon, lavender	100000 ^{II}	2,4,9
Diethyl malate (µg/L)	21±2 ^a	39±2 ^b	33±1 ^b	37±3 ^b	37±3 ^b	Green	760000 ^{VIII}	5
Isoamyl acetate (µg/L)	ND ^a	14.7±0.8 ^b	7.7±0.4 ^c	10.0±0.7 ^d	19±1 ^e	banana	30 ^{II}	2
2-Phenylethyl acetate (µg/L)	1.4±0.2 ^a	94±3 ^b	73±2 ^c	82±4 ^d	72±4 ^c	Fruity, honeyed, floral	250 ^{IX}	2,4

LACTONES

4-Butyrolactone (µg/L)	1275±43 ^a	2415±132 ^b	2297±149 ^b	2209±295 ^b	2095±45 ^b	toasted, burned	1000 ^{III}	6
4-valerolactone (µg/L)	2.3±0.2 ^a	6.2±0.2 ^b	5.3±0.4 ^b	5.8±0.5 ^b	6.1±0.3 ^b	hay just cut	10 ^{VII}	9
Pantolactone (µg/L)	94±9 ^a	129±6 ^b	134±10 ^b	124±5 ^b	190±2 ^c	toasted bread, smoked	2200 ^{XII}	6
4-decalactone (µg/L)	1.11±0.08 ^a	2.6±0.1 ^b	2.0±0.1 ^c	1.8±0.1 ^c	1.5±0.1 ^d	Peach	10 ^X	2
4-caprolactone (µg/L)	0.95±0.07 ^a	4.5±0.2 ^b	3.7±0.3 ^c	3.9±0.4 ^c	3.7±0.2 ^c	herbaceous, coconut	13 ^I	5,7

POLIOLS

2,3-Butanediol <i>levo</i> (mg/L)	68±8 ^a	2323±425 ^b	4015±334 ^c	2378±162 ^b	2719±52 ^b	ripe fruit, butter	668000 ^{II}	2,3
2,3-Butanediol <i>meso</i> (mg/L)	123±10 ^a	1698±269 ^b	3100±210 ^c	2184±103 ^d	2260±23 ^d	ripe fruit, butter	668000 ^{II}	2,3

1. Chemistry. 2. Ripe fruit. 3. Milky. 4. Floral. 5. Fresh grass. 6. Toasty. 7. Green fruit. 8. Rancid. 9. Dry grass.

Different letters indicate significant differences at 95% confidence level.

I. (Etievant, 1991). II. (Moreno, 2005). III. (López de Lerma et al. 2012). IV. (Franco et al. 2004). V. (Rocha, Rodrigues, Coutinho, Delgadillo & Coimbra, 2004). VI. (Lorenzo, Pardo, Zalacain, Alonso & Salinas, 2008). VII. (www.leffingwell.com, 2010), VIII. (Lopez de Lerma et al 2011). IX. (Gómez-Minguez, Cacho, Ferreira, Vicario & Heredia 2007). X. (Gemert 2003). XI (Peinado et al. 2004). XII. (Muñoz, Peinado, Medina & Moreno 2007).

Table 4. Contribution of the aromatic series to the principal components analysis.

Aromatic series	Component 1	Component 2
Chemistry	0,345	-0,265
Ripe fruit	0,335	-0,384
Milky	0,308	-0,497
Floral	0,352	0,022
Fresh grass	0,330	0,410
Toasty	0,358	0,007
Green fruit	0,283	0,579
Fatty	0,321	0,178
Dry grass	0,360	0,019

Table 5. p-values obtained with the multiple regression analysis using as variables the yeast strain (X4 and X5) and the way of use (free and immobilized form).

Aromatic series	Yeast strain	Way of use	Interaction
Chemistry	0.0933	0.0648	0.1228
Ripe fruit	0.0032	0.0628	0.0289
Milky	0.0018	0.0624	0.0050
Floral	0.0703	0.0020	0.1974
Fresh grass	0.0003	0.0425	0.0331
Toasty	0.4801	0.2176	0.9015
Green fruit	0.0000	0.0057	0.0080
Fatty	0.0009	0.0001	0.0011
Dry grass	0.3362	0.4733	0.1035

Figure 1

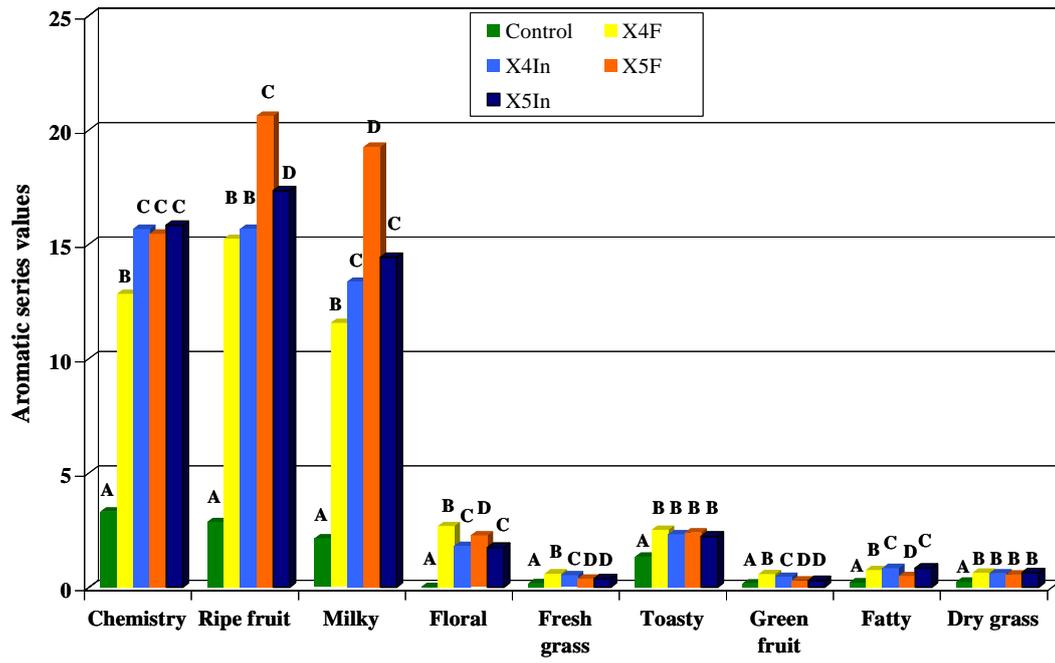


Figure 2

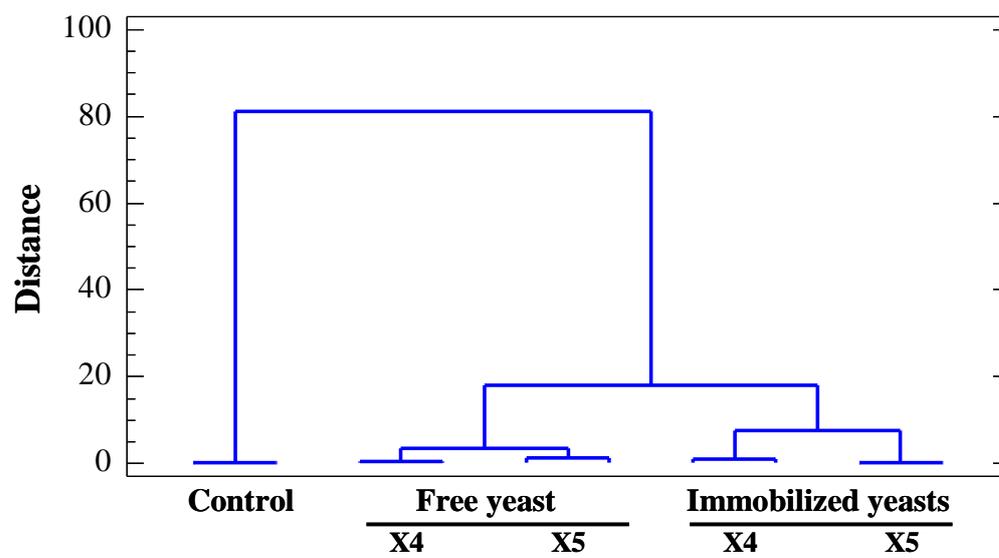


Figure 3

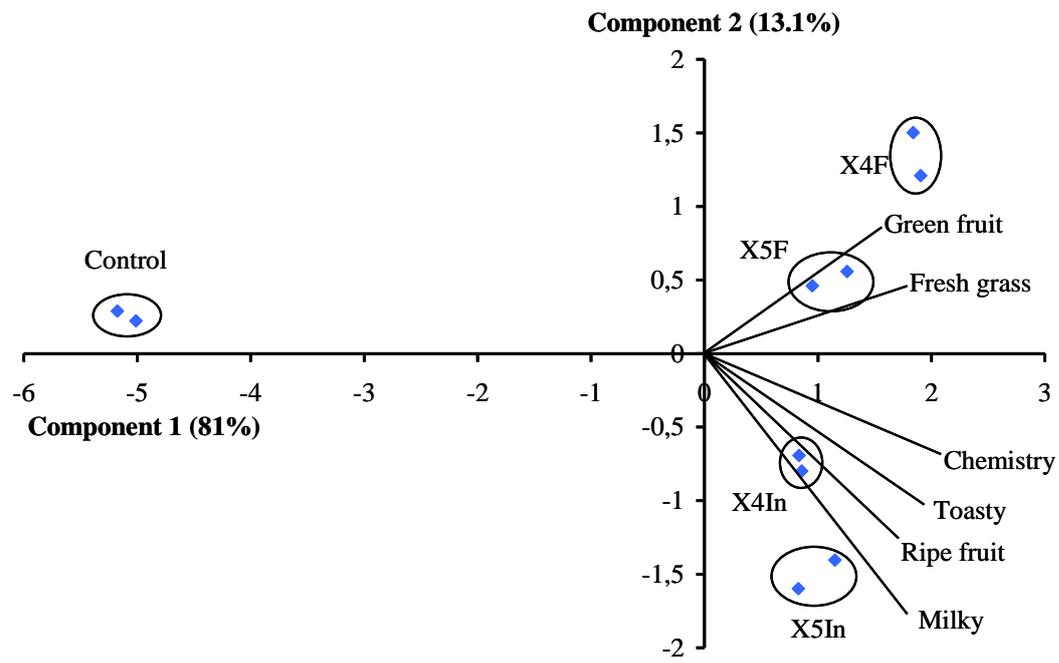


Figure 4

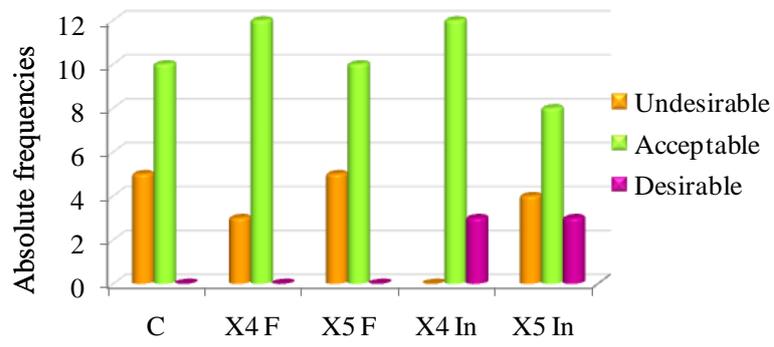
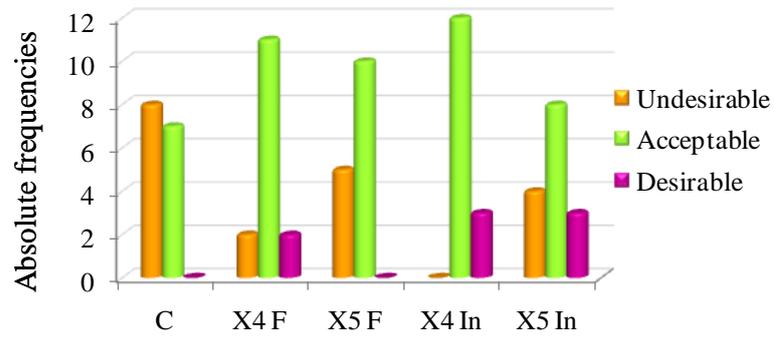


Figure 5





*Informe con índice
de impacto*

5. INFORME CON EL FACTOR DE IMPACTO Y CUARTIL DEL JOURNAL CITATION REPORTS (SCI)

Puesto que esta tesis doctoral está presentada como compendio de publicaciones, a continuación, en la **Tabla 5.1** se muestra la información referida a los 3 trabajos publicados en dos revistas científicas incluidas en los dos primeros cuartiles referenciadas en la última relación publicada, 2010, por el Journal Citation Reports (SCI) por orden de consecución de objetivos específicos propuestos.

Tala 5.1. Información de las tres publicaciones científicas presentadas para la Defensa de esta Tesis Doctoral por la doctoranda como primer firmante.

<u>Título 1^{er} artículo</u>	Co-culture of <i>Penicillium chrysogenum</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> leading to the immobilization of yeast		
Autores	<u>García-Martínez, T.</u> , Peinado, R., Moreno, J., García-García, I., Mauricio, J.C.		
Revista científica	Journal of Chemical Technology and Biotechnology		
Año publicación	2011	Nº citaciones	1
Volumen	86	Páginas	812-817
Índice de impacto (JCR)	1,818 (2010)		
Cuartil	2º	Lugar Nº	37/135
Categoría	Engineering, Chemical		
DOI	10.1002/jctb. 2593		

<u>Título 2º artículo</u>	Potential use of wine yeasts immobilized on <i>Penicillium chrysogenum</i> for ethanol production		
Autores	<u>García-Martínez, T.</u> , Puig-Pujol, A., Peinado, R., Moreno, J., Mauricio, J.C.		
Revista científica	Journal of Chemical Technology and Biotechnology		
Año publicación	2012	Nº citaciones	0
Volumen	87	Páginas	351-359
Índice de impacto (JCR)	1,818 (2010)		
Cuartil	2º	Lugar Nº	37/135
Categoría	Engineering, Chemical		
DOI	10.1002/jctb. 2725		

5. Informe con el factor de impacto y cuartil del JCR (SCI)

<u>Título 3^{er} artículo</u>	Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol- tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose		
Autores	<u>García-Martínez, T.</u> , Bellincontro, A., López de Lerma, N., Peinado, R.A., Mauricio, J.C., Mencarelli, F., Moreno, J.J.		
Revista científica	Food Chemistry		
Año publicación	2011	Nº citaciones	3
Volumen	127	Páginas	1391-1396
Índice de impacto (JCR)	3,458 (2010)		
Cuartil	1^{er}	Lugar Nº	4/70
Categoría	Chemistry, Applied		
DOI	10.1016/j.foodchem.2011.01.130		



Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones principales desprendidas de esta tesis doctoral se presentan de acuerdo a los objetivos específicos planteados inicialmente.

Capítulo I:

Las conclusiones obtenidas del **primer artículo** publicado (**García-Martínez et al., 2011a**) son:

- Bajo unas condiciones especiales se produce una coinmovilización entre una cepa de levadura y un hongo filamentoso que proporciona unas esferas lisas y huecas, cuyas paredes están compuestas por hifas del hongo filamentoso en las que quedan atrapadas células de levadura. A este sistema de inmovilización lo hemos denominado “biocápsulas de levadura”.
- El hongo filamentoso muere durante el proceso de fermentación por contacto directo entre célula de levadura e hifa del hongo, y éste queda como un soporte inerte.

Las conclusiones del **estudio proteómico** son:

- Los resultados del **estudio proteómico** sugieren que podría existir una defensa de las células inmovilizadas de levadura frente al hongo bajo las condiciones ensayadas, marcada a través de una serie de controles a nivel de ADN, de ARN y de proteínas.

Capítulo II:

Las conclusiones del **segundo artículo** publicado (**García-Martínez et al., 2012**) son:

- Este método de coinmovilización proporciona una alternativa simple, adecuada y barata que permite la reutilización de levaduras en procesos fermentativos.
- Se obtuvieron seis tipos diferentes de biocápsulas de levadura atendiendo al tipo de cepa de levadura ensayada. Las biocápsulas de levadura muestran una productividad de etanol similar o incluso superior a la que se obtiene con levaduras libres y posibilita la reutilización sin pérdida de actividad.
- Las biocápsulas de levaduras obtenidas con las cepas X4 y Uvaferm BC son las que permiten un número mayor de reutilizaciones, tienen mayor viabilidad celular y mejor resistencia.

Capítulo III:

Las conclusiones obtenidas del **tercer artículo** publicado (**García-Martínez et al., 2011b**) son:

- Las fermentaciones parciales de mostos de uva pasificada con cepas de *S. cerevisiae* X4 y X5 revelaron que ambas cinéticas de fermentación fueron similares, pero con X4 fue más lenta durante los seis días primeros, produjo menos acidez volátil y mayores contenidos en metanol, propanol, 2-feniletanol, 2,3-butanodiol, glicerol y acetaldehído que con la cepa X5.
- El uso de sensores como la nariz electrónica permite una clara diferenciación de los vinos dulces parcialmente fermentados de los elaborados de forma tradicional, aunque no se obtuvo una clara diferenciación entre las cepas utilizadas.
- El análisis de componentes principales, usando como variables clasificadoras los volátiles mayoritarios analizados, proporciona una clara diferenciación entre los vinos parcialmente fermentados y los elaborados de forma tradicional, y también entre las distintas cepas de levadura.

Las conclusiones de la **aplicación de las biocápsulas de levadura con X4 y X5 en cuanto al estudio de los compuestos volátiles** son:

- La fermentación parcial de mostos de uva pasificada da lugar a vinos con una mayor concentración de compuestos volátiles que los elaborados de forma tradicional.
- El análisis de conglomerados, usando como variables clasificadoras las series aromáticas, pone de manifiesto que existen ligeras diferencias entre los mostos parcialmente fermentados y notables diferencias entre éstos y los elaborados de forma tradicional. Dicho análisis permitió diferenciar entre los vinos obtenidos con levadura libre e inmovilizada.
- Los mostos parcialmente fermentados con biocápsulas de levadura X4 y X5 fueron mejor valorados organolépticamente que los obtenidos con levadura en forma libre. Los vinos que obtuvieron una mejor valoración fueron los elaborados con la levadura X4.

A red callout box with a rectangular border and a diagonal line extending from the top-left corner to the left. The text inside is in a red, italicized serif font.

*Otras Aportaciones
Científicas*

7. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS

7.1. Otras publicaciones indexadas con índice de impacto

En este apartado se incluyen las aportaciones científicas derivadas directamente de la tesis doctoral. En este primer artículo se comenzó a poner a punto la técnica de proteómica mediante la electroforesis bidimensional con isoelectroenfoque y SDS-PAGE, acoplada a espectrometría de masas con MALDI-TOF en nuestra línea de investigación. Por estudio del perfil proteómico se confirmó la expresión de la isoenzima ADH II, que cataliza la reacción de oxidación de etanol a acetaldehído cuando la glucosa se agota, en la cepa V5 de *S. bayanus* tras 48 horas de fermentación en un medio con glucosa.

Título artículo	Effects of <i>ADH2</i> overexpression in <i>Saccharomyces bayanus</i> during alcoholic fermentation		
Autores	Maestre, O., García-Martínez, T. , Peinado, R., Mauricio, J.C.		
Revista científica	Applied and Environmental Microbiology		
Año publicación	2008	Nº citaciones	3
Volumen	74	Páginas	702-707
Índice de impacto (JCR)	3,801 (2008)		
Cuartil	1º	Lugar Nº	25/144
Categoría	Biotechnology and Applied Microbiology		
DOI	10.1128/AEM.01805-07		

En el segundo artículo se realizaron fermentaciones parciales con mosto de la variedad de uva Tempranillo con alto contenido en azúcares con las dos cepas X4 y X5 seleccionadas por su osmotolerancia procedentes de mostos fermentados. Presentaron mayor complejidad aromática como lo muestra el estudio de los compuestos volátiles mayoritarios y de sus series aromáticas a través de sus valores de actividad odorante (VAO) y fueron los mejor valorados según el análisis de las características organolépticas frente a los vinos obtenidos de manera tradicional con la adición directamente de alcohol vínico al mosto.

Título artículo	Sweet wines with great aromatic complexity obtained by partial fermentation of must from Tempranillo dried grapes		
Autores	López de Lerma, N., García-Martínez, T. , Moreno, J., Mauricio, J.C., Peinado, R.		
Revista científica	European Food Research Technology		
Año publicación	2012	Nº citaciones	0
Volumen	234	Páginas	695-701
Índice de impacto (JCR)	1,585 (2010)		
Cuartil	2º	Lugar Nº	43/128
Categoría	Food Science and Technology		
DOI	10.1007/s00217-012-1680-4		

7.2. Presentación de Comunicaciones a Congresos

En este segundo apartado se presentan tanto las comunicaciones orales como escritas en formato de póster a distintos congresos nacionales e internacionales.

1. IX Congreso Nacional de Investigación Enológica. (Badajoz, España, 2007).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, Maestre, O., Peinado, R.A., Moreno, J., Mauricio, J.C.
- Aislamiento y caracterización de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares.

Póster 2:

- Maestre, O., Fernández-López, A., **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Moreno, J., Mauricio, J.C.
- Efecto de la sobreexpresión del gen ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el metaboloma y proteoma en una cepa vínica de *Saccharomyces bayanus*.

2. Congreso Internacional del Vino y de la Viña (OIV). (Verona, Italia, 2008).

Comunicación oral:

- **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Maestre, O., Moreno, J., Mauricio, J.C.
- Must fermentation containing high sugar concentration by yeast bioimmobilization.

3. Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. (Córdoba, España, 2008).

Póster:

- **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Moreno, J., Mauricio, J.C.
- Reutilización de levaduras bioinmovilizadas para la producción de vinos dulces.

4. X Congreso Nacional de Investigación Enológica. Red Gienol. (Vigo, España, 2009).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, López de Lerma, N., Peinado, R.A., Mauricio, J.C., Bellincontro, A., Moreno, J.J.
- Fermentación de mostos de uvas Pedro Ximénez pasificadas mediante levaduras osmoetanol tolerantes seleccionadas.

Póster 2:

- Mauricio, J.C., **García-Martínez, T.**, Luna, C., Peinado, R.A., Puig, A., Moreno, J.J.
- Bioinmovilización de diferentes levaduras vínicas para su uso en Enología.

Póster 3:

- López de Lerma, N., **García-Martínez, T.**, Mauricio, J.C., Moreno, J.J., Peinado, R.A.
- Fermentación parcial de mostos de uvas Tempranillo pasificadas mediante levaduras seleccionadas.

Póster 4:

- Puig, A., Bertrán, E., Masqué, M^a C., **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Moreno, J.J., Mauricio, J.C.
- Comportamiento enológico de cepas de levadura en distintos formatos de inmovilización.

5. 14th European Congress on Biotechnology. (Barcelona, España, 2009).

Póster:

- **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Moreno, J.J., Mauricio, J.C.

- Efficacy of bioimmobilization of selected oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol biofuel production

6. XXII Congreso Nacional de Microbiología. (Almería, España, 2009).

Comunicación oral y Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, Carrizosa, M., Moreno, J.J. y Mauricio J.C.
- Efectos del uso de biocápsulas de levadura en la fermentación de mostos de uva Pedro Ximénez y crianza biológica.

Comunicación oral y Póster 2:

- Mauricio, J.C., **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Moreno, J.J.
- Estudio de la bioinmovilización levadura-hongo filamentoso.

7. II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. (Córdoba, España, 2010).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, Mauricio, J.C.
- Estudio proteómico comparativo de células de *Saccharomyces cerevisiae* libres y bioinmovilizadas.

Póster 2:

- Luna, C., **García-Martínez, T.**, Curto, M., Mauricio, J.C.
- Análisis comparativo del proteoma de una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* en dos condiciones de cultivo.

8. 8º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo (Évora, Portugal, 2010).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, López de Lerma, N., Moreno, J., Peinado, R., Mauricio, J.C.
- Efeito da bio-imobilização de leveduras osmotolerantes nos álcoois superiores em vinhos doces Pedro Ximénez parcialmente fermentados.

9. VII World Wine Forum. (Logroño, España, 2010).

Comunicación oral y Póster:

- Puig, A., Bertran, E., Vilavella, M., **García-Martínez, T.**, Mauricio, J.C., Minguez, S.
- Levaduras inmovilizadas: evaluación de su potencial enológico.

10. International Scientific Conference. (Asgabat, Turkmenistan, 2010).

Póster:

- Luna, C., **García-Martínez, T.**, Mauricio, J.C.
- Proteomic approach for understanding the physiological adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to grow on wine surface.

11. 33th World Congress of Vine and Wine. (O.I.V.) (Tbilisi, Geórgia, 2010).

Comunicación oral y Póster:

- Puig, A, Bertrán, E., Masqué, M.C., Vilavella, M., **García-Martínez, T.**, Mauricio, J.C., Minguez, S.
- Use of a new immobilization yeast system in winemaking study of its reuse.

12. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. (Córdoba, España, 2010).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, Luna, C., Mauricio, J.C.
- Estudio comparativo de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* G1 en forma libre y bioinmovilizada.

Póster 2:

- Luna, C., **García-Martínez, T.**, Curto, M., Mauricio, J.C.

- Estudio comparativo del proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* G1 en fermentación alcohólica y en formación de velo de flor.

13. XI Congreso Nacional de Investigación Enológica. Red Gienol. (Cádiz, España, 2011).

Póster 1:

- **García-Martínez, T.**, Puig-Pujol, A., López de Lerma, N., Peinado R.A., Moreno, J.J., Mauricio J.C.
- Funciones biológicas de proteínas de una levadura vínica autoinmovilizada sobre *Penicillium chrysogenum* usando 2-DE y MS.

Póster 2:

- López de Lerma, N., **García-Martínez, T.**, Moreno, J.J., Mauricio, J.C., Peinado, R.A.
- Fermentación parcial de mostos de uvas Pedro Ximénez con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas en forma libre e inmovilizada, e influencia en la producción de volátiles mayoritarios.

Póster 3:

- López de Lerma, N., **García-Martínez, T.**, Moreno, J.J., Mauricio, J.C., Peinado, R.A.
- Producción de volátiles minoritarios por distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, libres e inmovilizadas, en la fermentación parcial de mostos dulces Pedro Ximénez.

Póster 4:

- López de Lerma, N., Bellincontro, A., **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Mauricio, J.C., Mencarelli, F., Moreno, J.J.
- Diferenciación de los vinos elaborados con la variedad Pedro Ximénez mediante análisis gas-cromatográfico de compuestos del aroma y nariz electrónica.

14. 34th World Congress of Vine and Wine. (O.I.V.) (Porto, Portugal, 2011).

Comunicación oral y Póster:

- Puig, A., Bertran, E., Vilavella, M., **García-Martínez, T.**, Mauricio, J. C., Mínguez, S.
- Immobilization of yeasts for sparkling wine in biocapsules: first tests on their behaviour.

15. V Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. (Córdoba, España, 2012).

Comunicación oral y Póster:

- **García-Martínez, T.**
- Biocápsulas de levadura para su uso en vinificación.

16. I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación. (Córdoba, España, 2012).

Comunicación oral:

- **García-Martínez, T.**
- Aplicación de levaduras osmotolerantes, libres y coinmovilizadas, para la producción de vinos dulces.

7.3. Recopilación de pósteres

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS TOLERANTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES

Teresa García-Martínez¹, Oscar Maestre¹, Rafael Andrés Peinado², Juan José Moreno², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Tlf: 957218640, e-mail: mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Marie Curie.

INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es un hongo sacarofílico, en su hábitat se encuentra con elevadas concentraciones de azúcares. Sin embargo, cuando fermenta mostos con alta concentración en azúcares se presenta ciertos problemas como paradas de fermentación y fermentaciones lentas, debido a la elevada presión osmótica y al efecto tóxico del etanol sobre las levaduras. La parada prematura de fermentación produce vinos de baja calidad y estabilidad que favorece el crecimiento de microorganismos no deseables, y pueden producir una elevada acidez volátil [1].

Por ello, se recomienda el uso de cepas de levaduras osmo-etanol tolerantes. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* exhiben diferentes comportamientos de fermentación bajo condiciones de estrés [2]. Zuzuarregui y Del Olmo [3] describieron un sistema de selección de levaduras basado en la resistencia a las condiciones de estrés que se producen durante la producción de vino. También, se ha investigado la expresión de genes de respuesta a estrés de azúcares, con el objetivo de analizar los efectos debido a la particular hiperosmolaridad generada por las altas concentraciones de glucosa en los mostos [4].

Una posible solución a la parada y enlentecimiento de la fermentación de estos mostos podría ser la aplicación de células de levadura inmovilizadas tolerantes a altas concentraciones de azúcar y etanol.

El objetivo de este trabajo ha sido por un lado aislar, caracterizar y seleccionar levaduras osmo-etanol tolerantes, y por otro lado inmovilizar células de levadura mediante un nuevo sistema de inmovilización desarrollado por nuestro equipo de investigación y realizar fermentaciones con elevada concentración de glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han aislado y seleccionado 7 cepas de levadura (X2P, X2, X3, X4, X5, X6 y X9) de un mosto de uva pasificada Pedro Ximénez con 480 g/L de azúcares y fermentado hasta 11,5% (v/v) de etanol. Se han utilizado, además, tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de nuestra colección (E1, F12 y G1) tolerantes al etanol, aisladas de un mosto en fermentación y de un velo de flor de la D.O. de Montilla-Moriles. Las inoculaciones se realizaron con 4×10^6 células/mL. Para los experimentos de inmovilización se ha usado el hongo filamentososo H3 (*Penicillium*) aislado del ambiente y las cepas de levadura X5 y G1.

El medio de crecimiento ha sido YPD, las células se incubaron a 28°C, 24 horas, a 200 rpm. Se han realizado microfermentaciones con cada cepa de levadura en medio YPD, previamente esterilizado durante 30 minutos, con una concentración creciente de glucosa de 25 a 50% (p/v) en tubos Falcon de 50 mL pinchados con una aguja hipodérmica a 24°C y a 150 rpm hasta que finalizó la fermentación. El procedimiento y el medio de inmovilización celular fue el descrito por Peinado *et al.* [5], formándose las correspondientes biocápsulas de levadura.

Las dos fermentaciones con células inmovilizadas en medio YPD fueron al 50% (p/v) de glucosa. Previamente a la inoculación con las biocápsulas, éstas habían fermentado un medio YPD con 50% (p/v) de glucosa durante 4 días. Para comprobar que el hongo filamentososo muere, durante la primera fermentación, por contacto célula de levadura-hifa se han realizado fermentaciones con tubos de diálisis según Nissen *et al.*, [6].

El recuento de células se ha realizado en un contador de partículas Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman). La cinética de fermentación se ha seguido según la pérdida de peso de cada tubo de fermentación. La glucosa y el etanol se han cuantificado según los kits enzimáticos específicos de Boehringer-Mannheim, Alemania.

RESULTADOS

La Fig. 1 muestra que las velocidades más rápidas de fermentación fueron las cepas X2 y X5. Las cepas presentaron velocidades de fermentación similares hasta concentraciones de glucosa de 38% (p/v), excepto X2P. Se seleccionó la cepa X5 como mayor productora de etanol y la cepa G1 como altamente tolerante a éste.

Los experimentos con estas dos cepas y el hongo H3 se co-inmovilaron de manera natural, sin usar soportes externos y se observó que la velocidad de fermentación fue más rápida en las fermentaciones con células inmovilizadas.

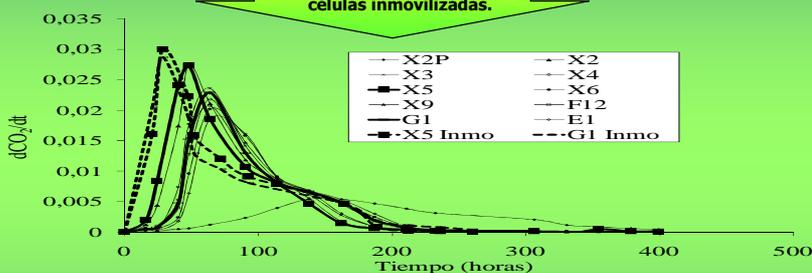


Fig. 1. Velocidad de fermentación de las células libres e inmovilizadas frente al tiempo en medio YPD con un 50% (p/v) de glucosa. La monitorización se realizó por pérdida de peso de los tubos de fermentación debido al desprendimiento de CO₂.

La Tabla 1 representa los contenidos en etanol y glucosa residual en los medios fermentados con un 50% (p/v) de glucosa.

La cepa X5 produjo mayor concentración de etanol en todos los casos (Fig.2)

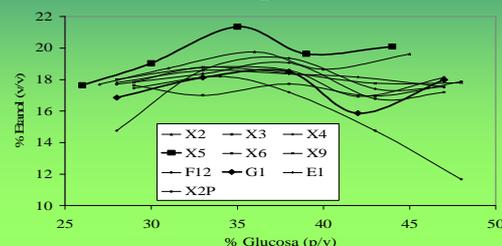


Fig. 2. Contenido en etanol alcanzado por las cepas en las fermentaciones comprendidas entre 25 y 50% (p/v) de glucosa

CEPA	ETANOL (% v/v)	GLUCOSA RESIDUAL (g/L)
X2P	9 ± 1	278 ± 35
X2	17 ± 1	145 ± 40
X3	16 ± 1	166 ± 20
X4	17 ± 0	175 ± 30
X5	18 ± 2	128 ± 20
X6	17 ± 1	189 ± 25
X9	17 ± 1	161 ± 15
F12	16 ± 1	162 ± 30
G1	17 ± 1	175 ± 20
E1	17 ± 1	174 ± 17
X5 Inmovilizada	18 ± 0	128 ± 10
G1 Inmovilizada	17 ± 1	155 ± 30

Tabla 1

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas X5 y G1, tanto en forma libre como inmovilizada, son potencialmente útiles para la elaboración de vinos dulces naturales a partir de mostos con elevada concentración de azúcares como los obtenidos a partir de uva pasificada.

BIBLIOGRAFÍA

- CARIDI, A.; CRUCITTI, P.; RAMONDINO, D. 1999. Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. *Biotechnol. Lett.* 21, 617-620.
- ZUZUARREGUI, A.; DEL OLMO, M. 2004. Expression of stress genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Res.* 4, 699-710.
- ZUZUARREGUI, A.; DEL OLMO, M. 2004. *Analysis of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion from wine yeast selection.* *Antonie Leeuwenhoek* 85, 271-280.
- ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. 2003. Genome-wide expression analysis: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* 2, 375-399.
- PEINADO, R.A.; MORENO, J.J.; MAESTRE, O.; MAURICIO, J.C. 2005. Use of a novel immobilization yeast system for winemaking. *Biotechnol. Lett.* 27, 1421-1424.
- NISSSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331-341.



EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN *ADH2* DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE EL METABOLOMA Y PROTEOMA EN UNA CEPA VÍNICA DE *Saccharomyces bayanus*



Oscar Maestre (1), Almudena Fernández-López (1), Teresa García-Martínez (1), Rafael Andrés Peinado (2), Juan Carlos Mauricio (1)

(1) Dpto. de Microbiología. Edificio Severo Ochoa, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, 14014 Córdoba, España. Fax: 957218650 e-mail: mi1gamaj@uco.es

(2) Dpto. de Química Agrícola y Edafología. Edificio Marie Curie, Universidad de Córdoba, Campus Universitario Rabanales, 14014 Córdoba, España.

INTRODUCCIÓN

En *Saccharomyces cerevisiae* hay al menos cinco genes que codifican para cinco isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa implicadas en el metabolismo del etanol, *ADH1* a *ADH5*. Las isoenzimas *ADH I, III, IV* y *V* reducen el acetaldehído a etanol durante la fermentación alcohólica, mientras que la *ADH II* cataliza la reacción inversa de oxidación de etanol a acetaldehído. Cuando la glucosa se agota del medio, la *ADH II* es la primera enzima responsable en utilizar el etanol como fuente de carbono. Mutantes de *S. cerevisiae* carentes de actividad alcohol deshidrogenasa son incapaces de crecer con etanol como única fuente de carbono y estos mutantes acumulan elevados niveles de glicerol. Aunque las secuencias que codifican *ADH I* y *ADH 2* tienen una similitud del 89%, sus productos *ADH I* y *II* difieren en la afinidad por el sustrato, la *ADH II* tiene una *Km* diez veces inferior para el etanol que el resto de las *ADHs*.

Para estudiar el efecto de la sobre expresión *ADH II* en la cepa *V5* de *Saccharomyces bayanus* (*MATA, ura3*) en fermentación, se ha clonado el gen *ADH2* de *S. cerevisiae* en un plásmido de expresión multicopia (*pVT100-U*) bajo el control del promotor constitutivo *ADH I*. La sobre-expresión se comprobó por análisis enzimático y proteómico de la cepa recombinante *V5-pVT100-U-ADH2* a las 48 horas en células creciendo en glucosa y se comparó con la cepa *V5-pVT100-U* control. Tras la comprobación de la sobre-expresión constitutiva del gen *ADH2*, se ha estudiado el comportamiento fisiológico del recombinante durante la fermentación alcohólica de la glucosa. Para ello se ha analizado, entre otros: la concentración intracelular de coenzimas de óxido-reducción (piridín nucleótidos), el perfil proteómico, los contenidos en compuestos volátiles en el medio y el crecimiento celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos y Condiciones de Fermentación:

Escherichia coli DH5a se usó para los experimentos de clonación. La cepa modelo haploide *V5* de *Saccharomyces bayanus* (*MATA, ura3*) que se ha usado en este estudio fue derivada de la cepa industrial *W6* de vino de la región de Champagne y tiene características similares a las cepas de levaduras industriales. La cepa de levadura se conservó y creció en medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 5% de glucosa). El medio de fermentación que se empleó para los experimentos fue YNB sin aminoácidos con 100 g/L de glucosa. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 250 mL cerrados con tapón de goma atravesados por una punta de micropipeta y termostatizados a 28 °C con agitación continua a 175 rpm durante 48 h. Dichas fermentaciones se inocularon con 5 x 10⁶ células/mL.

Manipulación de ADN, Técnicas de Clonación y Métodos de Transformación:

Las enzimas de restricción y modificación se usaron según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se prepararon según los protocolos estándares. Los oligonucleótidos purificados para PCR fueron sintetizados por Sigma-Genosys (UK). La transformación de *E. coli* se realizó por el método del CaCl₂-RbCl₂. *S. cerevisiae* se transformó por el procedimiento del acetato de litio.

Construcción del Plásmido:

El plásmido multicopia *pVT100-U-ADH2* contiene el gen *ADH2*. Este gen fue clonado bajo el control del promotor constitutivo de la *ADH I* de *S. cerevisiae*, y amplificado por PCR del plásmido *pMW5* usando los oligonucleótidos lindantes del casete de expresión (cebador directo: CGTCTGCAGAATGTCTATTCCAGAACTCAA, cebador inverso: ATGGATCCCGCTTATTAG AAGTGTCAACAACG), en los cuales se introdujeron los sitios de restricción BamHI y PstI. El fragmento de PCR se digirió con sendas enzimas de restricción y se clonó dentro de los sitios BamHI y PstI del plásmido *pVT100-U* para dar el vector *pVT100-U-ADH2*.

Análisis Proteómico:

Para la preparación de los extractos de células de levadura y electroforesis bidimensional se siguió el protocolo de Khouidoli *et al.*, [1]. La identificación de las proteínas se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Métodos Analíticos:

El recuento de células viables se determinó por recuento directo al microscopio óptico en cámara de Thoma por la técnica del Azul de Metileno. Para la valoración de la actividad *ADH I* y *II* se siguió el método descrito por Mauricio *et al.*, [2]. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford. La determinación de las coenzimas y aminoácidos se realizó por HPLC con detector UV. El etanol, los compuestos volátiles mayoritarios y polioles, así como los volátiles minoritarios se determinaron por cromatografía de gases. La glucosa se determinó mediante test enzimático (Boehringer-Mannheim). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

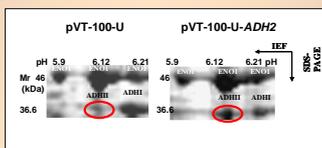
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sobre-expresión de la isoenzima *ADH II* de *S. cerevisiae* en la cepa *V5* de *S. bayanus* se ha comprobado por el análisis in vitro de la actividad *ADH II* (Tabla 1) y el análisis proteómico (Figura 1). El número de células viables fue ligeramente inferior en el transformante *V5-pVT100-U-ADH2* (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades enzimáticas de la alcohol deshidrogenasa I y II (U/mg proteína) y número de células/ml viables de los transformantes *V5-pVT100-U* y *V5-pVT100-U-ADH2* a las 48 horas creciendo en medio YNB sin aminoácidos con 100 g/L de glucosa.

Actividad enzimática	<i>V5 - pVT100-U</i>	<i>V5 - pVT100-U - ADH2</i>
<i>ADH I</i>	2.2 ± 0.5	3.0 ± 0.1
<i>ADH II</i>	0.14 ± 0.05	1.8 ± 0.2
Número de células	133x10 ⁶ ± 3x10 ⁶	108x10 ⁶ ± 2x10 ⁶

Figura 1. Electroforesis 2D. Spots: *ADH II*, *ADH I* y *Enolases*



La sobre-expresión de la isoenzima *ADH II* no afectó al perfil proteómico, pero sí a la potencialidad de óxido-reducción de la célula. La relación *NAD⁺/NADH* fue mayor en la cepa que sobre expresó el gen *ADH2*, lo que puede indicar una mayor cantidad de reacciones de reducción. Por el contrario la relación *NADP⁺/NADPH* fue algo menor en este transformante (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones intracelulares (µmol/g peso seco) de los nicotinamida adenina dinucleótidos en los transformantes *V5-pVT100-U* y *V5-pVT100-U-ADH2* a las 48 horas creciendo en medio YNB sin aminoácidos con 100 g/L de glucosa

Coenzima	<i>V5 - pVT100-U</i>	<i>V5 - pVT100-U - ADH2</i>
<i>NAD⁺</i>	2.68	4.35
<i>NADH</i>	0.29	0.26
<i>NAD⁺/NADH</i>	9.24	16.73
<i>NADP⁺</i>	0.41	0.09
<i>NADPH</i>	0.80	0.25
<i>NADP⁺/NADPH</i>	0.51	0.36

En cuanto al impacto que tiene la sobre-expresión del gen *ADH2* sobre el metaboloma de la levadura, no se observaron diferencias significativas en los siguientes compuestos: etanol, acetaldehído, glicerol, alcoholes isoamílicos, 2-feniletanol, propanoato de etilo, butanodiona, 3-OH-butirato de etilo, ácido isobutanoico, ácido butanoico, ácidos 2 y 3 metil butanoico, alcohol furfurílico, ácido hexanoico, ácido octanoico. Sin embargo, sí se observaron disminuciones en algunos alcoholes superiores, ésteres y en la pantolactona, así como aumentos significativos en la concentración de prolina, acetoina, ácido acético y ácido decanoico. La sobre-expresión del gen *ADH2* provocó un mayor consumo de glucosa a las 48 h de fermentación (Tabla 3).

Se ha comprobado que la sobre-expresión de las enzimas de la glicólisis no aumenta el flujo glicolítico, lo que significa que la glicólisis está herméticamente regulada y es muy resistente a los cambios [3]. Sin embargo, cuando se ha intentado modificar la levadura para la sobreproducción de algún producto, como por ejemplo glicerol, también se ha producido la acumulación de otros productos no deseables [4]. Las estrategias de ingeniería genética que se han llevado a cabo para modificar la acumulación de glicerol en vinos son un claro ejemplo de la dificultad que supone alterar el metabolismo de las levaduras en el sentido deseado sin ocasionar efectos colaterales indeseables en el producto que se desea mejorar.

Tabla 3. Concentraciones de compuestos volátiles, polioles, glucosa y prolina en los medios fermentados por los dos transformantes *V5-pVT100-U* y *V5-pVT100-U-ADH2* a las 48 horas creciendo en medio YNB sin aminoácidos con 100 g/L de glucosa

Compuesto	<i>V5 - pVT100-U</i>	<i>V5 - pVT100-U - ADH2</i>	Valor de p
Acetato de etilo (mg/L)	26±1	23±1	*
Ácido acético (mg/L)	160±24	353±14	***
1-Propanol (mg/L)	74±3	54±2	***
Isobutanol (mg/L)	26±1	15.1±0.1	***
Acetoina (mg/L)	23±2	48±3	***
2,3-Butanodiol, <i>levo</i> (mg/L)	498±83	351±25	*
2,3-Butanodiol, <i>meso</i> (mg/L)	126±17	76±28	*
Acetato de isoamilo (µg/L)	113±27	60±12	*
Hexanoato de etilo (µg/L)	55±18	25±2	*
3-Etoxi-1-propanol (µg/L)	1406±128	763±36	**
Metilol (µg/L)	619±151	282±41	***
Pantolactona (µg/L)	443±32	247±21	**
Ácido decanoico (µg/L)	108±18	448±55	**
Succinato de monoetil (µg/L)	115±27	66±20	*
Glucosa (g/L)	26.45±0.74	13.83±0.59	**
Prolina (mM)	0.03±0.01	0.31±0.02	**
Análisis de varianza. Valor de p: *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.			

CONCLUSIONES

La sobre-expresión del gen *ADH2* en *S. bayanus* no afectó al perfil proteómico, ni a la producción de los compuestos mayoritarios de la fermentación (etanol y glicerol), ni tampoco al contenido de acetaldehído, pero sí produjo aumentos en otros productos secundarios como acetoina, ácido acético, ácido decanoico y prolina, y disminuciones en algunos alcoholes superiores, ésteres y en la pantolactona. La mayor producción de prolina se puede relacionar con el mantenimiento del potencial de óxido-reducción celular y en el caso del ácido acético y la acetoina por un efecto detoxificador del acetaldehído, intermediario tóxico de éstos. El mayor consumo de glucosa se explica por los aumentos de estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- KHOUDOLI, G.A.; PORTER, I.M.; BLOW, J.J.; SWEDLOW, J.R. 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. Proteome Science. 2:6.
- MAURICIO, J.C.; MORENO, J.J.; ORTEGA, J.M. 1997. In vitro specific activities of alcohol and aldehyde dehydrogenases from two flour yeasts during controlled wine aging. J. Agric. Food Chem. 45:1967-1971.
- SMITS, H.P.; HAUF, J.; MÜLLER, S.; HOBLEY, T.J.; ZIMMERMANN, F.K.; HAHN-HÄGERDAL, B.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. 2000. Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 16:1325-1334.
- REMIZE, F.; ROUSTAN, J.L.; SABLAYROLLES, J.M.; BARRE, P.; DEQUIN, S. 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. Appl. Environ. Microbiol. 65:143-149.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL2005-01232/ALI concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia de España y Fondos FEDER.



FERMENTACIÓN DE MOSTOS CON ELEVADO CONTENIDO EN AZÚCARES MEDIANTE BIOINMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

*T. García-Martínez, R.A. Peinado, O.
Maestre,
J. Moreno, J.C. Mauricio*

Universidad de Córdoba. ESPAÑA

Comunicación oral

O.I.V. VERONA, 18 Junio 2008

REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS BIOINMOVILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS DULCES

Teresa García-Martínez¹, Rafael Andrés Peinado², Juan José Moreno², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa.

Tlf: 957218640, e-mail: mi.lgamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Marie Curie.



INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es un hongo sacarofílico, en su hábitat se encuentra con elevadas concentraciones de azúcares. Sin embargo, cuando fermenta mostos con alta concentración en azúcares puede presentarse ciertos problemas como paradas de fermentación y fermentaciones lentas, que podrían favorecer el desarrollo de microorganismos indeseables, que aumentan la acidez volátil y originan vinos de baja calidad. Posiblemente, estas paradas son consecuencia de las condiciones de estrés en las que se encuentran las levaduras como son la elevada presión osmótica y el etanol producido por ellas que le es tóxico. Para evitar estos problemas, los vinos dulces tradicionalmente se han elaborado mezclando los mostos de uva pasificada con alcohol vínico sin ser éstos sometidos a un proceso de fermentación parcial.

Una posible solución a la parada y enlentecimiento de la fermentación de estos mostos podría ser la aplicación de levaduras inmovilizadas tolerantes a altas concentraciones de azúcar y etanol. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un sistema de bioinmovilización entre una cepa del hongo *Penicillium chrysogenum* (H3) y una levadura de flor *Saccharomyces cerevisiae* (G1), consiguiéndose biocápsulas de levaduras. Las ventajas de la aplicación de este sistema de inmovilización de levaduras frente a su utilización en forma libre, entre otras, son el control adecuado de la fermentación hasta la concentración de etanol deseada, y la disminución de costes debido a la posibilidad de la reutilización de dichas biocápsulas.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la capacidad de reutilización de la cepa G1 inmovilizada para la fermentación de mostos de uva pasificada y poder reducir el contenido de alcohol vínico añadido a los vinos dulces. Los parámetros cuantificados en las fermentaciones con reutilizaciones sucesivas han sido: cinética de fermentación, azúcares residuales, etanol, polioles, volátiles mayoritarios y compuestos de nitrógeno como aminoácidos, ión amonio y urea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: Para la producción de biocápsulas se ha usado una levadura de flor, *Saccharomyces cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451) y como hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* H3. El medio de producción de biocápsulas y las condiciones están descritas por Peinado *et al.*, (2006).

Mosto de uva pasa y condiciones de fermentación: Se ha usado un mosto de uva pasificada al sol de la variedad Pedro Ximénez procedente de la D.O. Montilla-Moriles (Córdoba, España) con 454 g/L de azúcares (glucosa/fructosa equimolar). Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 400 mL de mosto sin esterilizar (matraces de fermentación). Las biocápsulas se confinaron en cilindros de acero inoxidable de 62 cm³ de volumen con perforaciones de 3 mm de diámetro. Las fermentaciones se realizaron a 24°C.

Métodos analíticos: Las fermentaciones se monitorizaron por la cantidad de CO₂ liberado como medida de la pérdida de peso. Los parámetros químicos generales se cuantificaron según los métodos oficiales. Los azúcares (glucosa y fructosa) se han cuantificado según un kit enzimático de Boehringer-Mannheim, Alemania. El etanol se cuantificó usando el método de Crowell y Ough. Los compuestos volátiles mayoritarios y polioles se determinaron mediante cromatografía de gases según el método propuesto por Peinado *et al.*, (2004). Para la cuantificación de los aminoácidos se siguió el procedimiento de Botella *et al.*, (1990).



RESULTADOS

Tabla 1. Concentraciones de los distintos compuestos de carbono analizados en las fermentaciones con reutilización de biocápsulas de levadura.

COMPUESTOS	MOSTO	INMOV-1	INMOV-2	INMOV-3	INMOV-4	INMOV-5
Etanol % (v/v)	0,2 ± 0,1	13,7 ± 0,2	13,3 ± 0,2	12,7 ± 0,1	8,57 ± 0,1	12,5 ± 0,1
Azúcares Residuales (G + F) (g/L)	454 ± 6	169 ± 4	211 ± 12	233 ± 12	317 ± 9	233 ± 6
Acetaldehído (mg/L)	140 ± 10	155 ± 13	212 ± 18	227 ± 7	261 ± 16	262 ± 3
Acetato de etilo (mg/L)	7,8 ± 0,3	89,55 ± 0,8	37,35 ± 3,3	39,9 ± 0,1	29,7 ± 0,4	48,05 ± 0,6
Metanol (mg/L)	33 ± 0,5	37,15 ± 3,2	39,75 ± 1,8	37,45 ± 0,1	37,4 ± 0,1	41,6 ± 1,1
Propanol (mg/L)	Nd	42,85 ± 5	60,5 ± 0,7	53,7 ± 0,7	54,1 ± 1,1	51,75 ± 1,3
Isobutanol (mg/L)	Nd	55 ± 5,7	51,1 ± 0,1	44,3 ± 0,1	42,2 ± 1,1	43,5 ± 1,4
Alc. Isoamílicos (mg/L)	Nd	148 ± 16,7	172,5 ± 2,1	118 ± 7,1	104,7 ± 7,5	98,2 ± 6,0
Acetoína (mg/L)	70,5 ± 4,9	45,2 ± 5,3	85,5 ± 16,3	80,7 ± 1,0	217 ± 24,0	120,5 ± 6,3
2,3-levo (mg/L)	140 ± 60	1464 ± 32	2300 ± 283	2627 ± 105	2497 ± 135	3176 ± 209
2,3-meso (mg/L)	131 ± 5	414 ± 75	837 ± 112	941 ± 47	913 ± 64	1084 ± 69
Succinato (mg/L)	1260 ± 96	1129 ± 160	1590 ± 443	1286 ± 8	1834 ± 135	1610 ± 3
2-Feniletanol (mg/L)	9 ± 3	34 ± 3	40 ± 3	40 ± 1	40 ± 1	43 ± 1
Glicerol (g/L)	Nd	17,4 ± 0,8	22,0 ± 2,8	18,6 ± 0,1	17,1 ± 0,2	21,7 ± 1,1
Acidez Volátil (gACh/L)	0,39 ± 0,0	0,95 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,65 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,6 ± 0,0
Acidez Titulable (meq/L)	92 ± 6	67 ± 3	71 ± 2	73 ± 3	71 ± 1	82 ± 0



Tabla 2. Concentraciones de los distintos compuestos de nitrógeno analizados en las fermentaciones con reutilización de biocápsulas de levadura.

COMPUEST (mM)	MOSTO	INMOV-1	INMOV-2	INMOV-3	INMOV-4	INMOV-5
L-Pro	25,50 ± 4,7	31,29 ± 2,1	45,01 ± 4,3	27,13 ± 1,1	19,85 ± 0,3	23,55 ± 8,4
L-Arg	1,57 ± 0,4	0,25 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,31 ± 0,1	0,06 ± 0,0	0,17 ± 0,1
NH ₄ ⁺	2,80 ± 0,3	0,28 ± 0,0	0,31 ± 0,0	0,42 ± 0,0	0,13 ± 0,0	0,58 ± 0,0
GABA	1,71 ± 0,0	1,63 ± 0,7	2,24 ± 0,3	1,74 ± 0,4	1,15 ± 0,0	1,55 ± 0,4
L-Glu	0,47 ± 0,4	0,93 ± ,05	Nd	Nd	0,24 ± 0,2	0,70 ± 0,0
L-Ala	7,41 ± 0,9	8,34 ± 3,6	9,17 ± 0,9	8,39 ± 0,9	5,74 ± 0,0	6,74 ± 1,8
L-Leu	0,45 ± 0,0	1,77 ± 0,0	1,80 ± 1,6	1,96 ± 0,0	1,86 ± 0,2	1,76 ± 0,4
L-Val	1,27 ± 0,3	0,22 ± 0,1	0,57 ± 0,1	0,56 ± 0,2	0,26 ± 0,1	0,24 ± 0,0
L-Gly	1,27 ± 0,2	1,23 ± 0,1	0,75 ± 0,6	0,38 ± 0,0	0,78 ± 0,2	0,86 ± 0,7
L-His	0,41 ± 0,0	0,04 ± 0,1	2,19 ± 0,5	1,27 ± 0,2	0,92 ± 0,1	0,71 ± 0,2
L-Ile+ L-Phe	0,53 ± 0,0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
L-Gln	1,45 ± 0,2	0,35 ± 0,1	0,44 ± 0,2	0,53 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,87 ± 0,4
Urea	0,02 ± 0,0	0,10 ± 0,0	0,24 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,12 ± 0,0	0,17 ± 0,0
L-Orn	0,49 ± 0,1	0,25 ± 0,0	0,67 ± 0,3	0,29 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,56 ± 0,2
L-Tyr	0,13 ± 0,0	Nd	0,45 ± 0,1	0,90 ± 0,1	0,20 ± 0,0	Nd
L-Lys	0,48 ± 0,1	0,13 ± 0,0	0,20 ± 0,1	0,14 ± 0,0	0,47 ± 0,3	0,39 ± 0,0
L-Ser	0,63 ± 0,0	0,72 ± 0,5	0,60 ± 0,2	0,55 ± 0,0	0,29 ± 0,1	0,47 ± 0,0
Nitrógeno Total	54,6 ± 6,4	49,2 ± 3,2	73,4 ± 8,4	50,7 ± 2,2	39,5 ± 0,9	43,9 ± 10,5

CONCLUSIONES

La aplicación de biocápsulas de levadura podría ser útil para la vinificación de vinos dulces, por las ventajas que conlleva dicho sistema de bioinmovilización, como son: la facilidad de retirar las biocápsulas en el momento deseado, su reutilización que, además de agilizar el proceso, reduce costes, y también se podrían utilizar en procesos continuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Botella M.A., Pérez-Rodríguez L., Domecq B., Valpuesta V. 1990. Amino acid content of fino and oloroso Sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 12-15.
 Peinado R.A., Moreno J.A., Muñoz D., Medina M., Moreno J.J. 2004. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6389-6393.
 Peinado R.A., Moreno J.J., Villalba J.M., González-Reyes J.A., Ortega J.M., Mauricio J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enz Microb Technol*, 40: 79-84.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (AGL2005-01232/ALI) y por fondos FEDER.

FERMENTACIÓN DE MOSTOS DE UVAS PEDRO XIMÉNEZ PASIFICADAS MEDIANTE LEVADURAS OSMO-ETANOL TOLERANTES SELECCIONADAS

Teresa García-Martínez¹, Nieves López de Lerma², Rafael Andrés Peinado², Andrea Bellincontro³,

Juan Carlos Mauricio¹, Juan José Moreno²

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C6.

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C3.

Tlf: 957218640, e-mail: gcmaur@uco.es 14014 CÓRDOBA. ESPAÑA.

³Laboratorio Post-cosecha. Universidad Tuscia. Italia.



1. INTRODUCCIÓN

Los Vinos Dulces Andaluces se elaboran a partir de uvas Pedro Ximénez y Moscatel, previamente pasificadas por exposición directa al sol. Los mostos obtenidos de estas uvas pasas presentan un color pardo oscuro, son muy densos y viscosos, poseen un aroma característico y un contenido en azúcares próximo a 400 g/L. Esta elevada concentración de azúcares dificulta la fermentación del mosto, que se hace muy lenta e incluso llega a detenerse por la baja viabilidad de las levaduras, provocada por la acción conjunta de la elevada presión osmótica y la toxicidad del etanol producido por la propia levadura, que en estas condiciones presenta una menor actividad en el transporte de glucosa [1]. Las paradas de la fermentación provocan un aumento de la inestabilidad microbiana que suele conllevar un aumento de la acidez volátil [2] y conduce a la obtención de vinos de baja calidad.

Las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* exhiben diferentes comportamientos fermentativos bajo condiciones de estrés [3], se han descrito procedimientos de selección basados en la resistencia a estas condiciones [4] y también, se ha investigado la expresión de genes de respuesta a concentraciones elevadas de glucosa [5]. No obstante, la respuesta de las levaduras a estas condiciones es compleja y está influenciada por multitud de factores, por lo que se hacen imprescindibles los ensayos de vinificación. En este sentido, el objetivo del presente trabajo es realizar fermentaciones a escala de laboratorio con las cepas X4 y X5 de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas en un trabajo anterior por nuestro equipo [6], en fermentaciones espontáneas de mostos de uva pasa Pedro Ximénez.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Mosto, correcciones pre-fermentativas y condiciones de fermentación.

Mosto: uva Pedro Ximénez, masa volúmica de 1,1543±0,0015 g/mL, azúcares reductores de 373±4 g/L; y 22 % v/v de etanol potencial. Acidez titulable 3,31±0,07 g/L, acidez volátil 0,07±0,02 y pH 4,30±0,02

Correcciones: pH hasta 3,8 con ácido tartárico; SO₂: 50 mg/L. Como K₂ S₂ O₅

Fermentación: 9 fracciones de 750 mL en probetas de 1 L. Tres probetas para un control sin fermentar, y 3 para cada una de las levaduras ensayadas. T= 24 °C

2.2. Levaduras y cultivos iniciadores.

Cepas X4 y X5 de *Saccharomyces cerevisiae*, osmo-etanol tolerantes [6] en cultivos puros. Población inoculada de cada levadura sobre cada probeta: 6,33.10⁶ células totales/mL

2.3. Métodos analíticos.

Recuento de células: Z2 Coulter (Beckman). **Cinética de fermentación:** medida de la masa volúmica. **Variables enológicas:** métodos oficiales CEE [7]. **Volátiles mayoritarios y polioles** por CG en columna capilar [8]. **Nariz electrónica:** basada en la frecuencia de resonancia de microbalanzas de cuarzo, que cambia según la masa adsorbida en la superficie del sensor [9]

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La Fig. 1 detalla el desarrollo de la fermentación y el momento de adición de alcohol vínico puro hasta un contenido del 15 % (v/v) para detener la fermentación.

La Fig. 2 muestra la cinética de fermentación de las levaduras, observándose que la levadura X5 provoca un descenso más rápido de la masa volúmica, presentando a las 140 horas un valor de 1078 g/L mientras que X4 presenta 1075 g/L a las 165 horas. El azúcar consumido por cada levadura entre 140 y 165 h es prácticamente el mismo, obteniéndose un 12 % (v/v) de etanol. En este momento se procede a detener la fermentación mediante la adición de alcohol vínico al mosto inicial, hasta un valor del 10 % y se obtiene un valor de 1153 g/L, que se mantiene inalterado hasta el fin del experimento.

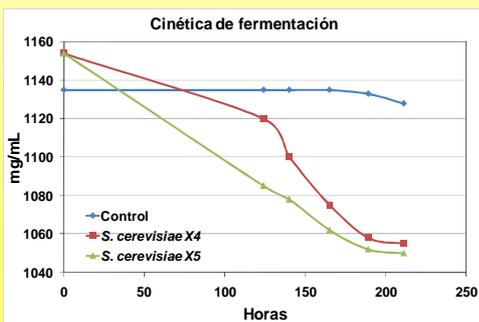
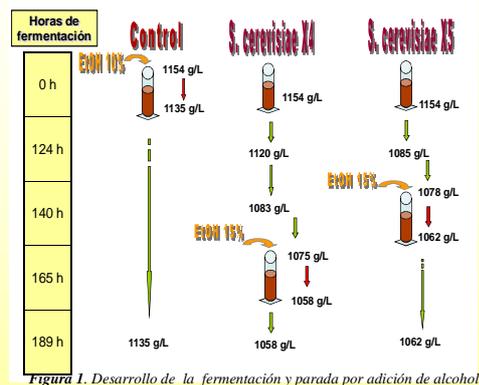


Figura 2. Masa volúmica durante la fermentación

En la Fig. 3 se representan los valores medios de los compuestos y fracciones cuantificadas en cada los tres experimentos realizados y en una muestra de vino PX elaborado de la forma tradicional.

Gráfico A: Los mostos parcialmente fermentados con X5 presentan valores de la acidez volátil superiores a los fermentados con X4 y ambos son mayores a los que poseen las dos restantes muestras no fermentadas.

Gráfico B: Destaca la mayor producción de propanol, 2-feniletanol y metanol de X4, mientras que los alcoholes isoamílicos e isobutanol no presentan diferencias entre X4 y X5.

Gráfico C: El mayor contenido en acetofina lo posee el mosto control (no fermentado) y el mayor contenido en acetato de etilo el vino elaborado de la forma tradicional. Los vinos dulces parcialmente fermentados con X4 y X5 muestran los mayores valores de acetaldehído, y valores considerados normales de acetofina, siendo en ambos casos X4 mayor productora que X5.

Gráfico D: X4 es mayor productora de 2,3-butanodiol y de glicerina, que X5, y ambos compuestos presentan un mayor contenido en estos vinos que en los dos restantes, como consecuencia de la fermentación parcial a que son sometidos.

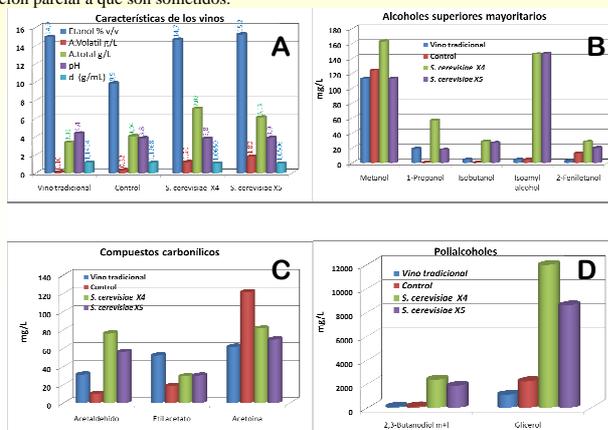


Figura 3. Características de los vinos de uvas pasas Pedro Ximénez. (A) Variables enológicas comunes. (B) Alcoholes superiores mayoritarios. (C) Compuestos carbonílicos y (D) Polialcoholes

Una nariz electrónica equipada con 7 sensores permite diferenciar entre mostos fermentados y no fermentados (Fig. 4), pero no entre los mostos fermentados. Tampoco el análisis discriminante de los compuestos volátiles permite diferenciar entre los vinos de las dos levaduras. Los resultados obtenidos muestran que la cepa X4, presenta una cinética de fermentación ligeramente más lenta que X5, produce un menor contenido en acidez volátil y un mayor contenido en 2-feniletanol, 2,3-butanodiol y glicerina, que X5. No obstante, los vinos de X5 son mejor valorados en una cata ciega.

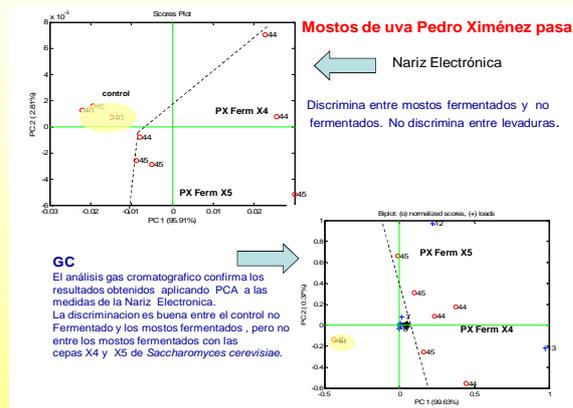


Figura 4. Análisis de componentes principales de los datos obtenidos mediante una nariz electrónica y los compuestos volátiles mayoritarios

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] Salmon & Mauricio, J.C. 1994. *Biotechnol. Lett.* 16:89-94.
- [2] Caridi et al. 1999. *Biotechnol. Lett.* 21, 617-620.
- [3] Zuzarregui & Del Olmo. 2004. *FEMS Yeast Res.* 4, 699-710
- [4] Zuzarregui, A. & Del Olmo, M. 2004. *Antoni. Leeuw.* 271-280.
- [5] Erasmus et al. 2003. *FEMS Yeast Res.* 2, 375-399..
- [6] García-Martínez, et al., 2007. *Gienol 2007.Badajoz.*
- [7] CEE. Di. O. C.E.E. L-272. Mundi-Prensa. Madrid.
- [8] Peinado et al. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6389-6393.
- [9] Di Natale et al. 2007. *Sensors & Actuators: B: Chemical*, 121, 238-246.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el Proyecto RTA 2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER y la Acción Integrada Hispano-Italiana HI 2007-0017 .

BIOINMOVILIZACIÓN DE DIFERENTES LEVADURAS VÍNICAS PARA SU USO EN ENOLOGÍA

Juan Carlos Mauricio ^{*1}, Teresa García-Martínez ¹, Carlos Luna ¹, Rafael Andrés Peinado ², Anna Puig ³, Juan José Moreno ³

¹Departamento de Microbiología. Universidad Córdoba. mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. ge1movij@uco.es

³ INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi) Estació de Viticultura i Enologia Secció d'Investigació Enològica. Vilafranca del Penedès (Barcelona) apuigpujol@gencat.cat



1.- INTRODUCCIÓN

El uso de la inmovilización celular en procesos fermentativos con *Saccharomyces cerevisiae* tiene una serie de ventajas económicas y técnicas con respecto a la fermentación clásica con levadura libre, como son aumento de la producción, reutilización de las células y además, permite fácilmente desarrollar procesos continuos [1]. Uno de los aspectos más importantes y críticos en la inmovilización celular aplicada en Enología es la obtención de un buen soporte, que debe ser barato, abundante, estable y apto para la alimentación. Se han examinado diversos soportes para la inmovilización (alginatos, trozos de manzana, piel de naranja, bolas de gluten) pero han tenido diversos inconvenientes para su uso en la elaboración de vinos. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado con éxito un sistema de bioinmovilización natural y espontáneo entre una levadura de flor y un hongo filamentoso [2], éste muere durante la primera fermentación, quedando como un soporte inerte para futuras fermentaciones. Los objetivos de este estudio han sido bioinmovilizar 6 cepas vínicas de *Saccharomyces* (G1, P29, X4, X5, QA23 y Uvaferm BC) con la cepa H3 del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* y evaluar la eficiencia y aplicabilidad de estos inmovilizados en la producción de vinos.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

G1: velo de flor Montilla-Moriles
P29: cava del Penedès
X4 y X5: mostos fermentados uva pasificada
QA23: vino de Portugal
Uvaferm BC: levadura vínica
+
H3: *Penicillium chrysogenum*

6 Tipos de "Biócápsulas de levadura" diferentes

El seguimiento de la fermentación

según la pérdida de peso de cada matraz de fermentación [3]

Conteo de Células de levadura

Nº de células viables y totales: caldo de cultivo + biocápsulas [1].

Las células de levadura se separaron de las biocápsulas: una solución Ringers diluida 1/4 esterilizada durante 30 min. a 100 rpm a 4°C.

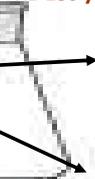
Bioinmovilización :medio YNB 150 y a 200 rpm [2]

Microfermentaciones

Matraces (250 mL)

PARADA

Al 10% (v/v) de Etanol



Medio sintético YPD esterilizado 18% (p/v) de glucosa, a 28°C, a 150 rpm con los seis tipos de biocápsulas con las levaduras en forma libre

Reutilizaciones sucesivas

3.- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

VELOCIDAD DE AGITACIÓN CEPA DE LEVADURA

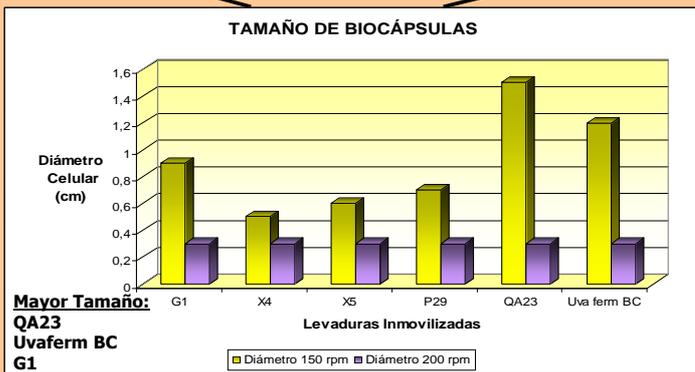


Figura 1. Tamaño de las Biocápsulas de levadura a 150 y 200 rpm

Tabla 1. Grado de Inmovilización

Cepas	Medio Formación Biocápsulas		Después de la 1ª Fermentación	
	Totales Inmovil. (10 ⁶ UFC/g)	%Viabilidad	Totales Inmovil. (10 ⁶ UFC/g)	%Viabilidad
G1	13	5 %	1400	33 %
X4	18	50 %	825	97 %
X5	42	0.24 %	583	67 %
P29	109	38 %	571	25 %
QA23	15	47 %	2600	92 %
Uvaferm BC	4	13%	629	91 %

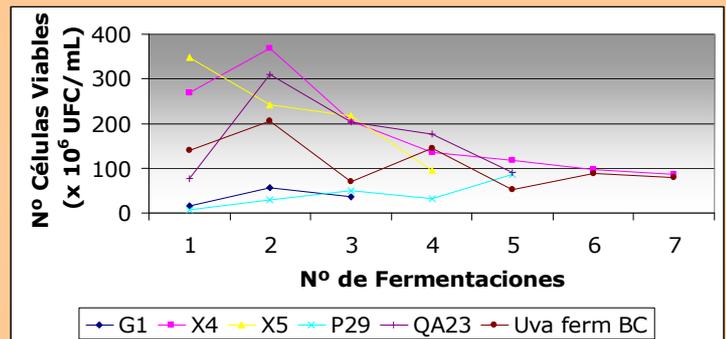


Figura 2. Número de células viables libres en el caldo de fermentación durante las reutilizaciones

Tabla 2. Duración de las distintas fermentaciones (horas) y consistencia de las biocápsulas en la última fermentación.

FL: fermentación con células libre. FB: fermentación con biocápsulas.

Cepas	1ª FL/ FB	2ª FB	3ª FB	4ª FB	5ª FB	6ª FB	7ª FB	Consistencia
G1	38/43	23	25	>40	--	--	--	++
X4	25/27	14	11	13	12	12	13	+++
X5	20/27	16	11	>45	--	--	--	+
P29	28/30	21	15	12	17	--	--	++
QA23	20/18	23	20	21	21	--	--	++
Uvaferm BC	20/23	16	14	13	10	13	13	+++

CONCLUSIONES

- El hongo filamentoso (H3) podría ser un buen soporte de bioinmovilización de las seis cepas de *Saccharomyces* para realizar fermentaciones en medios azucarados, podríamos obtener una tecnología de vinificación basada en células inmovilizadas con este hongo filamentoso.

- No se ha observado una relación directa entre el grado de inmovilización y la eficiencia de fermentación.

- X4 y Uvaferm BC, cepas de levadura que, presentaron mayor viabilidad durante la primera fermentación y mayor consistencia, fueron las que se reutilizaron un mayor número de veces durante el tiempo que duró el experimento y podrían ser las más idóneas para su bioinmovilización y uso en Enología.

4.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Plessas, S.; Bekatorou, A.; Koutinas, A.A.; Soupinou, M.; Banat, I.M. & Marchant, R. 2007. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresour. Technol.* 98: 860-865.
- [2] Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Villalba, J.M.; González-Reyes, J.A.; Ortega, J.M. & Mauricio J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enz. Microb. Technol.* 40: 79-84.
- [3] Bely, M.; Sablayrolles, J.M. & Barre P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70:246-252.

5.- AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación al Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER.

COMPORTAMIENTO ENOLÓGICO DE CEPAS DE LEVADURA EN DISTINTOS FORMATOS DE INMOVILIZACIÓN

Anna Puig ⁽¹⁾, Eva Bertran ⁽¹⁾, M. Carme Masque ⁽¹⁾, Teresa García-Martínez ⁽²⁾, Rafael Andrés Peinado ⁽³⁾, Juan José Moreno ⁽³⁾, Juan Carlos Mauricio ⁽²⁾

(1) INCAVI-IRTA (Institut Català de la Vinya i el Vi) Estació de Viticultura i Enologia. Secció d'Investigació Enològica. Vilafranca del Penedès. (Barcelona). Telf: 938902211; e-mail: enolomul@genocat.cat

(2) Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Telf: 957218640; e-mail: ml.gomez@uco.es

(3) Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Telf: 957218636; e-mail: rajmovil@uco.es

INTRODUCCIÓN

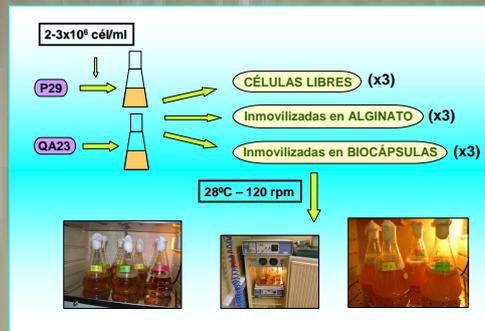
El estudio de sistemas de inmovilización celular para vinificación está recibiendo una gran atención en los últimos años por sus ventajas técnicas y económicas. Los sistemas de inmovilización aumentan la productividad, reducen los costes de proceso debido a la posibilidad de recuperación y reutilización de las células y también influyen en el metabolismo de las levaduras y, en consecuencia, en las características organolépticas del producto final. En la mayoría de sistemas conocidos y testados, las células son inmovilizadas de una manera artificial. En la industria vinica el sistema de inmovilización más utilizado ha sido la encapsulación de levaduras en alginato cálcico, compuesto orgánico que se obtiene de algas marinas y que se usa tanto en el sector alimentario como en el farmacéutico. La utilización de levaduras encapsuladas en esferas de alginato se ha aplicado sobretodo en el proceso de elaboración de vino espumoso ya que presenta grandes ventajas en la etapa de clarificación y degüelle de las botellas, por la rapidez con que sedimentan las levaduras en el cuello de éstas. En estos casos, las levaduras no se encuentran en su estado natural y, dependiendo del daño causado por el procedimiento de inmovilización, su viabilidad puede verse alterada y su metabolismo puede sufrir desviaciones que repercuten en las características organolépticas del producto fermentado. No obstante, existen microorganismos que, espontáneamente, en determinadas condiciones, producen inmovilizaciones naturales.

Recientemente se ha puesto a punto un nuevo procedimiento de inmovilización natural que favorece la co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentososo de la especie *Penicillium chrysogenum* (cepa H3) y cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de soportes inertes externos. Mediante este procedimiento se obtienen esferas huecas de los dos microorganismos denominadas biocápsulas de levaduras.

El objetivo del trabajo que se presenta ha sido estudiar el comportamiento fermentativo a escala de laboratorio para su posterior uso a escala industrial de dos cepas de *S. cerevisiae* presentadas en tres formatos de uso para vinificación: células libres y dos tipos de inmovilización: encapsuladas en esferas de alginato cálcico e inmovilizadas en forma de biocápsulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

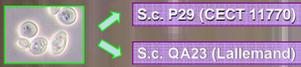
FERMENTACIONES



CONTROLES ANALÍTICOS



MICROORGANISMOS

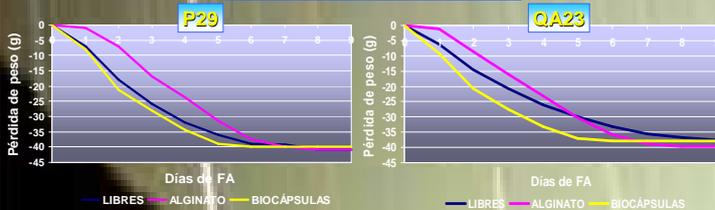


FORMATOS



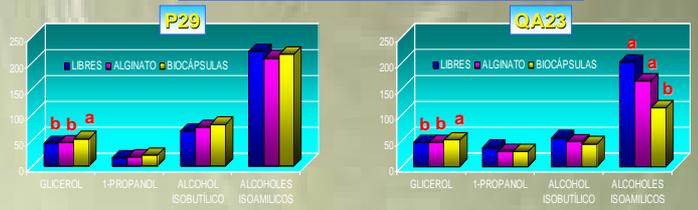
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CINÉTICAS FERMENTATIVAS



Partiendo del mismo inoculo inicial la inmovilización en biocápsulas en ambas cepas presentó la velocidad de fermentación más rápida: en 5 días se consumió todo el azúcar del mosto de partida. Los formatos de células libres e inmovilizadas en alginato cálcico siguieron un comportamiento paralelo, fermentando el mosto en 6-7 días en el caso de la P29 y en 7-8 días en el de la QA23. Aunque los tres formatos, antes de la inoculación en el mosto, se sometieron a un período de adaptación en un mismo medio de cultivo (YPD) para partir de las mismas condiciones iniciales, en ambas cepas la inmovilización en alginato retardó el inicio de fermentación 1 día. Las biocápsulas se hincharon durante la fase tumultuosa de la fermentación debido a la emisión de CO₂, pero recuperaron su diámetro y forma original pasada esta etapa. Esto demuestra las propiedades elásticas de esta forma de inmovilización.

GLICEROL y ALCOHOLES SUPERIORES



Contenido en glicerol (g/L) y alcoholes superiores (mg/L) en los mostos fermentados (media aritmética de tres fermentaciones) en los tres formatos testados. El valor de glicerol representado corresponde al valor real (x100).

Se observaron diferencias significativas (P<0,01) en la producción de glicerol en las levaduras inmovilizadas en biocápsulas: en general su concentración fue más elevada, tanto en la cepa P29 como en la QA23. Una mayor concentración de glicerol favorece la untuosidad y, en general, la estructura de los vinos. También se detectaron diferencias en la cepa QA23 en el nivel de alcoholes isoamilicos: las fermentaciones con biocápsulas produjeron menor cantidad de este grupo de compuestos, hecho que favorece organolépticamente a los vinos producidos. En el resto de alcoholes superiores analizados no se observaron diferencias significativas. No se detectaron ni 1-butanol ni 2-butanol en ninguna de las 18 fermentaciones analizadas.

Los resultados obtenidos muestran un uso potencial en primera fermentación alcohólica de las levaduras inmovilizadas y un buen comportamiento enológico del nuevo sistema de inmovilización en biocápsulas. La reutilización durante varias fermentaciones consecutivas de estos formatos y su uso en segunda fermentación para la producción de vino espumoso son los objetivos de estudio actuales.

PARÁMETROS ENOLÓGICOS

	P29				QA23					
	GAV (%vol)	Azúcares totales (G+F) (g/L)	pH	Ac. volátil (g/L ác. acético)	Ac. total (g/L ác. tartárico)	GAV (%vol)	Azúcares totales (G+F) (g/L)	pH	Ac. volátil (g/L ác. acético)	Ac. total (g/L ác. tartárico)
LIBRES	10.18±0.08	0.1±0.00	3.25±0.01	0.54±0.03	6.8±0.15	10.05±0.00	0.5±0.31	3.21±0.00	0.43±0.03	7.4±0.10
ALGINATO	10.37±0.03	0.5±0.00	3.23±0.01	0.57±0.06	7.1±0.15	10.35±0.00	0.5±0.00	3.20±0.01	0.44±0.01	7.7±0.00
BIOCÁPSULAS	9.95±0.10	0.3±0.00	3.27±0.01	0.57±0.13	6.8±0.21	9.95±0.00	0.3±0.00	3.26±0.02	0.48±0.05	7.1±0.07

No existieron diferencias notables en el grado alcohólico (GAV) entre cepas pero sí entre formatos: las levaduras inmovilizadas en alginato tuvieron una eficiencia fermentativa un poco superior a los otros dos formatos probados. También hubo un ligero incremento en la acidez total en la P29 y QA23 inmovilizadas en esferas de alginato. Entre cepas se detectó un nivel de acidez volátil algo superior en la P29, pero siempre por debajo del umbral de detección organoléptico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Proyecto RTA2008-00056-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MINECO). Agradecemos a la empresa Pregonat la encapsulación en alginato cálcico de las cepas.

BIBLIOGRAFÍA

- Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Villalba, J.M.; González-Reyes, J.A.; Ortega, J.M.; Mauricio, J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Environ Microb Technol*, 40: 79-84.
- Kondyris, P.; Goula, A.; Koutinas, A.A. 2008. Corn Starch Gel for Yeast Cell Entrapment: A View for Catalysis of Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 12037-12045.
- García-Martínez, T.; Peinado, R.A.; Maestre, O.; Moreno, J.; Mauricio, J.C. 2008. Fermentación de mostos con elevado contenido en azúcares mediante bioinmovilización de levaduras. *Boletín de FIVV*, 332-334: 559-563.
- Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Maestre, O.; Mauricio, J.C. 2005. Use of a novel immobilization yeast system for winemaking. *Biotechnology Letters*, 27: 1421-1424.
- Sablajrolles, J.M.; Barré, P.; Grenier, P. 1987. Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol Tech*, 1: 181-184.
- Pérez, A.; Villalba, M.; Bertra, E.; Minguez, S. 2002. Study of the dynamic of the population of levures dans des fermentations viniques industrielles au travers de l'étude de l'ADN mitochondrial. *Revue des Oenologues*, 105: 33-36.
- E.C. 1990. Official report of European Community nº 2676/90, L-272. Madrid, Madrid-Prrensa.
- Berneyer, H.U. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie.

EFFICACY OF BIO-IMMOBILIZATION OF SELECTED OENOLOGICAL *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS FOR ETHANOL BIOFUEL PRODUCTION

Teresa García-Martínez¹, Rafael Andrés Peinado², Juan José Moreno², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C6.

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C3.

Phone: 957218640, e-mail: mj.garcia@uco.es 14014 CÓRDOBA. ESPAÑA.



1. INTRODUCTION

The obtention of biofuels as ethanol from vegetable carbohydrates shows three phases: i) obtention of a solution of fermentable sugars, ii) the alcoholic fermentation of such solution, and iii) distillation and dehydration of the ethanol to obtain a product with 99.8% (v/v) of purity.

The efficiency of the total process is highly related with the energy necessary to obtain the bioethanol. In this sense, there are two points to keep in mind: i) the carbohydrate source and ii) the distillation phase. Two carbohydrate sources are commonly used: those containing starch or other non readily assimilable carbohydrates, which must first be subjected to heat, acid or enzymatic treatments to convert them in fermentable sugar, or those containing fermentable sugar (molasses or beet juice extracts). The first adding the production cost and the energy necessary to obtain the bioethanol (Leipper et al., 2006) and the second does not require special treatments, so the cost (economic and energetic) of the process will be lesser.

In the distillation phase, ethanol concentration plays an important role, because as much as higher is the concentration reached by means of the alcoholic fermentation, a low cost in energy will be necessary for the distillation (Bertolini et al., 1991). In this way, the fermentative phase should be optimized using microorganisms producing high concentration of bioethanol and tolerant to high sugar concentration. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism more commonly involved in the alcoholic fermentation, although the bacteria *Zymomonas mobilis* is actually being used in sugar fermentation (Zaldívar et al., 2001).

The use of *S. cerevisiae* in media containing high sugar concentration presents a series of problems like stuck or sluggish fermentations before exhausting the sugars. It is due to the high osmotic pressure and to the ethanol toxicity for yeast (Bisson, 1999; Bisson and Butzke, 2000; Aguilera et al., 2006). Thus, the glucose transport activity of yeast strains is lower in media containing high initial sugar concentration, producing as a consequence less ethanol (Salmon and Mauricio, 1994).

Usually, yeast strains involved in the industrial processes have a limited osmotolerance, so the fermentation media have sugar concentrations below 20% (w/v). Therefore, the use of osmotolerant yeast strains and highly ethanol producer is desirable in the production of bioethanol.

On the other hand, the immobilization of yeast cells shows a number of advantages for industrial fermentations, such as an increase of yield, cellular stability and a decrease in the production costs due to the ease for cell recovery and reutilization (Grobollot et al., 1994). The immobilization of osmotolerant and high ethanol producer yeast strains could be a solution for the fermentation problems of media with high sugar concentration, allowing a reduction in the cost of the bioethanol production.

In this work, we have isolated, selected and bioimmobilized osmoethanol tolerant *S. cerevisiae* strains, which the aim is to realize fermentations in high sugar concentration media. To evaluate the impact of high sugar media on selected yeast strains cellular growth, fermentation kinetic and bioethanol production were analysed.

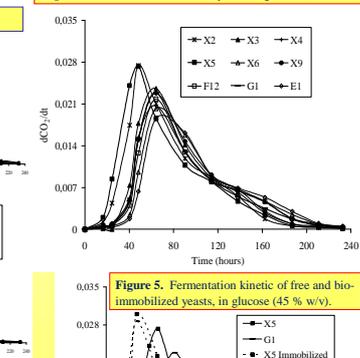
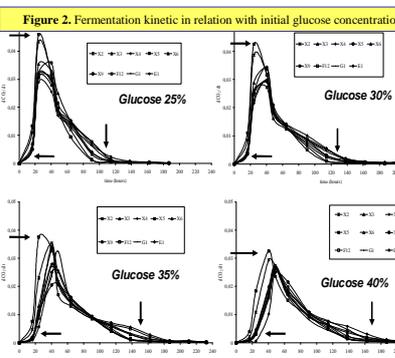
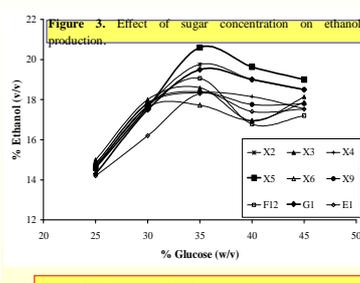
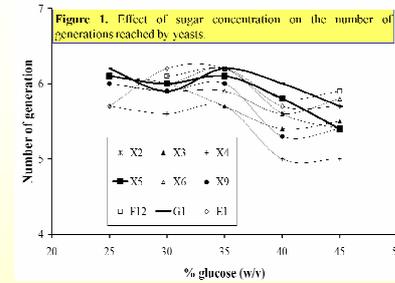
2. MATERIALS & METHODS

Isolation, identification and selection of yeast strains: Yeast were isolated from fermented grape musts obtained from ripe and dried grapes of Pedro Ximénez variety, cultivated in the Montilla-Moriles area. The identification was carried out by the Spanish Type Culture Collection (STCC). Six yeast strains were selected by their osmotolerant characteristics and their ethanol production called X2, X3, X4, X5, X6 and X9 from fermenting dried grape juice with 400 g/L of initial sugars. All these yeasts are strains of *S. cerevisiae* with a similarity of 99.1-99.9% on the sequence AY048154.1 (26S rRNA). In addition, three *S. cerevisiae* strains, E1 (ATCC: MYA-425), G1 (ATCC: MYA-2451) and F12, highly tolerant to ethanol, were isolated from ripe grape musts containing about 265 g/L of sugars, although G1 is the predominant for veil forming yeast in biologically aged wines.

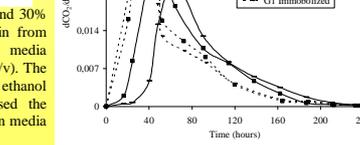
Bio-immobilization of yeast strains: The bio-immobilization was carried out without external supports using the *Penicillium chrysogenum* H3 strain, filamentous fungus and G1 and X5 yeast strains following the method of Peinado et al. (2006), patent: WO/2004/029240, PCT/ES2003/000485. **Growth media and fermentation conditions:** Yeast cells were cultured on YPD medium and incubated at 24°C, shaking at 200 rpm and collected by centrifugation at 3500 x g. Fermentations were carried out at 24°C in 50 ml Falcon tubes containing 20 ml of a solution with 1% yeast extract, 2% peptone and increased concentration of glucose from 25 to 45% (w/v). Fermentation media were sterilized 30 min by fluent steam. Fermentations with free yeast cells were inoculated with 4x10⁶ cells/ml. The Falcon tubes were punctured with a hypodermic needle and shaken at 150 rpm. Fermentations with immobilized yeast cells were carried out in media containing 45% (w/v) of glucose under the same conditions that those above described. Previously to adapt the immobilization system to the fermentation, biocapsules with the same concentration of yeast cells than in the free cell fermentations, were inoculated on YPD medium with 45% (w/v) of glucose for 5 days, and then biocapsules were washed twice with the same fresh YPD medium and used in the following fermentation. Application to ferment the sugar beet juice was carried out with the selected yeast in both forms: free and bioimmobilized.

Analytical methods: The number of total cells was determined using an electronic particle counter (Beckman Coulter Z2 Particle Count and Size Analyzer). Development of the fermentation process was monitored via the amount of CO₂ released as measured from the weight loss (Sablayrolles et al., 1987; Bely et al., 1990). The ethanol concentration was quantified using the enzymatic kit of Boehringer-Mannheim, Germany.

3. RESULTS & CONCLUSIONS



Two yeast strains exhausted the sugar in media containing 25% and 30% of glucose. (X5 strain from must of dried grape and G1 strain from biologically aged wine). Only X5 exhausted the glucose in media containing 35%, reaching an ethanol concentration around 20% (v/v). The bioimmobilization of X5 (higher ethanol producer) and G1 (higher ethanol tolerant) yeast strains on the *P. chrysogenum* strain increased the fermentation rate, without increasing the total ethanol production in media with higher sugar concentration in relation to free cells.

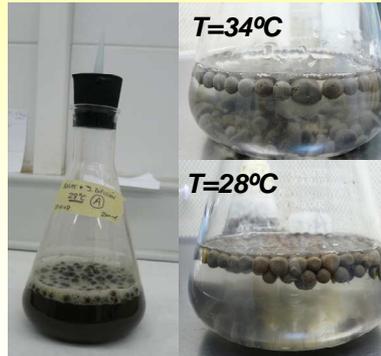


BIOETHANOL: Obtention from sugar beet juice fermentation

The non sterilized juice was fermented by free and bioimmobilized cells from *S. cerevisiae* G1 at two temperatures. The effect of temperature and the number of uses on bioethanol production were studied also. The fermentation rate and ethanol production were compared using the same yeast in free cells and in biocapsules forms.

Characteristic of Sugar beet juice	pH	%Bx (% m/m)	Sucrose (g/L)	Purity %	Potential ethanol (% v/v)
	5.6	14.9	130	87,2	7.60

Picture 1. Fermentation of sugar beet juice with biocapsules.



Picture 2. Visual aspects of biocapsules after 4 uses.

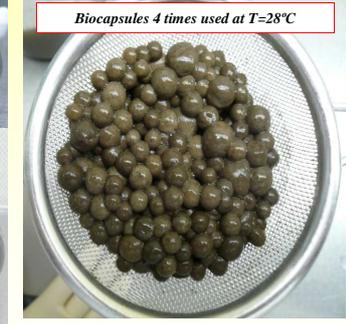


Figure 6. Effect of temperature and population of free yeast cells added on fermentation rate and ethanol production.

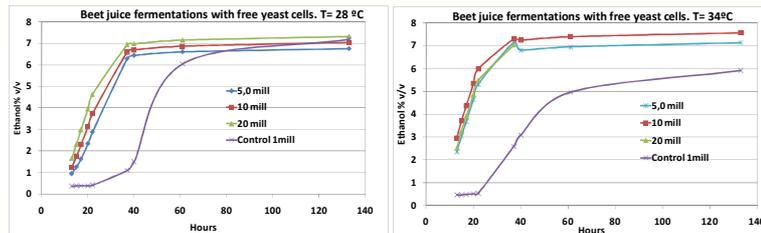
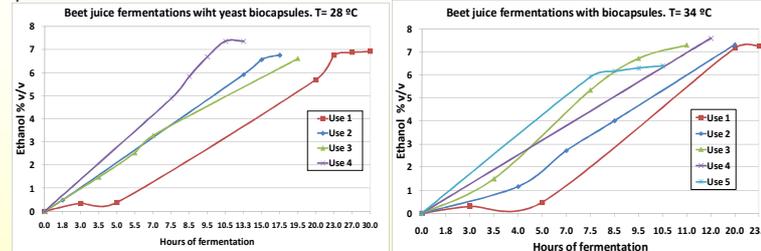


Figure 7. Effect of temperature and number of uses of immobilized yeast cells on fermentation rate and ethanol production.



Fermentations carried out with *S. cerevisiae* G1 free cells, yielded about 93% of the maximum bioethanol production in 21 hours at 28 °C and 98.6 % in 20 h at 34 °C. The efficiency diminishes, specially at 34 °C, when the free cells are reutilized in batch fermentations.

Table 1. Bioethanol efficiency production and hours (H) of fermentation.									
G-1 Yeast	T °C	Use1	H	Use2	H	Use3	H	Use4	H
Bioimmobilized cells	28	91	23	90	17.5	92	23	92	10.5
	34	97	20	98	20	90	11	87	12
Free cells	28	93	21	92	21	85	21		
	34	99	20	56	20				

The same yeast *S. cerevisiae* G1 cells in a bioimmobilized form, showed an uniform efficiency at 28 °C after four reutilizations and a higher rate fermentation and efficiency at 34 °C.

5. REFERENCES

- Aguilera et al., 2006. *Int J Food Microbiol* 110: 34-42.
- Bely et al. 1990. *J Ferment Bioeng* 70: 246-252.
- Bertolini et al. 1991. *Biotechnol Lett* 13: 197-202.
- Bisson LF. 1999. *Am J Enol Vitic* 50: 107-119.
- Bisson LF, Butzke CE. 2000. *Am J Enol Vitic* 51: 168-177.
- Grobollot et al. 1994. *Crit Rev Biotechnol* 14: 75-107.
- Leipper et al. 2006. *J Inst Brew* 112: 122-133.
- Peinado et al. 2006. *Enz Microb Technol* 40: 79-84.
- Sablayrolles et al. 1987. *Biotechnol Tech* 1: 181-184.
- Salmon & Mauricio. 1994. *Biotechnol Lett* 16: 89-94.
- Zaldívar et al. 2001. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 17-34.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant of spanish government (INIA) and FEDER: RTA 2008-00056-CO2-02. EBRO Cía de Azúcares y alcoholes. Azucarera y destilería de San José de la Rinconada, Sevilla.

EFECTOS DEL USO DE BIOCÁPSULAS DE LEVADURA EN LA FERMENTACIÓN DE MOSTOS DE UVA PEDRO XIMÉNEZ Y LA CRIANZA BIOLÓGICA

Teresa García-Martínez¹, Manuel Carrizosa¹, Juan José Moreno², Rafael Andrés Peinado², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Tlf: 957218640, e-mail: mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Marie Curie.



INTRODUCCIÓN

La producción de vino fino se realiza fundamentalmente en las zonas de Jerez y de Montilla-Moriles, y comprende dos procesos secuenciales. El primero consiste en una fermentación alcohólica del mosto de uva llevada a cabo por levaduras y el segundo proceso denominado "crianza biológica" lo realizan levaduras de flor que producen un velo o biofilm sobre la superficie del vino obtenido en el primer proceso. Estas levaduras cambian su metabolismo fermentativo por otro oxidativo o aerobio, y son las responsables de las características organolépticas del vino fino.

La aplicación de la inmovilización celular en procesos fermentativos tiene una serie de ventajas técnicas y económicas con respecto a las fermentaciones clásicas con células libres, como aumento de la productividad, menor riesgo de contaminación, se puede reutilizar y retirar fácilmente las células en el momento deseado, y además permite desarrollar fácilmente procesos continuos. Hemos conseguido una bioinmovilización entre una cepa de levadura de flor (*Saccharomyces cerevisiae* G1) y una cepa de un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum* H3) bajo unas condiciones especiales (Peinado *et al.*, 2006), en la que se forman esferas huecas con los dos microorganismos a las que hemos denominado BIOCÁPSULAS DE LEVADURA.



El objetivo del presente trabajo ha sido comparar el uso de estas biocápsulas de levadura en fermentación y en crianza biológica de vino con células libres de la levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

MOSTO DE UVA Pedro Ximénez

Microorganismos: Para la producción de biocápsulas se ha usado una levadura de flor, *Saccharomyces cerevisiae* G1 y como hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* H3.

FERMENTACIÓN

CRIANZA BIOLÓGICA



1300 mL mosto/matraz
4x10⁶ cél/mL

500 mL vino/ matraz
4x10⁶ cél/mL

Mosto de uva y condiciones de fermentación: Se ha usado un mosto de uva de la variedad Pedro Ximénez procedente de la D.O. Montilla-Moriles (Córdoba, España). Se realizaron 2 tipos de fermentaciones en matraces Erlenmeyer con 1300 mL de mosto (L= levaduras libres y B= levaduras inmovilizadas). Las fermentaciones se realizaron a 21°C. Terminada la fermentación, los vinos obtenidos se decantaron. Se vertió el sobrenadante y las biocápsulas de levaduras se lavaron con agua destilada estéril fría. Se procedió a los 2 tipos de crianza biológica.

Métodos analíticos: Las fermentaciones se monitorizaron por la cantidad de CO₂ liberado como medida de la pérdida de peso. Los parámetros químicos generales se cuantificaron según los métodos oficiales. Los compuestos volátiles mayoritarios y polioles se determinaron mediante cromatografía de gases según el método propuesto por Peinado *et al.*, (2004).

RESULTADOS

CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

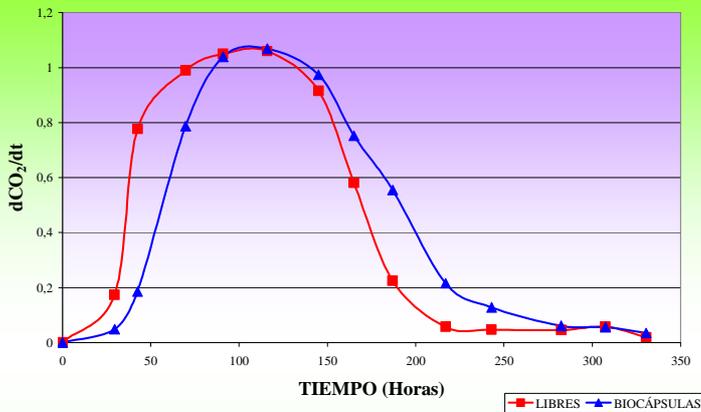
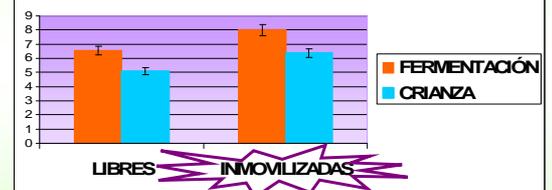


Fig. 1. Velocidad de fermentación de las células libres e inmovilizadas frente al tiempo en mosto de uva Pedro Ximénez. La monitorización se realizó por pérdida de peso de los matraces de fermentación debido al desprendimiento de CO₂.

FERMENTACIÓN



CATA ORGANOLÉPTICA



VINO VARIABLES ENOLÓGICAS	LIBRES		INMOVILIZADAS	
	FERMENTACIÓN	CRIANZA BIOLÓGICA	FERMENTACIÓN	CRIANZA BIOLÓGICA
pH	3.4 ± 0.01	3.3 ± 0.03	3.5 ± 0.00	3.5 ± 0.02
A.V. (g/L acético.)	0.4 ± 0.05	0.6 ± 0.02	0.3 ± 0.02	0.4 ± 0.05
Etanol (%v/v)	10.9 ± 0.16	9.7 ± 0.09	12.6 ± 0.23	11.1 ± 0.16
Azúcares (g/L)	2.5 ± 0.00	1.8 ± 0.14	2.5 ± 0.00	1.6 ± 0.07

Tabla 1. Concentraciones de las variables enológicas en vino en fermentación y en crianza biológica.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- EN FERMENTACIÓN NO SE OBSERVARON GRANDES DIFERENCIAS ENTRE LOS VINOS OBTENIDOS.
- EN CRIANZA BIOLÓGICA LOS MEJORES VINOS VALORADOS ORGANOLÉPTICAMENTE FUERON CON BIOCÁPSULAS.
- LA BIOINMOVILIZACIÓN PODRÍA ACELERAR EL PROCESO CRIANZA.

- E.E.C., 1990. Official Report of European Community. L-272. Mundi-Prensa, Madrid.
- Peinado *et al.*, 2004. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *J Agric Food Chem*, 52: 6389-6393.
- Póster P.033 y Comunicación Oral CO.2C.4 XXII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología-SEM. Almería. 2009.
- Sablayrolles *et al.*, 1987. Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol Tech*, 1: 181-184.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) proyecto RTA2008-00056-CO2-02 y por FEDER.



ESTUDIO DE LA BIOINMOVILIZACIÓN LEVADURA-HONGO FILAMENTOSO



JUAN CARLOS MAURICIO¹, TERESA GARCÍA-MARTÍNEZ¹, RAFAEL ANDRÉS PEINADO², JUAN JOSÉ MORENO²

¹Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Tlf: 957218640, e-mail: mi1gamaj@uco.es

²Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Marie Curie.

Bajo unas condiciones especiales se ha conseguido una bioinmovilización espontánea y estable entre una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* G1) y un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum* H3) sin adicionar soportes externos. De esta manera, se han obtenido esferas lisas y huecas formadas por ambos microorganismos a las que hemos denominado BIOCÁPSULAS DE LEVADURA.

Microorganismos



Saccharomyces cerevisiae (G1)

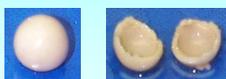


Penicillium chrysogenum (H3)

Condiciones de formación de BIOCÁPSULAS

YNB SIN AMINOÁCIDOS
ÁCIDO GLUCÓNICO
TAMPÓN FOSFATO pH 7
AGITACIÓN: 150-200 rpm
TEMPERATURA: 28°C

Inoculación: 2-4 x 10⁶ células/mL
y 2 asas de siembra con esporas
del hongo filamentoso



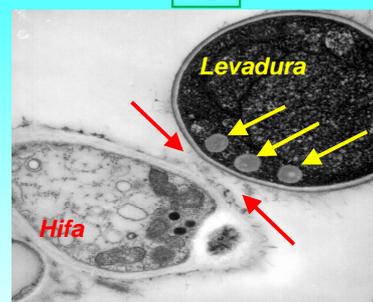
7 días



Ø Exterior: 2-20 mm

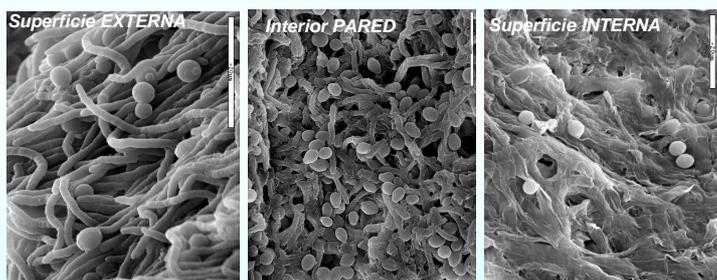
Estudio Microscópico

MET



Estudio Microscópico

MEB

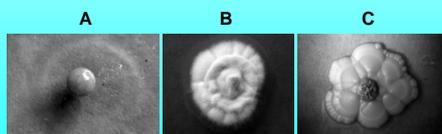


FERMENTACIÓN



Fácil recuperación
REUTILIZACIONES

Experimentos con tubos de diálisis



Contacto célula-hifa

Tras la primera fermentación el hongo filamentoso muere. Mediante tubos de diálisis hemos demostrado que el hongo filamentoso muere por contacto célula-hifa.

A: Biocápsula fresca sobre agar YPD.

B: Crecimiento de una esfera del hongo filamento sobre agar YPD después de 5 días en caldo YPD (20% glucosa p/v) con levaduras fuera del tubo de diálisis.

C: Crecimiento de una biocápsula de levadura en agar YPD después de 5 días en caldo YPD (20% glucosa p/v) donde las células de levadura estuvieron en contacto con las esferas del hongo.

CONCLUSIONES

SE HA OBTENIDO UNA BIOINMOVILIZACIÓN ESPONTÁNEA ENTRE UNA LEVADURA Y UN HONGO FILAMENTOSO SIN SOPORTES EXTERNOS.

EL HONGO FILAMENTOSO MUERE TRAS LA PRIMERA FERMENTACIÓN POR CONTACTO CÉLULA-HIFA.

ESTE SISTEMA DE BIOINMOVILIZACIÓN ES ESTABLE, PUEDE APLICARSE A DISTINTOS PROCESOS FERMENTATIVOS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) proyecto RTA2008-00056-CO2-02 y por FEDER.



ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae* LIBRES Y BIOINMOVILIZADAS

Teresa García-Martínez, Juan Carlos Mauricio

Departamento de Microbiología. Universidad Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. mi1gamaj@uco.es



Tradicionalmente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha usado en alimentación, principalmente por su producción de etanol en bebidas alcohólicas durante miles de años. Las células inmovilizadas en procesos fermentativos de interés aporta una serie de ventajas técnicas y económicas frente a los sistemas convencionales de células libres [1]. Nuestro grupo de investigación ha puesto a punto un sistema de bioinmovilización que consiste en una co-inmovilización espontánea de un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum* H3) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* G1), en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos, mediante la creación artificialmente de condiciones adecuadas para favorecer una simbiosis [2]. Al inmovilizado creado, que son esferas huecas de ambos microorganismos, lo hemos denominado "BIOCÁPSULAS DE LEVADURA", y éstas pueden ser aplicadas a diversos procesos fermentativos. El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio proteómico comparativo entre las células de levadura en forma libre y en forma bioinmovilizada en el medio de formación de las biocápsulas de levadura.

MICROORGANISMOS

Saccharomyces cerevisiae (G1)



+

Penicillium chrysogenum (H3)



BIOCÁPSULAS DE LEVADURAS



Ø Exterior: 2-250 mm

MEDIO DE FORMACIÓN DE BIOCÁPSULAS DE LEVADURAS [2]

YNB SIN AMINOÁCIDOS
ÁCIDO GLUCÓNICO
TAMPÓN FOSFATO pH 7
AGITACIÓN: 150-200 rpm
TEMPERATURA: 28°C

Inoculación: 4×10^6 células/mL G1
y 1 asa de siembra con esporas del hongo filamentoso

CULTIVO CELULAR

(L): CÉLULAS LIBRES DE G1



(B): CÉLULAS BIOINMOVILIZADAS DE G1 + H3



3.000 g, 4°C, 10'



LISIS CELULAR



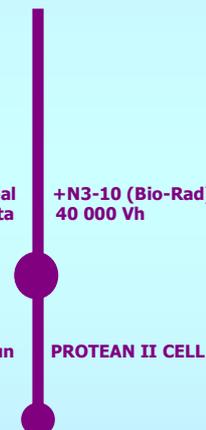
BOLAS DE VIDRIO *TAMPONES 1 y 2



EXTRACCIÓN PROTEÍNAS

TCA 10% diluida ACETONA FRÍA
Concentración Proteínas: Método BRADFORD [4]

ELECTROFORESIS 2D



*Tampón 1: SDS (5%); TRIS-HCl (0.5 M); pH 7.5
Tampón 2: Thiourea (2 M); urea (7 M); CHAPS (4 %); DTT (1%); Pharnalite 3-10 (2 %) [3]

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS-UNIDAD DE PROTEÓMICA-SCAI de la UCO

MALDI-TOF

Programa PD-Quest 8.0.1 (Bio-Rad)

BÚSQUEDA DE IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA BASE DE DATOS

El número de spots encontrados en los geles de las células libres de levadura fue aproximadamente del doble de los observados en los geles de las células de levadura inmovilizadas probablemente debido a que la levadura reduce su síntesis, porque vive a expensas del hongo filamentoso en forma de simbiosis

La totalidad de las proteínas cuantificadas se encuentran en la base de datos de SwissProt de *Saccharomyces cerevisiae* y en ambos casos abundan las proteínas de la glicolisis

En la actualidad, se está continuando con el análisis de proteínas de estos geles en estas dos condiciones ensayadas

En conclusión, el análisis proteómico de ambos geles bidimensionales muestra una disminución importante del número de spots en las células de levadura co-inmovilizadas con el hongo filamentoso. La mayor disminución corresponde a proteínas básicas de bajo peso molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I. M.; Marchant, R. & Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21: 377-397.
- [2] Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Villalba, J.M.; González-Reyes, J.A.; Ortega, J.M. & Mauricio J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enz. Microb. Technol.* 40:79-84.
- [3] Khoudoli, G.A.; Porter, I.M.; Blow, J.J. & Swedlow, R. 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Sci.* 2:6
- [4] Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- [5] Mathesius, U., Keijzers, S.; Natera, H.A.; Weinman, J.J.; Djordjevic, M.A. & Rolfe, B.G. 2001. Establishment of a root proteoma reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1:1424-1440.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación al Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER.



ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE UNA CEPA INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* EN DOS CONDICIONES DE CULTIVO

Carlos Luna¹, Teresa García-Martínez², Miguel Curto², Juan Carlos Mauricio¹

¹ Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Tlf: 957218640, e-mail: mi.lgamaj@uco.es

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa.



INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es un hongo sacarofílico, en su hábitat se encuentra con elevadas concentraciones de azúcares. El proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* en medios propicios para fermentación industrial está ampliamente estudiado. Sin embargo, existe un desconocimiento del proteoma expresado por la levadura en condiciones más restrictivas a la fermentación, como es su comportamiento en medios oxidativos. Nuestro objetivo es comparar los proteomas que se observan tanto en medios fermentativos como en medios oxidativos de manera cualitativa y cuantitativa. Vamos a discutir el nivel de expresión diferencial que se produce en proteínas comunes en ambos medios así como qué proteínas pueden estar presentes/ausentes en ambos medios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para inocular dos tipos de medios (fermentativo y oxidativo):

1º) Medio Fermentativo: YPD 17% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica.

2º) Medio Oxidativo: YNB sin aa 0.67%, ácido glutámico 10mM, 1% de glicerol y 15% de etanol.



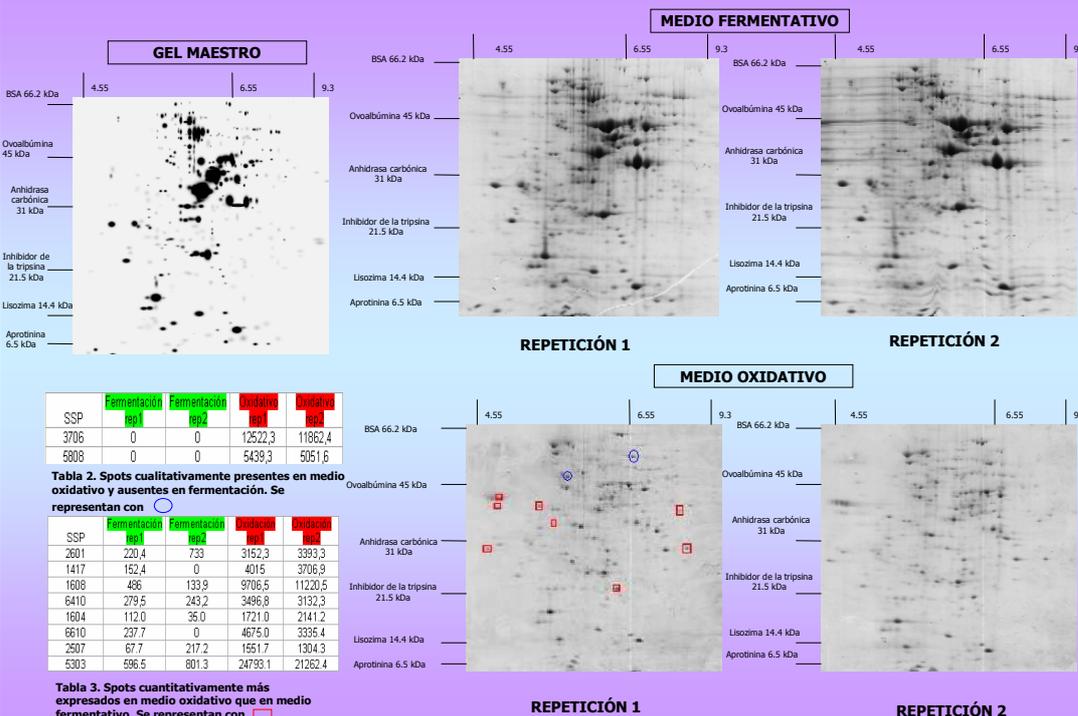
Materiales para la extracción de células y lavados: Tubos eppendorf 1.5ml-2ml, centrífuga eppendorf, centrífuga tubos falcons, agua destilada mQ, hielo picado.

Materiales para la rotura de células y extracción de las proteínas: Bolas de Vidrio 600 µm diámetro, vórtex, vibrogen, tampón de extracción (Tris 100 mM, a pH 8.0, PMSF 1mM, EDTA1 mM, DTT2 mM, cóctel de inhibidores de proteasas), hielo picado.

Materiales para la precipitación, limpieza y solubilización de las proteínas: Ácido Tricloroacético (TCA), Acetona -20°C, DTT 0.07%. Tampón de solubilización Urea 8M, 2% CHAPS y DTT 20mM, hielo picado, congelador -20°C, tubos eppendorf 1.5ml-2ml.

RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes geles, los cuales fueron procesados por el software PD-Quest 8.0.1:



SSP	Mr	pI	Medio fermentativo		C.V.%	Medio oxidativo		C.V.%	ratio (fer ox)	t_student
			desuent	desuent		desuent	desuent			
2602	44,80	5,40	271,00	16,69	6,16	0,00	0,00	-	0,0002	
1211	14,50	4,03	1920,40	294,79	10,66	0,00	0,00	-	0,0002	
3405	34,22	5,69	3419,70	193,45	5,66	0,00	0,00	-	0,0005	
1419	26,21	5,01	366,35	59,05	16,29	0,00	0,00	-	0,0006	
6211	15,28	6,40	1873,70	311,69	16,64	0,00	0,00	-	0,0010	
5210	16,19	6,29	1109,70	245,85	22,14	0,00	0,00	-	0,0020	
1222	15,51	4,94	215,35	60,60	28,14	0,00	0,00	-	0,0067	
1606	70,28	4,71	270,85	62,01	22,89	0,00	0,00	-	0,0072	
1418	26,89	4,98	465,70	44,41	9,54	2441,30	2127,40	87,14	0,19	0,0073
7801	44,60	7,07	465,15	62,59	13,45	784,75	547,65	71,61	0,61	0,0090
5306	20,68	6,14	1790,55	446,40	25,50	0,00	0,00	-	0,0105	
1807	72,21	4,71	723,35	383,93	36,34	0,00	0,00	-	0,0112	
2602	44,80	5,40	1516,25	400,59	26,42	1937,05	663,85	46,15	0,78	0,0164
6406	35,34	6,53	170,55	67,65	39,84	0,00	0,00	-	0,0222	
3501	36,23	5,65	1081,25	108,40	10,03	1079,60	378,15	35,03	1,00	0,0478
1212	13,83	4,58	2894,75	1106,41	38,09	969,70	340,25	35,09	3,00	0,0480
6213	17,91	6,41	880,90	220,71	36,75	0,00	0,00	-	0,0549	
1410	33,18	4,55	1917,50	3163,45	24,01	2614,50	1246,47	44,36	4,68	0,0629
5309	16,71	6,19	440,75	130,32	29,57	4172,85	1135,26	27,21	0,11	0,0683
3502	36,04	5,65	2192,75	636,18	29,01	3469,40	211,14	6,03	0,63	0,2789
2301	22,68	5,33	1672,60	156,13	9,33	5002,80	9,05	0,18	0,33	0,2892
5303	26,01	6,10	340,90	41,44	12,16	12545,80	808,30	6,60	0,03	0,2923
5307	15,63	6,15	1786,65	318,41	17,82	3110,55	112,84	3,62	0,57	0,3172
2302	21,53	5,34	4136,25	194,63	4,46	3698,70	115,12	3,21	1,15	0,3232
1411	33,32	5,11	8638,95	3621,40	11,02	3106,20	144,25	4,64	2,76	0,3400
1323	21,50	5,30	4667,30	1007,91	20,75	7220,25	1286,96	17,85	0,67	0,3546
3303	16,68	4,58	3513,55	680,70	25,07	1532,85	225,35	16,66	3,90	0,3615
2603	42,61	5,49	1425,00	112,57	7,90	1787,35	334,39	18,92	0,61	0,3621
2604	61,72	5,48	8639,65	772,51	11,31	17759,05	3402,01	19,61	0,38	0,3666
6410	31,66	6,77	261,30	25,74	9,65	3307,80	262,86	7,94	0,08	0,4252
3403	34,31	5,65	1232,05	480,10	39,78	1467,80	144,39	9,64	0,62	0,4632
2206	17,72	5,46	4065,50	907,50	22,21	20819,75	4910,14	21,54	0,20	0,4635
5305	24,31	6,14	488,15	187,80	35,84	646,35	76,39	11,85	0,72	0,4666
4404	34,40	5,88	8864,30	1821,35	19,88	2827,60	482,81	16,49	3,30	0,4687
6403	32,12	6,42	294,75	294,57	69,40	0,00	0,00	-	-	-

Tabla 1. Tratamiento estadístico de 36 spots, los que fueron identificados por MALDI TOF/TOF. Se obtiene un 22,12% de coeficiente de varianza global del experimento. Nivel de significación $p < 0,05$. (*) : Unidades de densidad óptica normalizadas.

CONCLUSIONES

Se ha observado que la expresión de los spots en geles de medio oxidativo está mucho menos acentuada que en los geles de fermentación, así como que el número total de spots expresados es menor que en el caso de fermentación. Se ha comprobado que las proteínas en ambos geles bidimensionales pertenecen fundamentalmente a la glicólisis, gluconeogénesis y biosíntesis de glicerol. Por otro lado, se han encontrado proteínas expresadas en medio oxidativo que no están presentes o están presentes en menor cantidad respecto al medio de fermentación. Estas proteínas se relacionan con el estrés oxidativo y actualmente están siendo estudiadas. La mayoría de las proteínas cuantificadas se encuentran en la base de datos de SwissProt de *Saccharomyces cerevisiae* (www.expasy.ch/sprot).

BIBLIOGRAFÍA

- Cheng JS, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteome analysis of robust *Saccharomyces cerevisiae* insights into industrial continuous and batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 2008; 81:327-338.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- Kolkman A, Silger M, J.R. Heck A. Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. Trends in Biotechnology 2005; 23:12.
- Matuschius U, Keijzers S, Natera HA, Weiman JJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. Proteomics 2001;1:1424-1440.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) proyecto RTA2008-00056-C02-02 y FEDER.

**BEÝIK GALKYNYŞLAR EÝÝAMYNDA
YLYM, TEHNIKA WE INNOWASION
TEHNOLOGIÝALAR**



**SCIENCE, TECHNIQUE AND
INNOVATION TECHNOLOGIES IN THE
EPOCH OF GREAT REVIVAL**

**НАУКА, ТЕХНИКА И
ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В
ЭПОХУ ВЕЛИКОГО ВОЗРОЖДЕНИЯ**

formation and study on barley genetic resources. For the first time in Kazakhstan was organized rational conservation of GPR in Kazakh Research Institute of Farming and Plant Growing.

The collection of winter barley was evaluated (600 samples). Genotypes were classified on complex indexes as productivity, frost resistance and its stability.

Spring barley was estimated on stress conditions of Syria by yield, weight of 1000 kernels and biochemical properties as a protein, Fe and Zn, β -glucan content of seeds. The perspective samples were identified for breeding.

By technique bulbosum double haploid lines (DHL) of spring barley were created characterized by high productivity, optimal technology parameters and drought tolerance. DHL were identified by hordeine, content of protein, morphological properties according UPOV and were estimated on breeding value.

As results of many years and complex work were formed and studied the barley collection of winter and spring types. The foundation of formation national data base of barley genetic resources was created.

Four new barley cultivars on malting and forage trends were developed: Bastama, Akjol, IleK 34 and KazSuffle. In 2006 the barley variety Akjol is double haploid was permitted for using.

**Carlos Luna, Teresa García-Martínez,
Juan Carlos Mauricio
(Spain)**

**PROTEOMIC APPROACH FOR UNDERSTANDING
THE PHYSIOLOGICAL ADAPTATION OF
SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO GROW ON
WINE SURFACE**

The study of the biological ageing of wine, is promoted by flor yeasts, has aroused increasing interest in recent years, as reflected in many papers for the last decade. Once alcoholic fermentation completed, some *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains present in



Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura,
Alimentació i Acció Rural



INCAVI

Institut Català de la Vinya i el Vi



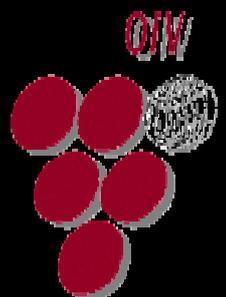
TECNIO
Be tech. Be competitive

USE OF A NEW IMMOBILIZATION YEAST SYSTEM IN WINEMAKING. STUDY OF ITS REUSE.

Anna Puig, Eva Bertran, M^a Carme Masqué,
Margarita Vilavella, Teresa García Martínez,
Juan Carlos Mauricio, Santiago Mínguez

✓ **Comunicación Oral**

TOUCH THE HISTORY





ESTUDIO COMPARATIVO DE PROTEÍNAS DE *Saccharomyces cerevisiae* G1 EN FORMA LIBRE Y BIOINMOVILIZADA

Teresa García-Martínez, Carlos Luna, Juan Carlos Mauricio

Departamento de Microbiología. Universidad Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. teresagarciamz@hotmail.com



INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación ha optimizado un sistema de bioinmovilización, que consiste en una co-inmovilización espontánea de un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum* H3) y una levadura de flor (*Saccharomyces cerevisiae* G1), en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos. Bajo ciertas condiciones se induce una unión entre ambos microorganismos, que podría constituir un tipo de simbiosis. Se obtienen esferas huecas de ambos microorganismos que hemos denominado "biocápsulas de levadura", y éstas podrían ser aplicadas a diversos procesos fermentativos.



(L): CÉLULAS LIBRES DE G1



(B): CÉLULAS BIOINMOVILIZADAS DE G1 + H3

El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio proteómico comparativo entre las células de levadura en forma libre y en forma bioinmovilizada en el medio de formación de las biocápsulas de levadura.

METODOLOGÍA

MICROORGANISMOS

Saccharomyces cerevisiae (G1)
Penicillium chrysogenum (H3)

MEDIO FORMACIÓN BIOCÁPSULAS

YNB SIN AMINOÁCIDOS
ÁCIDO GLUCÓNICO
TAMPÓN FOSFATO pH 7
AGITACIÓN: 150-200 rpm
TEMPERATURA: 28°C

Inoculación: 4 x 10⁶ células/mL G1 y 1 asa de siembra con esporas del hongo filamentoso
Ø B. Exterior: 2-250 mm

ANÁLISIS PROTEÓMICO

Según el protocolo seguido por García-Martínez and Mauricio (2010). SeProt

- 1) CRECIMIENTO CELULAR
- 2) LISIS CELULAR
- 3) EXTRACCIÓN PROTEÍNAS
- 4) ELECTROFORESIS 2D
- 5) IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (UNIDAD DE PROTEÓMICA-SCAI de la UCO)
- 6) MALDI-TOF
- 7) Programa PD-Quest 8.0.1 (Bio-Rad)
- 8) BÚSQUEDA IDENTIFICACIÓN PROTEÍNAS EN BASE DE DATOS

RESULTADOS

FUNCIONES PROTEÍNAS CUALITATIVAS PRESENTES EN LEVADURA LIBRE

(SP) Spot Number	Protein name (gene)	UNIPROT KB Accession No	MspI Experimental (Theoretical)	Protein Score	Matched peptides	Protein Score LC. %	Cellular Location
1005 (16f)	Thiamine nucleoside regulatory protein THIG1 (THIG)	O07471	12704.93 (66949.36.93)	28	4	23.92%	Núcleo
5706 (2fL)	Potassium-activated adenylyate dehydrogenase, mitochondrial (ALD4)	P46367	527705.98 (56973.36.31)	629	31	100	Mitocondria
1002 (16f)	Uncharacterized protein YOR021C (YOR021C)	Q12314	15404.73 (24784.84.93)	31	5	58.76%	Citoplasma

FUNCIONES PROTEÍNAS CUALITATIVAS PRESENTES EN LEVADURA BIOINMOVILIZADA

(SP) Spot Number	Protein name (gene)	UNIPROT KB Accession No	MspI Experimental (Theoretical)	Protein Score	Matched peptides	Protein Score LC. %	Cellular Location
1107	Fructose biphosphate aldolase (FBA1)	P14540	206604.78 (39880.95.51)	125	14	100	Citoplasma
0113	Protein GRE1 (GRE1)	Q08969	179304.42 (19014.54.55)	79	2	99.99%	Citoplasma
4103	Single-stranded nucleic acid binding protein (SSB1)	P10080	162805.69 (33026.45.48)	34	6	82.81%	Citoplasma Núcleo
1007	Single-strand telomeric DNA-binding protein (GFP2) (GFP2)	P25555	148704.96 (49040.85.95)	48	9	99.28%	Núcleo
1108	Potassium-activated adenylyate dehydrogenase, mitochondrial (ALD4)	P46367	201304.97 (56973.36.31)	109	14	100	Mitocondria
2106 (17a)	Potassium-activated adenylyate dehydrogenase, mitochondrial (ALD4)	P46367	176005.24 (56973.36.31)	204	9	100	Mitocondria
1112	DNA repair protein RAD50 (RAD50)	P12753	183305.15 (152988.15.78)	45	14	98.46%	Mitocondria
0113	Enhancer of RNAi silencing protein 1 (EDC1)	P53080	178004.42 (19262.810.87)	45	5	98.32%	Citoplasma

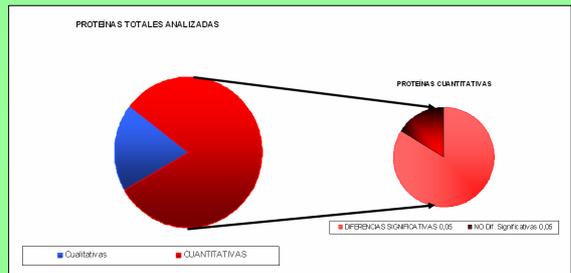
ANÁLISIS ESTADÍSTICO: SEGÚN EL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) UN 84% DE LAS PROTEÍNAS CUANTITATIVAS FUERON PROTEÍNAS DIFERENTES CON UN NIVEL DE SIGNIFICACIÓN DE 0,05:

Proteínas en negro: Nivel de significación < 0,05, presentan diferencias significativas al 95%.

Proteínas en rojo: Nivel de significación > de 0,05, no presentan diferencias significativas.

SSR	ANOVA < 0,05 < 0,001
0011	0,000
0102	0,000
0107	0,046
0112	0,015
1021	0,000
1201	0,013
1203	0,000
2003	0,017
2005	0,005
2107	0,001
2100	0,014
3003	0,128
3102	0,012
3103	0,000
3203	0,005
3407	0,005
3408	0,016
4101	0,012
4102	0,031
4104	0,000
4204	0,180
4406	0,010
4409	0,046
5101	0,000
5102	0,004
5601	0,003
5609	0,000
6104	0,042
6108	0,000
6202	0,001
6302	0,009
6436	0,003
6511	0,000
7004	0,000
7011	0,000
7418	0,044
7517	0,006
7520	0,007
7611	0,130
8004	0,004
8306	0,000

PROTEÍNAS TOTALES ANALIZADAS E IDENTIFICADAS



FUNCIONES DE PROTEÍNAS CUANTITATIVAS CON "FOLD CHANGE" > 2,0 CON RESPECTO A LEVADURA BIOINMOVILIZADA

(SP) Spot Number	Protein name (gene)	UNIPROT KB Accession No	MspI Experimental (Theoretical)	Protein Score	Matched peptides	Protein Score LC. %	Cellular Location	Fold Change Relative to BL
1201 (24b)	DnaK1 (DNR1)	P08024	34705.67 (42705.16.03)	148	17	100	Citoplasma	1.912699
1203 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	346704.83 (37939.8.51)	60	6	99.98%	Citoplasma	2.14468382
3407 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	14249.74 (37939.8.51)	100	12	100	Citoplasma	2.25454991
4101 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	180305.02 (1995.5.51)	100	6	100	Citoplasma Mitocondria	2.61201203
4102 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	169705.03 (17880.9.51)	148	11	100	Citoplasma Mitocondria	2.89907221
5106 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	173809.18 (37939.8.51)	54	6	99.80%	Citoplasma	3.37705538
6104 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	170109.19 (37939.8.51)	70	6	99.90%	Citoplasma	1.9990544
7004 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	164709.61 (37939.8.51)	156	7	100	Citoplasma	7.81097
8004 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	16907.25 (37939.8.51)	131	4	100	Citoplasma	2.5287
8306 (124b)	DnaK1 (DNR1)	P08024	42705.67 (42705.16.03)	48	8	99.19%	Citoplasma	2.2492838
8407 (24b)	Rad50 (RAD50)	P12753	187409.29 (152988.15.78)	44	6	97.93%	Núcleo	2.75667566
3408 (16f)	Sphingase 1 (SFA1)	P14540	346704.83 (37939.8.51)	60	11	99.99%	Citoplasma	3.6922
4101 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	180305.02 (1995.5.51)	100	4	100	Citoplasma	5.4181846
4102 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	169705.03 (17880.9.51)	148	2	100	Citoplasma	8.2006073
8004 (16f)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (TDH0)	P08159	16907.25 (37939.8.51)	131	2	100	Citoplasma	8.2006073
8407 (24b)	Rad50 (RAD50)	P12753	187409.29 (152988.15.78)	44	11	96.46%	Núcleo	4.49012281
8409 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	346704.83 (37939.8.51)	60	4	100	Núcleo	3.8189
2006 (24b)	Protein Sphingase 1 (SFA1)	P14540	346704.83 (37939.8.51)	71	1	100	Núcleo	2.8355

CONCLUSIONES

De entre todas las proteínas estudiadas y que han podido ser identificadas, la mayoría de las proteínas cualitativas presentes en las células de levadura bioinmovilizada, y no en forma libre, pertenecen a proteínas mitocondriales y citosólicas, que responden a diversos tipos de estreses y a reparación del DNA

BIBLIOGRAFÍA

García-Martínez, T., Mauricio, J.C. (2010). Estudio proteómico comparativo de células de *Saccharomyces cerevisiae* libres y bioinmovilizadas. II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. Córdoba 2010. Publicado en la revista Proteómica 5:119-120. ISSN: 1888-0096.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este estudio al Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN-INIA) y FEDER.



ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE *Saccharomyces cerevisiae* G1 EN FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA Y EN FORMACIÓN DE VELO DE FLOR

Carlos Luna¹, Teresa García-Martínez², Miguel Curto², Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamento de Microbiología. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. teresagarciamz@hotmail.com



INTRODUCCIÓN

La crianza biológica es un proceso de envejecimiento de ciertos vinos en el que intervienen distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se les denominan "levaduras de flor" y que son las responsables de las características organolépticas de estos tipos de vinos. Estas levaduras pueden fermentar un medio azucarado y después de agotados éstos cambiar a un metabolismo oxidativo y formar un biofilm o biopelícula sobre la superficie del vino llamado "velo de flor". En este trabajo se ha comparado por primera vez el perfil proteómico de una cepa de levadura de flor, *Saccharomyces cerevisiae* G1, fermentando y bajo velo de flor.

RESULTADOS

FUNCIONES PROTEINAS CUALITATIVAS PRESENTES EN MEDIO DE FORMACIÓN DE VELO

Spot Number	Protein name (gene)	UNIPROT KB Accession No.	Mw/pI Experimental (Theoretical)	Protein Score	Matched peptides	Cellular Location
CARBON METABOLISM						
23	Isoacetic dehydrogenase (NAD) subunit 2, mitochondrial (EHE2)	P28241	40300/7,52 (39806/8,83)	75	10(65)	Mitochondria
24	Isoacetic dehydrogenase (NAD) subunit 1, mitochondrial (EHE1)	P28334	43840/7,97 (39200/8,99)	82	11(65)	Mitochondria
26	Phosphoglycerate kinase (PGK1)	P09560	49640/7,06 (44758/7,11)	75	10(58)	Cytoplasm
27	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP1)	P32861	58160/7,68 (58181/8,58)	82	18(65)	Cytoplasm
28	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (GDH2)	P32191	65930/7,73 (72790/7,96)	141	20(65)	Mitochondria
NITROGEN METABOLISM						
25	Phospho-2-dehydro-3-dehydrogenase, phosphotransferin subunit (ARO3)	P14843	41360/7,24 (41500/7,04)	101	15(65)	Mitochondria, Nucleus
FOLDING PROTEIN						
17	Saccharopapain (PEP4)	P07267	48190/5,2 (44699/6,7)	57	9(65)	Vacuole
18	Saccharopapain (PEP4)	P07267	48350/5,21 (44699/6,7)	56	9(65)	Vacuole
RESPONSE TO STRESS						
21	NADH-cytochrome b5 reductase 2 (BCCR2)	A6Z2H2	31030/6,75 (34144/6,65)	120	14(65)	Mitochondria
22	NADH-cytochrome b5 reductase 2 (BCCR2)	A6Z2H2	31030/6,69 (34144/6,65)	109	12(65)	Mitochondria
20	Mitochondrial peroxiredoxin (PEX1/PRX3)	P34227	28210/10,70 (29648/9,97)	71	10(65)	Mitochondria
UNKNOWN FUNCTION						
19	Phosphatidyl inositol protein 2 (PST2)	Q12315	24660/5,95 (21010/5,46)	76	8(76)	Mitochondria, Plasma membrane

En cuanto a las proteínas cualitativas expresadas en medio de formación de velo, la mayoría se encuentran en la mitocondria, y algunas en el citoplasma. Las funciones de estas proteínas identificadas están relacionadas con el metabolismo del carbono, del nitrógeno y con la respuesta al estrés.

Con respecto a las proteínas cuantitativas identificadas durante la formación del velo en relación a las expresadas durante la fermentación son fundamentalmente proteínas mitocondriales y citosólicas. Las funciones principales de las proteínas cuantitativas a destacar son las relacionadas con el metabolismo del carbono, metabolismo del nitrógeno, respuesta al estrés tanto oxidativo como al choque térmico, proteínas de plegamiento, y organización del citoesqueleto. Estas proteínas podrían ser muy importantes para el mantenimiento del velo.

CONCLUSIONES

El conocimiento del perfil proteómico de estas levaduras de flor podría ser esencial para comprender la respuesta adaptativa al estrés en el que se encuentran y podría ayudarnos a mejorar las características organolépticas para la producción de vinos de gran calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Saccharomyces cerevisiae (G1)

1^o) Medio Fermentativo: YPD 17% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica.

2^o) Medio Oxidativo: YNB sin aa 0.67%, ácido glutámico 10mM, 1% de glicerol y 1.5% de etanol.

1) CRECIMIENTO CELULAR

- 2) LISIS CELULAR
- 3) EXTRACCIÓN PROTEÍNAS
- 4) PRECIPITACIÓN PROT.

5) 2D-PAGE

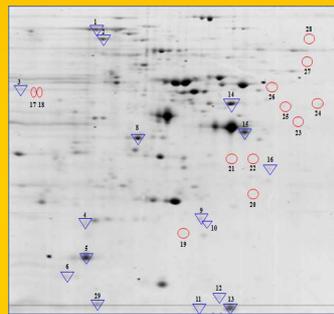
6) BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN PROTEÍNAS EN BASE DE DATOS

7) ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Programa PD-Quest 8.0.1 (Bio-Rad)

Según el protocolo seguido por García-Martínez and Mauricio (2010). SeProt

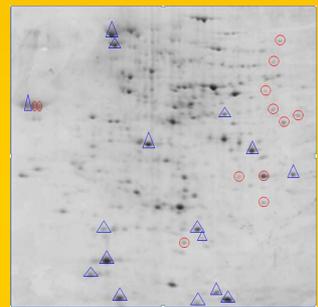
Bolas de Vidrio 600 µm diámetro, vórtex, vibrogen, tampón de extracción (Tris 100 mM, a pH 8.0, PMSF 1mM, EDTA1 mM, DTT2 mM, cóctel de inhibidores de proteasas). Ácido Tricloroacético (TCA), Acetona -20°C, DTT 0.07%. Tampón de solubilización: Urea 8M, 2% CHAPS y DTT 20mM.



MEDIO FERMENTATIVO

○ PROTEÍNAS CON DIFERENCIAS CUALITATIVAS

△▽ PROTEÍNAS CON DIFERENCIAS CUANTITATIVAS, EXPRESADAS MÁS DE 2X EN VELO QUE EN FERMENTACIÓN, ANALIZADAS ESTADÍSTICAMENTE CON UN NIVEL DE SIGNIFICACIÓN DEL 0.05



MEDIO OXIDATIVO

FUNCIONES DE PROTEINAS CUANTITATIVAS CON "FOLD CHANGE" > 2,0 CON RESPECTO AL MEDIO DE FORMACIÓN DE VELO (MEDIO OXIDATIVO)

Spot Number	Protein name (gene)	UNIPROT KB Accession No.	Mw/pI Experimental (Theoretical)	Protein Score	Matched peptides	Cellular Location	Fold Change Refold to Fermentation
CARBON METABOLISM							
15	Malic dehydrogenase, mitochondrial (MDH2)	P17768	91120/7,76 (91625/8,40)	225	25(65)	Mitochondria	2,2
NITROGEN METABOLISM							
14	Phospho-2-dehydro-3-dehydrogenase, phosphotransferin subunit (ARO3)	P14843	41360/7,24 (41500/7,04)	101	15(65)	Cytoplasm	1,9
FOLDING PROTEIN							
6	Endoplasmic reticulum chaperone protein 78 kDa (HSP70)	P27101	78260/5,23 (77215/5,13)	90	10(48)	Cytoplasm	2,4
11	6S ribosomal protein L22-A (RPL22A)	P08748	19780/6,62 (19885/6,51)	63	6(55)	Cytoplasm	6,7
12	Papain proteinase C, from papaya fruit, mitochondrial (PP2B)	P27719	20100/8,44 (20205/8,31)	65	8(65)	Mitochondria	1,9
13	Papain proteinase C, from papaya fruit (PP1C)	P14812	19860/8,2 (17448/8,3)	95	10(65)	Cytoplasm	2,7
RESPONSE TO STRESS							
1	Heat shock protein 90kDa (HSP90)	P10911	78260/5,23 (87760/5,29)	316	35(65)	Cytoplasm	7,6
2	Heat shock protein 90kDa (HSP90)	P10912	80260/5,16 (80999/5,23)	275	31(65)	Mitochondria	1,5
4	Proteinase 2S A1 (PSA1)	P14760	25100/2,28 (24948/2,35)	68	3(65)	Cytoplasm	5,4
5	Proteinase inhibitor 1 (API1)	P10811	22970/3,29 (22742/3,1)	105	15(65)	Cytoplasm	1,9
9	Superoxide dismutase (SOD), mitochondrial (SOD2)	P08447	21180/6,04 (20815/6,09)	94	8(65)	Mitochondria	1,1
10	Papain proteinase C, from papaya fruit (PP1C)	Q91576	20760/8,02 (20965/8,02)	71	8(65)	Cytoplasm, Nucleus	6,9
16	NADH-cytochrome b5 reductase 2 (BCCR2)	A6Z2H2	31030/6,69 (34144/6,65)	109	12(65)	Mitochondria	2,9
CYTOSKELETON ORGANIZATION							
8	Calnexin (CNX1)	Q01664	69460/5,29 (67000/5,26)	86	9(71)	Cytoplasm	6
CELLULAR PROCESSES-OTHERS							
18	Isoacetic dehydrogenase (NAD) subunit 1, mitochondrial (EHE1)	P28334	43840/7,97 (39200/8,99)	87	12(65)	Cytoplasm	2,1

BIBLIOGRAFÍA

García-Martínez, T., Mauricio, J.C. (2010). Estudio proteómico comparativo de células de *Saccharomyces cerevisiae* libres y bioinmovilizadas. II Jornadas Bienes de Jóvenes Investigadores en Proteómica. Córdoba 2010. Publicado en la revista Proteómica 5:119-120. ISSN: 1888-0096.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este estudio al Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN-INIA) y FEDER.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS DE UNA LEVADURA VÍNICA AUTOINMOVILIZADA SOBRE *Penicillium chrysogenum* USANDO 2-DE Y MS

Teresa García-Martínez¹, Anna Puig-Pujol², Nieves López de Lerna³, Rafael Andrés Peinado³, Juan José Moreno³, Juan Carlos Mauricio¹

¹Departamentos de Microbiología y ³Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Telf: 957218640 milgamaj@uco.es y Telf: 957218636 qe1movij@uco.es

² INCAVI-IRTA. Estació de Viticultura i Enologia. Vilafranca del Penedès (Barcelona). Telf: 938900211, e-mail: apuigpujol@gencat.cat



INTRODUCCIÓN El uso de sistemas de células inmovilizadas en procesos fermentativos de interés, como la elaboración de productos alimenticios (vino, vinagre, cerveza), es un área de investigación muy atractiva y emergente debido a las ventajas técnicas y económicas que presenta comparado con los sistemas tradicionales de células libres [1]. Nuestro grupo de investigación ha optimizado un sistema de bioinmovilización, que consiste en una co-inmovilización espontánea de un hongo filamentos (*Penicillium chrysogenum* H3) y una levadura de flor (*Saccharomyces cerevisiae* G1), en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos. Bajo ciertas condiciones se induce una unión entre ambos microorganismos, en el que se obtienen unas esferas huecas que hemos denominado "biocápsulas de levadura", y que se podrían aplicar a diversos procesos fermentativos [2]. El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio proteómico comparativo entre las células de levadura en forma libre (L) y en forma bioinmovilizada (B) en el medio de formación de las biocápsulas de levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Saccharomyces cerevisiae (G1)

BIOCÁPSULAS DE LEVADURAS



Ø : 3 mm

MEDIO DE FORMACIÓN DE BIOCÁPSULAS DE LEVADURAS

YNB SIN AMINOÁCIDOS
ÁCIDO GLUCÓNICO
TAMPÓN FOSFATO pH 7
AGITACIÓN: 150-200 rpm
TEMPERATURA: 28°C

Inoculación: 4 x 10⁶ células/mL G1
y 1 asa de siembra con esporas del hongo filamentos

1) CULTIVO CELULAR

(L): CÉLULAS LIBRES DE G1
(B): CÉLULAS BIOINMOVILIZADAS

2) LISIS CELULAR

BOLAS DE VIDRIO
*TAMPONES 1 y 2

3) EXTRACCIÓN PROTEÍNAS

TCA 10% diluida ACETONA FRÍA

Concentración Proteínas: Método BRADFORD [4]

*Tampón 1: SDS (5%); TRIS-HCl (0.5 M); pH 7.5

Tampón 2: Thiourea (2 M); urea (7 M); CHAPS (4 %); DTT (1%); Pharnalite 3-10 (2 %) [3]

4) ELECTROFORESIS 2D

IEF: IPG de 17 cm, con gradiente de pH no lineal +N3-10 (Bio-Rad) en un PROTEAN IEF CELL 50 µA *per tira* hasta 40 000 Vh

SDS-PAGE: 13% de poliácridamida en un PROTEAN II CELL 60 mA *per gel*

5) TINCIÓN CON CBB G-250

6) MALDI-TOF

RESULTADOS

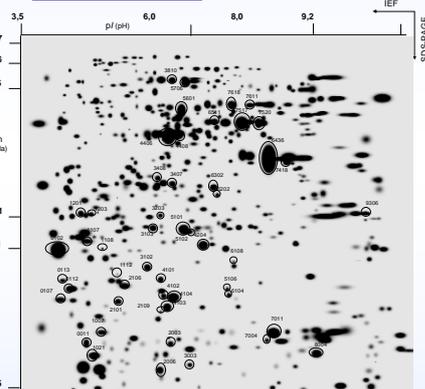


Figura 1. Gel "master" representativo del proteoma de la levadura *S. cerevisiae* G1 obtenido por 2-ED. Se detallan todos los spots que muestran una expresión diferencial cualitativa y cuantitativa en células de levadura en forma libre y bioinmovilizada.

Tabla 2. Proteínas identificadas agrupadas según su función y/o proceso en el que participa, SSP, denominación, abreviatura utilizada y localización dentro de la célula de levadura en forma Libre.

FUNCIÓN BIOLÓGICA	SSP	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ABREVIATURA (nº Acceso)	ORGÁNULO CELULAR
Respuesta a estrés	0102	Proteína secretada de protoplasto	Q12335	Mi
	5706	Aldehído deshidrogenada mitocondrial	P46367	Mi
Metabolismo carbohidratos	3810	Piruvato descarboxilasa	P06169	C,N
	4406	Amino-desoxi-corisomato liasa	Q03266	C
	5601	Enolasa 2	P00925	C
	6302	Alcohol deshidrogenasa 2	P00331	C
	6436	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P00359	C
	6511 7517	Alcohol deshidrogenasa 1	P00330	C
9306	Fosfoglicerato mutasa 1	P00950	C	

N: Núcleo; C: Citoplasma; Mi: Mitocondria. SSP: proteínas cuantitativas, SSP: proteínas cualitativas

En conclusión, el análisis proteómico de los geles bidimensionales en las dos condiciones estudiadas indica que las proteínas expresadas en las células de levadura bioinmovilizada tienen funciones relacionadas con la reparación y maduración del ADN, con el control del ciclo celular; además de la síntesis y traducción de proteínas, funciones implicadas en el control tanto a nivel de ciclo celular como de transcripción.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe una defensa de las levaduras inmovilizadas frente al hongo bajo las condiciones ensayadas, marcada a través de una serie de controles a nivel de ADN, de ARN y de proteínas.

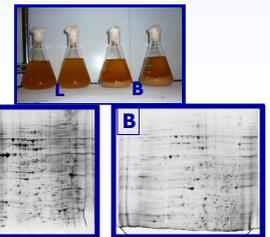


Figura 2. cultivos celulares y geles bidimensionales.

Tabla 3. Proteínas identificadas agrupadas según su función y/o proceso en el que participa, SSP, denominación, abreviatura utilizada y localización dentro de la célula de levadura Bioinmovilizada.

FUNCIÓN BIOLÓGICA	SSP	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ABREVIATURA (Nº ACCESO)	ORGÁNULO CELULAR
Control ciclo celular	1107	Esperrina sintasa	Q12455	C
	0011	Proteína F-Box COS111	P38308	N,C
	1021	Proteína SCP160	P06105	N
	2006	Factor de Pre- empalme CWC2	Q12046	N
Síntesis de ARNr y ARNt	0107	Ribonucleasa P	P53833	N
Maduración ADN	1007	Proteína de unión a una sola hebra ADN	P25555	N
Reparación ADN	1112	Proteína de reparación del ADN RAD50	P12753	Mi
Respuesta a estrés	4104	Superóxido dismutasa	P00445	C,Mi
	0113	Proteína GRE 1	Q08969	C
	4103	Proteína de unión a ARN	P10080	C,N
Transporte	1108 6202	ATPasa vacuolar Golgin IMH1	P17255 Q06704	V C
	1203 4101 4102	Fructosa-bisfosfato aldolasa	P14540	C
Metabolismo de Carbohidratos (Gluconeogénesis)	3407 5106 6104 7004 8004	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P00359	C
	2003	Enolasa 1	P00924	C
	2106	Guanilato quinasa	P15454	N
	6108	Glutamil-ARNt sintetasa	P46655	C
	3408	Factor elongación 2	P32324	C
Síntesis y traducción de proteínas	5101	Proteína ribosomial 60S L21-A	Q02753	C

N: Núcleo; C: Citoplasma; Mi: Mitocondria; V: Vacuola. SSP: proteínas cuantitativas, SSP: proteínas cualitativas

Tabla 1. Resultado global del análisis total mediante el software PDQuest de los geles 2-DE obtenidos para ambas condiciones. L: levadura Libre; B: levadura Bioinmovilizada; ns: no significativo.

Manchas proteicas (spots)	Analizados PDQuest	Identificados MS
Cambios Cualitativos	112	8 1 en L
		7 en B
Cambios Cuantitativos	412	36 (p< 0,05)
		7 ns
TOTAL	524	51

[1] Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I. M.; Marchant, R. & Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21: 377-397.

[2] García-Martínez, T., Peinado, R., Moreno, J., García-García, I., Mauricio, J.C. 2011. Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilisation of yeast. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86: 812-817.

[3] Khoudoli, G.A.; Porter, I.M.; Blow, J.J. & Swedlow, R. 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Sci.* 2:6.

[4] Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación al Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN-INIA-CCAA) y FEDER y a una beca FPU del Ministerio de Educación (convocatoria 2008).

Fermentación parcial de mostos de uvas Pedro Ximénez con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas en forma libre e inmovilizada, e influencia en la producción de volátiles mayoritarios

Nieves López de Lerma¹; Teresa García-Martínez²; Juan José Moreno¹; Juan Carlos Mauricio²; Rafael Andrés Peinado¹

¹Departamento de Química Agrícola y Edafología. Edificio C3. ²Departamento de Microbiología. Edificio C6. Tlf.: 957 218 534, e-mail: b92lolem@uco.es
Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba.



1. INTRODUCCIÓN



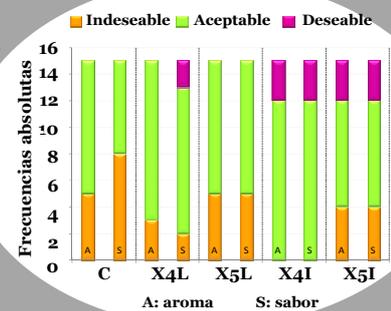
En la D.O. Montilla-Moriles se elabora vino dulce encabezando el mosto porque su elevada concentración de azúcar crea gran estrés osmótico a las levaduras. En el presente trabajo se pretende fermentar parcialmente mostos de uvas pasificadas Pedro Ximénez con dos cepas de *S.cerevisiae*, X4 y X5, con gran resistencia osmótica y producción de etanol. Ambas se inocularán libres e inmovilizadas, presentando esta última forma una serie de ventajas. Se estudiará el impacto de la fermentación en los volátiles mayoritarios y en las características organolépticas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS



3. RESULTADOS

c. Análisis sensorial



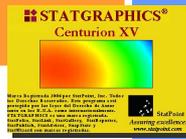
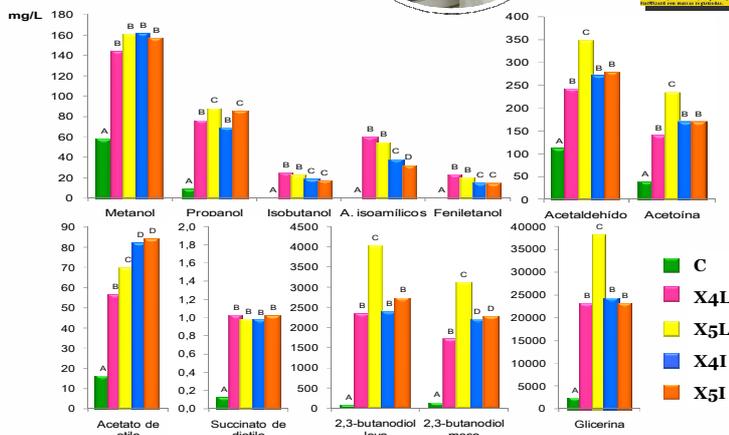
b. Análisis estadístico

ANOVA multifactorial ($p < 0,05$ estadísticamente significativos)

Compuesto	Levadura	Inmovilización	Interacciones
Metanol	0,4534	0,3721	0,2012
Propanol	0,0233	0,3050	0,6053
Isobutanol	0,1056	0,0022	0,7993
Alcoholes isoamílicos	0,0370	0,0002	0,7627
2-feniletanol	0,1486	0,0027	0,2340
Acetaldehído	0,0604	0,4172	0,0896
Acetoina	0,0151	0,1853	0,0150
Acetato de etilo	0,0569	0,0024	0,1211
Succinato de dietilo	0,9350	0,8730	0,3590
2,3-butanodiol <i>levo</i>	0,0071	0,0364	0,0280
2,3-butanodiol <i>meso</i>	0,0042	0,2322	0,0063
Glicerina	0,0075	0,0075	0,0042

3. RESULTADOS

a. Volátiles mayoritarios



Análisis de conglomerados por el método de Ward



4. CONCLUSIONES

Los vinos dulces obtenidos por fermentación parcial de mostos de uva pasificada Pedro Ximénez presentan mayor complejidad aromática que los elaborados de forma tradicional, sobre todo con la levadura X4 inmovilizada, ya que aparecen aromas secundarios conservando parte de los aromas primarios.

AGRADECIMIENTOS:
Proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN-INIA-CCAA) y fondos FEDER, referencia RTA2008-00056-C02-02 y Beca FPU del Ministerio de Educación (convocatoria 2008).



Producción de volátiles minoritarios por distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, libres e inmovilizadas, en la fermentación parcial de mostos dulces

Pedro Ximénez



Nieves López de Lerma *¹; Teresa García-Martínez ²; Juan José Moreno ¹; Juan Carlos Mauricio ²; Rafael Andrés Peinado ¹
¹ Departamento de Química Agrícola y Edafología. Edificio C-3. ² Departamento de Microbiología. Edificio C-6
 Campus Rabanales. Universidad de Córdoba.. *Tlf.: 957 218 534, e-mail: b92lolem@uco.es.

Elaboración tradicional de vino dulce PX en la D.O. Montilla-Moriles



UVA MADURA



VOLTEO



UVA PASIFICADA



RECOGIDA



PRENSADO



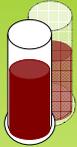
ENCABEZADO DEL MOSTO Y REPOSO

No hay fermentación → Vinos carentes de aromas fermentativos

Objetivo: Fermentar parcialmente con levaduras osmotolerantes en forma libre e inmovilizada

Elaboración tradicional

MOSTO + 15% ETANOL



23°C

Fermentación parcial hasta 8% etanol

LEV. INMOVILIZADA

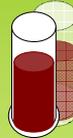
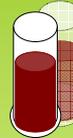
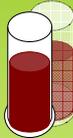
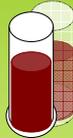
LEV. LIBRE

X4

X5

X4

X5



Parada de fermentación con etanol hasta 15% y refrigerando a 2°C

Determinación de volátiles minoritarios por CG-MS



EXTRACCIÓN



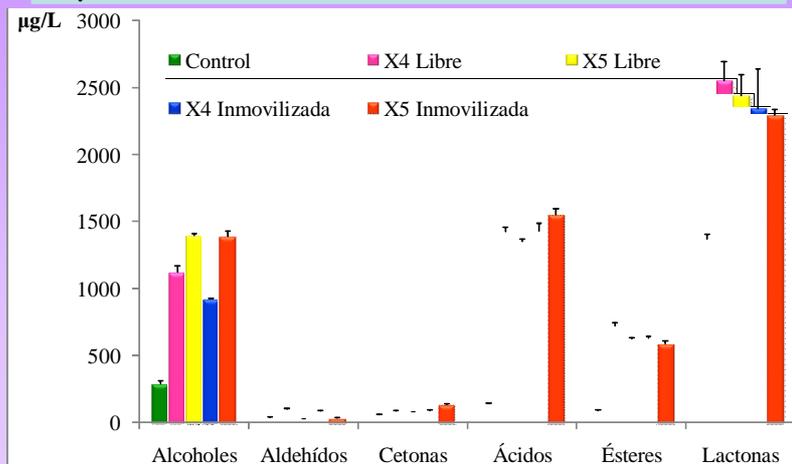
CONCENTRACIÓN



CUANTIFICACIÓN

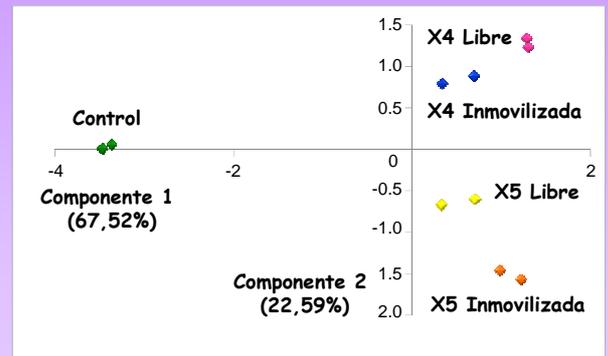
Resultados

Mayor concentración de volátiles en vinos fermentados



Diferenciación de los vinos atendiendo a:

- la fermentación (componente 1)
- el tipo de levadura (componente 2)



Conclusiones

Los vinos fermentados presentan una mayor concentración de compuestos volátiles lo que sin duda repercutirá en la su calidad aromática. Los problemas asociados a la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar se minimizan con la utilización de levaduras osmotolerantes. La utilización de levaduras inmovilizadas permite una retirada rápida de las mismas una vez se haya alcanzado la concentración de etanol deseada.

Agradecimientos

Proyecto RTA2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y Fondos FEDER.
 Beca FPU del Ministerio de Educación en la convocatoria del 2008.



DIFFERENCIACIÓN DE LOS VINOS ELABORADOS CON LA VARIEDAD PEDRO XIMÉNEZ MEDIANTE ANÁLISIS GAS-CROMATOGRÁFICO DE COMPUESTOS DEL AROMA Y NARIZ ELECTRÓNICA.

Nieves López de Lerma¹, Andrea Bellincontri², Rafael Andrés Peinado¹, Teresa García-Martínez³, Juan Carlos Mauricio³, Fabio Mencarelli², Juan José Moreno^{1*}

¹ Departamento de Química Agrícola y Edafología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C3.

² Laboratorio Post-cosecha. Universidad Tuscia. Italia.

³ Departamento de Microbiología. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edificio C6.

Tlf: 957218636, e-mail: qe1movij@uco.es. 14014 CORDOBA. ESPAÑA.



1. INTRODUCCIÓN

La nariz electrónica ha resultado una herramienta eficaz para el estudio de los compuestos volátiles en la industria de los alimentos. En Enología, se ha usado para la diferenciación de vinos obtenidos a partir de diferentes variedades y en diferentes campañas y para el reconocimiento de contaminaciones por *Brettanomyces* u otros agentes productores de olores extraños e indeseables [1] [2] [3] [4] [5] y [6]. Recientemente se ha usado para diferenciar calidades de vinos y para el estudio de tratamiento de deshidratación de las uvas y de vinos dulces elaborados mediante fermentación parcial o sin fermentación de las uvas Pedro Ximénez pasificadas [7] [8] [9] [10] y [11]. Por otro lado, las técnicas de análisis por cromatografía de gases están muy consolidadas y existen numerosos métodos y protocolos de análisis robustos y ampliamente utilizados en los laboratorios enológicos para la cuantificación e identificación de los compuestos volátiles. No obstante, estos métodos suelen ser laboriosos, requieren un equipamiento caro y sofisticado y un personal altamente cualificado, por lo que suelen reservarse para problemas muy específicos y en puntos críticos importantes del proceso de elaboración o en la caracterización del producto final, previamente a su comercialización.

En este trabajo se estudian los contenidos en compuestos volátiles mayoritarios y la respuesta de una nariz electrónica con el fin de establecer diferencias objetivas entre 5 tipos de vinos elaborados en la Denominación de Origen Montilla-Moriles a partir de la variedad de uva Pedro Ximénez.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 3 muestras de vinos embotellados de cada tipo: joven, fino, amontillado, oloroso, y Pedro Ximénez, que fueron seleccionados por los catadores oficiales del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Montilla-Moriles como representativos de los 5 tipos de vino elaborados en esta zona vitivinícola.

Las variables enológicas se cuantificaron mediante los métodos de la OIV [12], mientras que los compuestos volátiles mayoritarios y los polioles se cuantificaron por CG en columna capilar [13]. La nariz electrónica portátil usada se basa en la frecuencia de resonancia de microbalanzas de cuarzo, que cambia según la masa adsorbida en la superficie del sensor [14]. Por último, cada muestra fue analizada por triplicado y la media resultante se usó para el análisis estadístico. Los datos proporcionados por la nariz electrónica y mediante el análisis cromatográfico de 13 compuestos volátiles, junto al contenido en etanol y acidez volátil se sometieron a análisis de componentes principales (PCA), usando el paquete estadístico Unscrambler® v. 9.2 (CAMO ASA, Oslo, Norway).

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El vino joven de mesa presenta contenidos en etanol del 12 %, le sigue el vino fino con un contenido natural en etanol del 15% v/v y también el vino dulce PX que contiene un 15% de etanol, en su mayor parte añadido. El alto contenido de los vinos amontillado y oloroso se obtiene mediante adición de etanol vínico, de acuerdo a su proceso de elaboración.

La acidez volátil en los vinos amontillado y oloroso posee valores que duplican o triplican los del vino joven y fino. El bajo contenido del vino fino es debido al consumo de ácido acético por las levaduras de velo durante la crianza biológica. La acidez titulable presenta valores en torno a 5 g/L (como ácido tartárico) y los valores superiores de los vinos amontillado y oloroso se explican por el alto contenido en acidez volátil, mientras que el valor más bajo del vino dulce es debido a la ausencia de ácidos de origen fermentativo. Las densidades de todos los vinos se encuentran por debajo de la unidad, salvo en el caso del vino PX dulce. (Fig. 1 A).

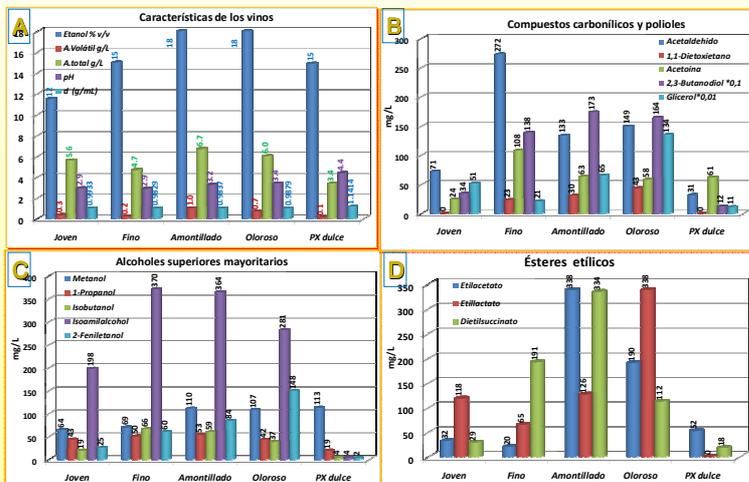


Figura 1. Características enológicas (A), compuestos carbonílicos y polialcoholes (B), alcoholes superiores mayoritarios (C) y ésteres etílicos (D) de los 5 tipos de vino elaborados a partir de la uva Pedro Ximénez en Montilla-Moriles.

Según se muestra en la Fig. 1B, los vinos finos amontillados y olorosos poseen un elevado contenido en acetaldehído, dietoxietano y acetoina y también el vino dulce presenta contenidos elevados de acetoina que se produce durante la pasificación de la uva. Los vinos finos y dulces poseen menor contenido en glicerina que los restantes, aunque por distintas razones: en los vinos finos, las levaduras de velo consumen glicerina durante la crianza biológica, mientras que los vinos dulces no poseen cantidades importantes de este compuesto dado que se elaboran mediante una fermentación parcial. Los contenidos en 2,3-butanediol están en relación con el grado alcohólico formado durante la fermentación. En la Fig. 1C destaca que los alcoholes isoamílicos son mayoritarios en todos los vinos, a excepción del vino dulce, donde predomina el metanol. El segundo alcohol en importancia en los vinos olorosos es 2-feniletanol, mientras que los restantes vinos muestran contenidos semejantes al isobutanol. Por último en la Fig. 1D, destaca dietilsuccinato como el éster etílico más abundante en los vinos con mayor tiempo de crianza, como los vinos finos, amontillados y olorosos. Acetato de etilo y lactato de etilo se relacionan fundamentalmente con la actividad de bacterias acéticas y lácticas, respectivamente.

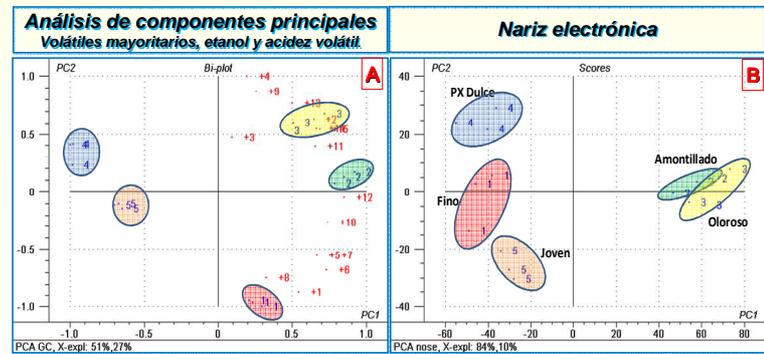


Figura 2. A: Análisis de componentes principales de los contenidos en: +1 Acetaldehído; +2 Etilacetato; +3 1,1-Dietoxietano; +4 Metanol; +5 1-Propanol; +6 Isobutanol; +7 Isoamílicoalcohol; +8 Acetoina; +9 Etilacetato; +10 Dietilsuccinato; +12 2,3-Butanediol; +13 Glicerol; +14 Etanol; +15 Acidez volátil. B: Análisis de componentes principales de los datos obtenidos mediante una nariz electrónica.

Mediante PCA de los compuestos determinados por GC y análisis químico (Fig. 2 A) se obtiene dos componentes (PC1 y PC2 que explica el 51% y el 27% de la varianza, obteniéndose una clasificación de las muestras en 5 grupos, que coinciden con cada tipo de vino. Sobre PC1 influyen fundamentalmente butanediol, dietilsuccinato, etilacetato, etanol y acidez volátil. Sobre PC2 influyen compuestos carbonílicos, metanol y lactato de etilo.

Mediante PCA de los datos de los sensores de la Nariz Electrónica (EN) se obtienen 2 componentes: PC1 explica el 84% y PC2 el 10% de la varianza total (Fig. 2B). PC1 diferencia los vinos de tipo amontillado y oloroso de los vinos: dulce, fino y joven, que se separan muy bien por PC2. Los sensores de la EN no son capaces de detectar cambios en los compuestos volátiles característicos de los vinos amontillado y oloroso y en consecuencia la diferenciación de estos vinos por EN no es tan buena como la obtenida mediante PCA de los datos químicos y gas-cromatográficos.

Existe una relación entre los valores de PC1 y PC2 de la Nariz Electrónica y el tipo de crianza de cada vino. Los vinos finos, sometidos a crianza biológica, poseen valores negativos de PC1; y los vinos amontillados y olorosos, sometidos a crianza química oxidativa presentan valores positivos de PC1. Los vinos de tipo joven no se someten a crianza y muestran valores negativos de PC2 mientras que los dulces, muestran valores positivos.

Los resultados obtenidos mediante EN están de acuerdo con las características sensoriales propias de cada tipo de vino. Incluso la respuesta obtenida para el vino amontillado y el oloroso es similar a la impresión olfativa de un catador no entrenado en este tipo de vinos.

La Nariz Electrónica se revela como una técnica eficaz y rápida para la clasificación objetiva de diferentes tipos de vinos de la misma variedad de uva, aunque presenta limitaciones en la diferenciación de vinos elaborados por procedimientos muy semejantes.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] Di Natale et al. 1995. Sensor & Actuators B: Chem., 25, 801-804.
- [2] Buratti et al. 2004. Analytica Chimica Acta, 525, 133-139.
- [3] García et al. 2006. Sensors & Actuators B: Chem., 113, 911-916.
- [4] Lozano et al. 2006. Sensor & Actuators B: Chem. 120, 166-171.
- [5] Alejandro et al. 2008. Sensor & Actuators B: Chem. 131, 71-76.
- [6] Cynkar et al. 2007. Sensor & Actuators B: Chem. 124, 167-171.
- [7] Di Natale et al. 1996. Sensor & Actuators B: Chemical, 33, 83-88.
- [8] Di Natale et al. 2004. Analytica Chimica Acta, 513, 49-56.
- [9] Cozzolino et al. 2006. Analytica Chimica Acta, 563, 319-324.
- [10] Chkhalba et al. 2007. Aust J Grape & Wine Res. 13, 142-149.
- [11] García-Martínez et al. 2011. Food Chem. 127, 1391-1396.
- [12] OIV 2008. Méthodes Internat. d'analyse des vins et moûts.
- [13] Peinado et al. 2004. J. Agric. Food Chem. 52, 6389-6393.
- [14] Di Natale et al. 2007. Sensors & Actuators B: Chem. 121:238-246.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado mediante el Proyecto RTA 2008-00056-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER y la Acción Integrada España-Italia HI 2007-0017 Ministerio de Educación, y una beca FPU convocatoria 2008.



IMMOBILIZATION OF YEASTS FOR SPARKLING WINE IN BIOCAPSULES: FIRST TESTS ON THEIR BEHAVIOUR

**Anna Puig-Pujol, Eva Bertran, Fina Capdevila,
Margarita Vilavella, Teresa García Martínez, Juan
Carlos Mauricio, Santiago Mínguez**

Comunicación oral

apuigpujol@gencat.cat /

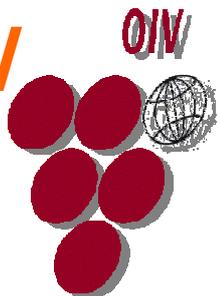
anna.puig@irta.cat

**Work supported by the Spanish Ministry of Science
and Innovation (INIA, RTA2008-00056-C02-02)**



XXXIV WORLD CONGRESS
OF VINE AND WINE

"The Wine Construction"
20-27th June 2011 - Porto - Portugal



7.4. Publicaciones no indexadas

- 1) **García-Martínez, T.**, Peinado, R.A., Maestre, O., Moreno, J., Mauricio, J.C. (2008). Fermentación de mostos con elevado contenido en azúcares mediante bioinmovilización de levaduras. Bulletin de l'OIV. Vol. 81, nº 932-934, p. 559-568.
- 2) **García-Martínez, T.**, Puig, A., Mauricio, J.C. (2010). Levaduras bioinmovilizadas para su uso potencial en enología. *La Semana Vitivinícola*. 3.305:646-651.

