



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Diseño de consorcios de levaduras para mejorar la  
estabilidad y la bioactividad de los vinos: Interacciones  
microbianas, metabólicas y moleculares.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Enología

AUTOR/A: Pérez Piqueras, Cristina Inmaculada

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a externo: GUILLAMON NAVARRO, JOSE MANUEL

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Agroquímica  
y Tecnología de Alimentos



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

---

# **DISEÑO DE CONSORCIOS DE LEVADURAS PARA MEJORAR LA ESTABILIDAD Y LA BIOACTIVIDAD DE LOS VINOS: INTERACCIONES MICROBIANAS, METABÓLICAS Y MOLECULARES**

---

## **TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER EN ENOLOGÍA**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y  
DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)

ALUMNA: CRISTINA INMACULADA PÉREZ PIQUERAS

TUTOR IATA: JOSÉ MANUEL GUILLAMÓN NAVARRO

COTUTOR IATA: ANDRÉS PLANELLS CÁRCEL

TUTORA UPV: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

Curso académico 2021/2022

Valencia, julio de 2022

**TÍTULO:** Diseño de consorcios de levaduras para mejorar la estabilidad y la bioactividad de los vinos: Interacciones microbianas, metabólicas y moleculares.

**RESUMEN:**

La fermentación del vino es un proceso bioquímico complejo en el que la principal reacción es la transformación de azúcares presentes en el mosto en etanol y dióxido de carbono por acción de las levaduras. Sin embargo, los principales determinantes de la calidad y estabilidad del vino son compuestos derivados del metabolismo secundario como el glicerol, ácidos, compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ésteres y acetatos, etc., a pesar de su menor concentración.

En el caso del metabolismo del nitrógeno, este está relacionado con la síntesis de compuestos aromáticos y otros metabolitos con un gran potencial de bioactividad. Resulta de gran interés para la calidad, estabilidad y potencial bioactivo del producto final, ya que es el origen de los aromas fermentativos más importantes (alcoholes y ésteres superiores), antioxidantes (glutación e hidroxitirosol) y moléculas bioactivas como la melatonina. La melatonina presenta un gran potencial bioactivo que puede contribuir a la calidad y estabilidad de los vinos, además de que aporta múltiples beneficios para la salud. Esto supone una potencial mejora de la imagen del vino como producto con compuestos de interés para la salud de los consumidores, a pesar de que la presencia de etanol exige una recomendación de moderación en su consumo. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo es aumentar la presencia de los compuestos indólicos derivados del triptófano, en concreto de la melatonina, en los vinos finales.

Se ha visto que estos compuestos se sintetizan de forma diferencial por distintas cepas y especies de levaduras durante la fermentación del vino. En los últimos años se ha observado que es posible aumentar la concentración de múltiples compuestos de interés y mejorar las características organolépticas de los vinos finales empleando levaduras no convencionales e inoculando diferentes especies de levadura en la fermentación, que cooperan formando consorcios. Las levaduras no convencionales han mostrado poseer características que pueden resultar de interés en las fermentaciones a nivel industrial. Además, se ha visto que las cepas de levadura no convencionales aisladas ambientalmente tienen características únicas debido a la adaptación a esos ambientes, que supone el desarrollo de sistemas enzimáticos que las levaduras aisladas de ambientes enológicos no poseen, y por tanto nos pueden aportar características diferentes y muy interesantes en los vinos finales.

Es por esto que, para conseguir el objetivo principal del trabajo, se han seleccionado y estudiado dos consorcios de levaduras aisladas de ambientes y las fermentaciones que estos desarrollan, y se ha determinado que el consorcio formado por cepas de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* es capaz de producir una cantidad de melatonina superior, de  $24'87 \pm 2'19$  ng/mL, a la que producen cada una de las cepas por separado y a la que produce el otro consorcio, formado por *S. cerevisiae* y *S. uvarum*. Además, se han estudiado las interacciones microbianas, metabólicas y moleculares de los consorcios durante la fermentación alcohólica y se han visto diferencias significativas entre ellos, principalmente en los perfiles aromáticos que presentan, caracterizados por aromas florales, frutales y un cierto carácter alcohólico, pero que sería conveniente seguir estudiando.

**PALABRAS CLAVE:** Fermentación alcohólica, vino, melatonina, serotonina, levaduras, consorcio.

Alumna: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

Tutor IATA: José Manuel Guillamón Navarro

Cotutor IATA: Andrés Planells Cárce

Tutora UPV: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Curso académico: 2021/2022

Valencia, julio de 2022

**TITLE:** Design of yeast consortiums to improve the stability and bioactivity of wines: microbial, metabolic and molecular interactions.

**ABSTRACT:**

Wine fermentation is a complex biochemical process in which the main reaction is the transformation of sugars present in the must into ethanol and carbon dioxide by the action of yeasts. However, the main determinants of wine quality and stability are compounds derived from secondary metabolism such as glycerol, acids, aromatic compounds such as higher alcohols, esters and acetates, etc., despite their lower concentration.

In the case of nitrogen metabolism, it is related to the synthesis of aromatic compounds and other metabolites with a great potential for bioactivity. It is of great interest for the quality, stability and bioactive potential of the final product, since it is the source of the most important fermentative aromas (higher alcohols and esters), antioxidants (glutathione and hydroxytyrosol) and bioactive molecules such as melatonin. Melatonin has a great bioactive potential that can contribute to the quality and stability of wines, in addition to providing multiple health benefits. This represents a potential improvement in the image of wine as a product with compounds of interest to consumers' health, even though the presence of ethanol requires a recommendation of moderation in its consumption. Therefore, the main objective of this work is to increase the presence of indolic compounds derived from tryptophan, specifically melatonin, in the final wines.

It has been seen that these compounds are differentially synthesized by different strains and species of yeast during wine fermentation. In the last times, it has been observed that it is possible to increase the concentration of multiple compounds of interest and improve the organoleptic characteristics of the final wines using unconventional yeasts and inoculating different species of yeast in the fermentation, which cooperate by forming consortia. Unconventional yeasts have shown to have characteristics that are of interest in fermentations at an industrial level. In addition, it has been seen that environmentally isolated non-conventional yeast strains have unique characteristics due to adaptation to these environments, which involves the development of enzyme systems that yeasts isolated from oenological environments do not possess, and therefore they can provide us with different characteristics. and very interesting in the final wines.

This is why, in order to achieve the main objective of the work, two consortia of yeasts isolated from environments and the fermentations they develop have been selected and studied, and it has been determined that the consortium formed by strains of *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* is capable of producing a higher amount of melatonin,  $24.87 \pm 2.19$  ng/mL, than that produced by each of the strains separately and that produced by the other consortium, formed by *S. cerevisiae* and *S. uvarum*. In addition, the microbial, metabolic and molecular interactions of the consortia during alcoholic fermentation have been studied and significant differences have been seen between them, mainly in the aromatic profiles they present, characterized by floral, fruity aromas and a certain alcoholic character, but it would be good to continue studying it.

**KEY WORDS:** Alcoholic fermentation, wine, melatonin, serotonin, yeasts, consortium.

Student: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

IATA tutor: José Manuel Guillamón Navarro

IATA cotutor: Andrés Planells Cárceles

UPV tutor: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Academic year: 2021/2022

Valencia, July 2022

**TÍTOL:** Disseny de consorcis de llevats per a millorar l'estabilitat i la bioactivitat dels vins: Interaccions microbianes, metabòliques i moleculars.

**RESUM:**

La fermentació del vi és un procés bioquímic complex en el qual la principal reacció és la transformació de sucres presents en el most en etanol i diòxid de carboni per acció dels llevats. No obstant això, els principals determinants de la qualitat i estabilitat del vi són compostos derivats del metabolisme secundari com el glicerol, àcids, compostos aromàtics com a alcohols superiors, èsters i acetats, etc., malgrat la seua menor concentració.

En el cas del metabolisme del nitrogen, aquest està relacionat amb la síntesi de compostos aromàtics i altres metabòlits amb un gran potencial de bioactivitat. Resulta de gran interès per a la qualitat, estabilitat i potencial bioactiu del producte final, ja que és l'origen de les aromes fermentatives més importants (alcohols i èsters superiors), antioxidants (glutatió i hidroxitirosol) i molècules bioactives com la melatonina. La melatonina presenta un gran potencial bioactiu que pot contribuir a la qualitat i estabilitat dels vins, a més de que aporta múltiples beneficis per a la salut. Això suposa una potencial millora de la imatge del vi com a producte amb compostos d'interès per a la salut dels consumidors, a pesar que la presència d'etanol exigeix una recomanació de moderació en el seu consum. Per tant, l'objectiu principal d'aquest treball és augmentar la presència dels compostos indòlics derivats del triptòfan, en concret de la melatonina, en els vins finals.

S'ha vist que aquests compostos se sintetitzen de manera diferencial per diferents ceps i espècies de llevats durant la fermentació del vi. En els últims anys s'ha observat que és possible augmentar la concentració de múltiples compostos d'interès i millorar les característiques organolèptiques dels vins finals emprant llevats no convencionals i inoculant diferents espècies de llevat en la fermentació, que cooperen formant consorcis. Els llevats no convencionals han mostrat posseir característiques que poden resultar d'interès en les fermentacions a nivell industrial. A més, s'ha vist que els ceps de llevat no convencionals aïllades ambientalment tenen característiques úniques a causa de l'adaptació a aqueixos ambients, que suposa el desenvolupament de sistemes enzimàtics que els llevats aïllats d'ambients enològics no posseeixen, i per tant ens poden aportar característiques diferents i molt interessants en els vins finals.

És per això que, per a aconseguir l'objectiu principal del treball, s'han seleccionat i estudiat dos consorcis de llevats aïllats d'ambients i les fermentacions que aquests desenvolupen, i s'ha determinat que el consorci format per ceps de *S. cerevisiae* i *S. eubayanus* és capaç de produir una quantitat de melatonina superior, de  $24'87 \pm 2'19$  ng/ml, a la qual produeixen cadascuna dels ceps per separat i a la qual produeix l'altre consorci, format per *S. cerevisiae* i *S. uvarum*. A més, s'han estudiat les interaccions microbianes, metabòliques i moleculars dels consorcis durant la fermentació alcohòlica i s'han vist diferències significatives entre ells, principalment en els perfils aromàtics que presenten, caracteritzats per aromes florals, fruïteres i un cert caràcter alcohòlic, però que seria convenient continuar estudiant.

**PARAULES CLAU:** Fermentació alcohòlica, vi, melatonina, serotonina, llevats, consorci.

Alumna: Cristina Inmaculada Pérez Piqueras

Tutor IATA: José Manuel Guillamón Navarro

Cotutor IATA: Andrés Planells Cárcel

Tutora UPV: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Curs acadèmic: 2021/2022

València, juliol de 2022

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	1
1.2. METABOLISMO DEL NITRÓGENO .....	1
1.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN EL VINO: MELATONINA .....	2
1.4. GÉNERO <i>SACCHAROMYCES</i> .....	4
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS.....	10
3.2. LISTADO DE CEPAS DEL SCREENING .....	10
3.3. ENSAYO DE <i>SCREENING</i> .....	10
3.4. ANÁLISIS DE MELATONINA MEDIANTE UHPLC-FLUORESCENCIA.....	10
3.5. ANÁLISIS DE AZÚCARES Y ÁCIDOS POR UHPLC-IR .....	11
3.6. FERMENTACIONES MIXTAS.....	11
3.7. ANÁLISIS DE LA IMPLANTACIÓN DE LAS CEPAS DE LEVADURA .....	12
3.8. ANÁLISIS DEL PERFIL AROMÁTICO MEDIANTE GC.....	14
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1. SCREENING DE CEPAS EN FUNCIÓN DE SU PRODUCCIÓN DE MELATONINA .....	15
4.2. DISEÑO DE CONSORCIOS.....	19
4.3. INTERACCIONES METABÓLICAS: PRODUCCIÓN DE MELATONINA (UHPLC-FLUORESCENCIA).....	27
4.4. INTERACCIONES MOLECULARES: PERFIL AROMÁTICO (GC).....	29
5. DISCUSIÓN .....	32
5.1. <i>SCREENING</i> .....	32
5.2. INTERACCIONES MICROBIANAS.....	33
5.3. INTERACCIONES METABÓLICAS Y MOLECULARES .....	35
5.4. FUTUROS ENFOQUES .....	37
6. CONCLUSIONES .....	38

## BIBLIOGRAFÍA

ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

ANEXO II. LISTADO DE CEPAS EMPLEADAS EN EL SCREENING

## 1. Introducción

### 1.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico que realizan algunos microorganismos, como las levaduras. En este, las levaduras procesan hidratos de carbono (azúcares, principalmente glucosa y fructosa) y obtienen como productos finales alcohol en forma de etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas y energía en forma de ATP, que consumen los propios microorganismos en su metabolismo.

Este proceso tiene lugar en tres etapas. En primer lugar, se produce la glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnes), en la cual una hexosa como la glucosa o la fructosa se transforma en dos moléculas de piruvato y dos moléculas de  $\text{NAD}^+$  se reducen a  $2\text{NADH} + 2\text{H}^+$ . Posteriormente, el piruvato se descarboxila mediante la acción de la enzima piruvato descarboxilasa, produciendo acetaldehído y liberando  $\text{CO}_2$ . Por último, las moléculas de  $\text{NADH}$  se vuelven a oxidar a  $\text{NAD}^+$  por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, produciendo etanol a partir del acetaldehído (Walker et al., 2016; Zamora, 2009; Sawers and Clark, 2004). Un resumen muy simplificado de este proceso bioquímico se muestra a continuación:



La fermentación alcohólica se trata de una reacción exotérmica y, además, produce una gran cantidad de etanol y  $\text{CO}_2$  (estequiométricamente se producen dos moles de  $\text{CO}_2$  y dos de etanol por cada mol de glucosa). No obstante, aunque en menor medida, también se producen una serie de compuestos secundarios muy importantes (Fleet, 1993), como los compuestos aromáticos (volátiles), alcoholes superiores, compuestos fenólicos, etc., que son esenciales en el aporte de las características organolépticas de los vinos, así como otros compuestos no organolépticos que resultan interesantes para la salud de los consumidores: antioxidantes como el resveratrol o el hidroxitirosol, hormonas como la melatonina y la serotonina, etc. Todos estos compuestos son importantes en la regulación del perfil sensorial y la calidad del vino.

El proceso de la fermentación se considera casi tan antiguo como la civilización. Las primeras evidencias de producción de bebidas fermentadas datan de los años 7000-3000 a.C., pero no fue hasta el siglo XVII que Antoine van Leeuwenhoek observó por primera vez las levaduras y hasta el siglo XIX que se asociaron las levaduras con la fermentación y empezaron a realizarse estudios sobre este proceso y las primeras publicaciones, como los "*Études sur la Bière*" de Louis Pasteur. Con el paso del tiempo, las técnicas de producción de bebidas fermentadas han ido evolucionando y modernizándose, dando lugar a una gran gama de productos diferentes. En el caso del vino, esta evolución se ha basado principalmente en aumentar la producción de estos compuestos secundarios con el objetivo de mejorar la calidad y las características organolépticas de estos, además de obtener productos diferenciados que aporten distintas propiedades y mejorar la imagen del producto desde el punto de vista de los consumidores.

### 1.2. Metabolismo del nitrógeno

Para la producción de estos compuestos secundarios de interés no solo es importante el proceso de fermentación, sino también el metabolismo del nitrógeno. El nitrógeno es un nutriente clave

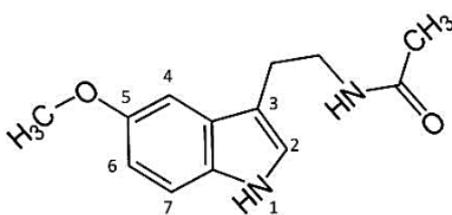
para las levaduras, ya que su limitación supone una disminución del crecimiento y del metabolismo de estas y una ralentización de la fermentación, pudiendo provocar paradas fermentativas (Gutiérrez Linares, 2013). También interviene en la síntesis de proteínas, aminoácidos y nucleótidos, en el transporte de azúcares y en la producción de etanol y de compuestos aromáticos de tipo éster (Díaz-Gálvez y Gutiérrez Gamboa, 2020), así como en la producción de compuestos responsables del *flavor* como el glicerol, ácido acético, ácido succínico, ácidos grasos volátiles y carbonilos (Albers et al., 1996). Pese a su importancia, no todo el nitrógeno que se encuentra en el mosto es asimilable por las levaduras. Las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable (YAN) son principalmente amonio, pequeños péptidos y aminoácidos (Gobert et al., 2019), entre los que destacamos los aminoácidos aromáticos (AAA): tirosina, L-triptófano y fenilalanina.

Los aminoácidos aromáticos mencionados son de gran relevancia, ya que los alcoholes superiores se generan, además de a partir de aminoácidos ramificados como la leucina, la isoleucina y la valina, a partir de ellos por la vía de Ehrlich, aportando así cualidades aromáticas al vino (Loviso y Libkind, 2019). Asimismo, se ha observado que a partir de este metabolismo se producen moléculas bioactivas que suscitan un gran interés desde el punto de vista de la regulación de las levaduras y de la salud de los consumidores, como la melatonina y la serotonina, compuestos derivados del L-triptófano (Mas et al., 2014).

### 1.3. Compuestos bioactivos presentes en el vino: melatonina

#### *Efectos beneficiosos de los compuestos bioactivos presentes en el vino*

Se ha observado que en el vino se encuentran numerosos compuestos bioactivos, como el resveratrol y el hidroxitirosol, que son polifenoles (antioxidantes), y la melatonina, que se trata de una indolamina. A los tres se les atribuye una gran bioactividad y biodisponibilidad, y entre sus beneficios se encuentran la actividad antioxidante, cardioprotectora, anticancerígena, antidiabética, neuroprotectora y antienvjecimiento (Fernández-Mar et al., 2012).



**Figura 1.** Estructura química de la melatonina

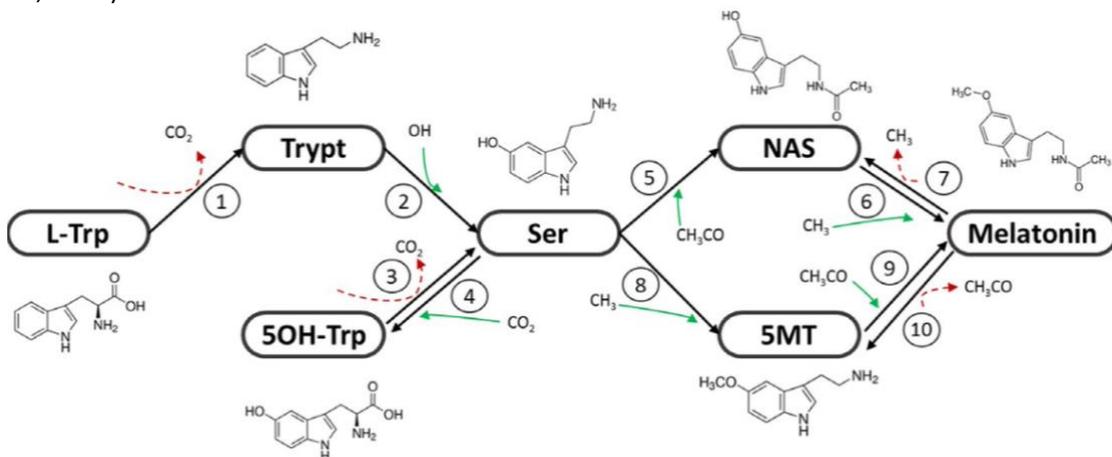
De todos ellos destacamos la melatonina (Figura 1). Esta indolamina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es sintetizada a partir del triptófano. En los animales se trata de una neurohormona generada naturalmente en la glándula pineal, pero también se ha observado en vegetales y frutas presentes en la dieta y en productos fermentados como el vino (Iriti et al., 2010; Rodríguez-Naranjo et al., 2011a, 2011b). La melatonina es un potente antioxidante, ya que elimina los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno y estimula las enzimas antioxidantes (Reiter et al., 2003, 2005). Además de tener un efecto modulador del sueño, se ha demostrado su capacidad de reducir el estrés oxidativo crónico relacionado con el

envejecimiento en ratones (Nogués et al., 2006), se ha visto que tiene un gran papel en la prevención de la apoptosis celular (Sainz et al., 2003) y la carcinogénesis (Karbownik et al., 2001), además de inhibir la proliferación de células tumorales y reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (Srinivasan et al., 2005), así como inmunológicas (Guerrero y Reiter, 2002).

En el vino encontramos melatonina debido a que, además de que se encuentra en origen en las uvas y otros tejidos de la vid, la mayoría proviene del metabolismo de las levaduras durante la fermentación (Rodríguez-Naranjo et al., 2012). Se ha visto que, dada su gran capacidad antioxidante, esta tiene un papel protector ante los diferentes estreses que sufren las levaduras durante la fermentación, principalmente la creciente concentración de etanol. Cuando la síntesis de melatonina es elevada o se suplementa el medio con melatonina, mejora el crecimiento celular y disminuye la peroxidación lipídica y las especies reactivas del oxígeno, y por tanto el daño oxidativo (Vázquez et al., 2017; Sunyer-Figueres et al., 2021). Asimismo, se ha observado un rol protector ante la radiación UV (Valera, 2021; Bisquert et al., 2018).

### Síntesis de melatonina en el vino

Se ha observado que las levaduras sintetizan melatonina durante la fermentación alcohólica y que esta síntesis depende principalmente del medio (en especial de la concentración de azúcares y L-triptófano) y de la fase del crecimiento en la que estas se encuentren. La ruta de síntesis de este metabolito es muy conocida en animales y plantas, pero no fue hasta 2019 que Muñiz-Calvo y cols. revelaron la ruta biosintética en *Saccharomyces cerevisiae* (Muñiz-Calvo et al., 2019).



**Figura 2.** Ruta biosintética de la melatonina en *S. cerevisiae*. FUENTE: MUÑIZ-CALVO ET AL. (2019)

En este estudio (Figura 2) se observó que, a diferencia de la ruta observada en otros organismos, el L-triptófano se descarboxila en triptamina (1-descarboxilación), que posteriormente se transforma en serotonina por hidroxilación (2-hidroxilación de la triptamina). Desde la serotonina se produce NAS (N-acetilserotonina) por N-acetilación (5-N-acetilación de la serotonina) y 5MT (5-metoxitriptamina) por O-metilación (6-O-metilación de la serotonina), ambas reversibles (7-N-acetilserotonina O-demetilación y 10-desacetilación de la melatonina). De estos últimos, el principal sustrato a partir del cual se produce melatonina es el 5MT.

Anteriormente, se creía que la principal levadura productora de melatonina era *Saccharomyces cerevisiae*, pero se ha comprobado que diferentes cepas de levadura son capaces de sintetizar diferentes compuestos indólicos, entre ellos la melatonina (Jiao et al., 2022; Morcillo-Parra et

al., 2020; Fernández-Cruz et al., 2019; Rodríguez-Naranjo et al., 2012). Esta síntesis depende de la cepa o especie de la levadura y del estado metabólico de la célula, además de la cantidad de triptófano y azúcares en el medio, pero la posibilidad de poder emplear diferentes cepas de levadura para la producción de compuestos bioactivos en vinos es un hallazgo con un gran potencial a la hora de investigar distintos consorcios de cepas de levaduras que nos permitan aumentar este compuesto en los vinos finales. Es por esto que en este trabajo se propone el estudio de consorcios de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y no *cerevisiae* para comprobar si con estas fermentaciones mixtas es posible aumentar los niveles de melatonina en los vinos finales.

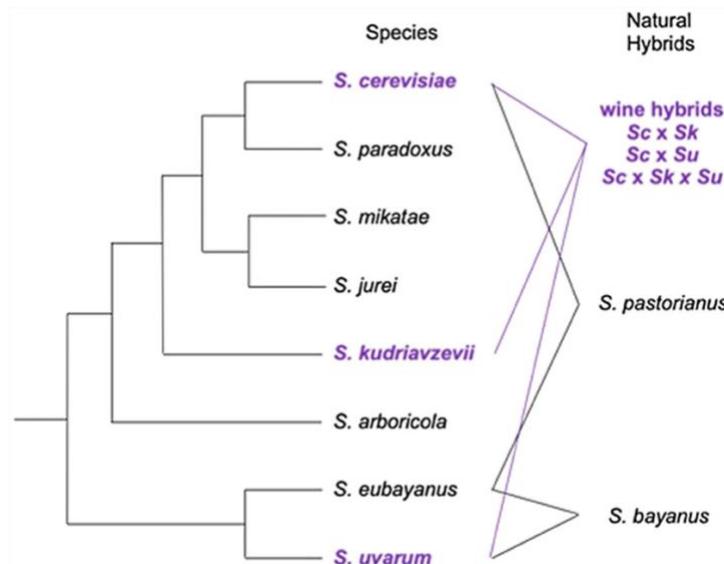
#### 1.4. Género *Saccharomyces*

El género *Saccharomyces* pertenece al reino Fungi, división *Ascomycota*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales* y familia *Saccharomycetaceae* (Bennett y Turgeon, 2016). Este está muy relacionado con las actividades humanas, ya que se utiliza en muchas ocasiones en la producción de alimentos y bebidas.

Durante muchos años se creía que las diferentes especies de levadura tienen adaptaciones específicas que les permite habitar nichos ecológicos concretos, pero en los últimos años se ha visto que *Saccharomyces* se trata de un género de levadura nómada (Goddard y Greig, 2015). Es decir, no se ha determinado ningún hábitat o nicho concreto en el que esté adaptada, sino que se ha observado que es capaz de adaptarse a muchos entornos distintos. Se han aislado de muchos ambientes y sustratos diferentes, también de entornos no enológicos, por ejemplo, la corteza de árboles como el roble, la haya, el abedul o el nogal, el suelo, los exudados de los árboles (savia), bellotas, hojas, frutas e insectos (Knight y Goddard, 2015; Boynton y Greig, 2014; Hittinger, 2013; Goddard et al., 2010; Simpaio et al., 2008; Reuter et al., 2007).

Etimológicamente, *Saccharomyces* es una palabra que proviene del griego σάκχαρον (azúcar), que pasó al latín *saccharon*, y μύκης (*mykes*, que significa hongo), “el hongo del azúcar” (Mortimer 2000), ya que muestra una gran capacidad de fermentación de azúcares y producción de alcohol en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (García-Ríos y Guillamón, 2019; Dashko et al., 2014).

Todas las levaduras de este género tienen una morfología elipsoide típica del proceso de gemación y poseen 16 cromosomas. Es posible diferenciarlas entre ellas y compararlas, estableciendo relaciones filogenéticas, por las secuencias de su espaciador transcrito interno (ITS) y los dominios D1/D2 ubicados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 2003) y del gen 18S (Guillamón y Barrio, 2017; James et al., 1997). Las especies que comprenden este género se han modificado varias veces mediante hibridación interespecífica. Este proceso es muy importante y común en este género, ya que les permite diversificarse y adaptarse a nuevos nichos y a situaciones que conllevan diferentes estreses (Salvadó et al., 2011b). Actualmente, según los últimos estudios publicados, el género *Saccharomyces* incluye ocho especies: *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. arboricolus* y *S. jurei* (Muñiz-Calvo, 2021; Alsammar y Delneri, 2020; Naseeb et al., 2017; Borneman y Pretorius, 2015) (Figura 3). Podrían existir más especies dentro del género, pero todavía no se han aislado e identificado.



**Figura 3.** Cladograma esquemático de la relación filogenética de las diferentes especies de *Saccharomyces*, sus híbridos reconocidos y los híbridos que pueden aislarse de ambientes enológicos. FUENTE: VIGENTINI ET AL. (2019)

A pesar de que la divergencia de secuencias de nucleótidos entre especies es muy alta, la falta de barreras precigóticas permite que diferentes especies de *Saccharomyces* se apareen y formen organismos diploides viables (Origone et al., 2018; Morales y Dujon, 2012; Maclean y Greig, 2008; Liti et al., 2006). El límite entre estas especies es difuso, se han aislado numerosos híbridos formados de forma independiente a partir de fermentaciones industriales. Se han aislado híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* de vino, cerveza y sidra (Peris et al., 2018, 2016; González et al., 2008, 2007; Lopandic et al., 2007) e híbridos de *S. cerevisiae* y *S. uvarum* de vino (Pérez-Torrado et al., 2018; Peris et al., 2018; González et al., 2006). El híbrido natural más conocido es *S. pastorianus*, que proviene de *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* y se emplea en gran medida en la industria cervecera, ya que es la levadura responsable de la fermentación de la cerveza lager (Boynton, 2014).

### ***Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae*, es un hongo unicelular anaerobio facultativo que pertenece al grupo de los ascomicetos (*phylum Ascomycota*) (Bennett y Turgeon, 2016). De forma más o menos elipsoide, presenta un núcleo diferenciado, tratándose por tanto de un organismo eucariota. Históricamente ha tenido una gran relevancia, ya que se trata de la levadura que se emplea desde la antigüedad para fermentar el pan, el vino y la cerveza. Además, también es de gran importancia desde el punto de vista de la investigación, ya que se trata de un organismo modelo muy empleado para estudiar los procesos que ocurren en organismos eucariotas más complejos (Karathia et al., 2011). En 1996 se obtuvo la secuencia completa de su genoma, concretamente de la cepa de laboratorio S288C, gracias a un proyecto liderado por la Unión Europea en el cual participaron más de cien laboratorios de todo el mundo (Goffeau et al., 1996). Actualmente, es el genoma eucariota más conocido tanto a nivel estructural como funcional. Contiene aproximadamente 6000 genes codificados en 12 millones de pares de bases y se conoce la función de una gran mayoría de ellos.

Durante mucho tiempo, y también actualmente, es la levadura que más se emplea en la fermentación de los vinos. El motivo principal es que es capaz de resistir en gran medida los estreses que se producen en la fermentación (anaerobiosis, agotamiento de los nutrientes, altas concentraciones de ácido y etanol, variaciones en la temperatura, etc.) y, por tanto, se impone a las demás cepas de levadura que están presentes en el mosto. Se trata de la levadura mejor adaptada a temperaturas altas dentro de su género (su temperatura óptima de crecimiento es la más alta, 32'3°C) y la que mayor resistencia al etanol presenta (Querol et al., 2018). Además, es capaz de finalizar la fermentación por sí misma, no dejando prácticamente azúcares residuales en el vino (Pretorius, 2020; Salvadó et al., 2011a; Xufre et al., 2006). Por otra parte, se ha observado que produce niveles importantes de diferentes metabolitos que proporcionan características sensoriales complejas a los vinos (es la principal productora de alcoholes, ésteres y aldehídos), aportando así una gran parte del *bouquet* del vino final (Parapouli et al., 2020).

No obstante, a pesar de que *S. cerevisiae* es la levadura más empleada en las fermentaciones, se ha observado que llevando a cabo fermentaciones mixtas de esta levadura con otras es posible mejorar la calidad y las características organolépticas de los vinos resultantes (Walter et al., 2016) e incluso conseguir otros objetivos demandados por algunos sectores de los consumidores, por ejemplo, reducir de forma natural la cantidad de alcohol presente en el vino (Parapouli et al., 2020). En este trabajo, para conseguir el objetivo deseado y a causa del *screening* realizado, además de una cepa *S. cerevisiae* se han seleccionado dos especies del género *Saccharomyces* diferentes: *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces eubayanus*.

### ***Saccharomyces uvarum***

La clasificación de *S. uvarum* ha generado mucha problemática durante años, ya que al principio se creía que era una variedad de *S. bayanus* (*S. bayanus* var. *uvarum*). No obstante, ahora sabemos que es una cepa de linaje puro y se reconoce como una especie distinta, en lugar de una variedad de otra (Alsammar y Delneri, 2020; Pulvirenti et al., 2000; Rainieri et al., 1999). Esta especie ocupa un lugar muy importante dentro del género *Saccharomyces*. Es la especie hermana de *S. eubayanus*, y *S. bayanus* se trata de un híbrido entre ambas (*S. uvarum* x *S. eubayanus*) (Almeida et al., 2014; Boynton y Greig, 2014; Pérez-Través et al., 2014; Peris Navarro et al., 2014).

*S. uvarum* es una especie de levadura criotolerante. Esta se ha aislado principalmente en ambientes industriales, como procesos de fermentación de vino y sidra a bajas temperaturas. No obstante, también ha sido aislada de corteza de madera dura, suelo e insectos, y en ocasiones coexiste con *S. bayanus*. Se ha visto que esta especie está relacionada con entornos salvajes y domesticados en América del Norte y del Sur, Eurasia y Australasia y que está ampliamente asociada con *Nothofagus spp.* y otros *Fagales spp.* (Alsammar y Delneri, 2020).

Los vinos típicamente fermentados por *S. uvarum* son Tokaj (Hungría y Eslovaquia) (Naumov et al., 2002; Sipiczki et al., 2001), Amarone (Italia) (Torriani et al., 1999), Txakolí (País Vasco, España) (Rementeria et al., 2003) y los de las regiones francesas de Sauternes, Borgoña, Champaña, Val del Loire y Alsacia (Flores et al., 2017; Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2000).

Si la comparamos con *S. cerevisiae*, podemos observar que produce más glicerol y menos etanol (Querol et al., 2018). Además, presenta una mayor capacidad para sintetizar compuestos del aroma positivos, como el 2-feniletanol (caracterizado con el descriptor "rosas"), el acetato de 2-feniletilo (caracterizado con los descriptores "floral", "rosas", "miel" y "dulce") y el butanoato de 2-metilo (caracterizado con el descriptor "frutal") (Morgan et al., 2020; Stribny et al., 2015;

Masneuf-Pomarède, 2010). Esta levadura sobresale en la producción de ésteres de acetato y los vinos producidos presentan una intensidad aromática superior a los producidos por *S. cerevisiae*. Por tanto, esta especie y sus híbridos tienen buenas capacidades fermentativas a baja temperatura y producen vinos con menor alcohol y mayores cantidades de glicerol, además de una mayor intensidad aromática y producción de compuestos del aroma muy interesantes (Oliveira et al., 2014; Gamero et al., 2013). Esto hace a *S. uvarum* una buena candidata para formar parte de los consorcios que queremos estudiar, ya que cumple requisitos necesarios para las fermentaciones y además aporta características beneficiosas y diferentes a las que aporta *S. cerevisiae*.

### ***Saccharomyces eubayanus***

*Saccharomyces eubayanus* es una de las últimas especies que se incluyeron en el género *Saccharomyces*. Se aisló e identificó por primera vez por Libkind et al. (2011), a partir de corteza de *Nothofagus* (haya del sur), del suelo de debajo de estos árboles y de estromas de *Cyttaria hariatii* (un parásito ascomiceto obligado de *Nothofagus*). Se observó que coexistían con *S. uvarum* en los bosques de *Nothofagus spp.*, que ocupan el nicho de los robles en las regiones templadas del hemisferio sur, en el Noroeste de la Patagonia (Libkind et al., 2011). Su descubrimiento fue muy importante, ya que supuso determinar el progenitor criotolerante no *cerevisiae* de la especie *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*), que hasta ese momento se desconocía (Boynton y Greig, 2014). Posteriormente, se han aislado también en América del Norte (Peris Navarro et al., 2014), China (Bing et al., 2014), Patagonia (Rodríguez et al., 2014) y Nueva Zelanda (Gayeveskiy y Godard, 2016). Hasta ahora, solo se ha asociado a ambientes naturales (Eizaguirre et al., 2018).

*S. eubayanus* se trata de una especie criotolerante. Esto es notorio ya que los sitios en los que se ha aislado generalmente se encuentran en zonas de gran altura y bajas temperaturas. Se adapta mejor a temperaturas de crecimiento entre 8°C y 15°C y la temperatura máxima a la que pueden crecer se encuentra en torno a los 33-35°C (frente a las temperaturas máximas de crecimiento de *S. cerevisiae*, que son de 41-42°C). Dado que es una de las levaduras más recientemente aislada, no se conocen tan bien sus características fermentativas. No obstante, al compararla con *S. pastorianus* en el ámbito de la fermentación de la cerveza, se observa que *S. eubayanus* es más resistente a temperaturas más frías (10°C) y no es capaz de fermentar la maltotriosa, uno de los principales azúcares del mosto de cerveza (Sampaio, 2018).

Desde el punto de vista de la vinificación, se ha observado que *S. eubayanus* muestra una alta producción de compuestos aromáticos como el acetato de 2-feniletilo y 2-feniletanol (*caracterizados con los descriptores "floral" y "rosas"*). En el caso del último de ellos, se ha visto que tanto *S. eubayanus* como *S. uvarum* son capaces de producirlo a una concentración que llega a doblar la que produce *S. cerevisiae* (Flores et al., 2017). Asimismo, se ha observado que en fermentaciones a baja temperatura esta especie produce una alta concentración de compuestos volátiles relacionados con notas florales y de fruta blanca y los vinos resultantes, de bajo pH y color claro, mostraron buenas características químicas y sensoriales, tanto que se cree que esta especie podría ser una muy buena opción a la hora de elaborar vinos base para vinos espumosos (Parpinello et al., 2020).

Si nos centramos en la producción de glicerol, se han descrito diferencias significativas interespecíficas, produciendo algunas cepas una gran cantidad de glicerol, superior a otras cepas de la misma especie y también a *S. cerevisiae*, lo que las hace enológicamente muy interesantes. Esta producción de glicerol superior, que en este caso no conlleva una disminución de la

producción de etanol, se explica con la disminución de la síntesis de ácido acético, disminuyendo así la acidez volátil de los vinos finales (Flores et al., 2017).

Por otro lado, se ha estudiado la tolerancia a diferentes tipos de estrés por parte de *S. eubayanus* y se ha visto que, si se le somete a una combinación de diferentes condiciones estresantes como temperatura, pH, azúcar y concentración de  $\text{SO}_2$ , esta cepa es menos resistente que *S. uvarum*. No obstante, *S. eubayanus* presenta un mejor rendimiento con concentraciones de etanol por debajo del 8% v/v (Origone et al., 2017). A concentraciones más altas se inhibe su crecimiento, pero es posible emplearlas en las primeras etapas de la vinificación. Además, se ha observado que las especies de *Saccharomyces* criotolerantes, particularmente *S. eubayanus*, pueden utilizarse con buenos resultados en fermentaciones de mosto de uva natural con limitaciones de nitrógeno, evitando así las paradas fermentativas en estos casos (Su et al., 2019). Por todo esto, es una especie de levadura que, a pesar de no poder finalizar las fermentaciones por sí misma, puede aportar una gran cantidad de características positivas a los vinos finales.

## 2. Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo global del trabajo es diseñar un consorcio de levaduras que permita aumentar la cantidad de melatonina en los vinos finales y así mejorar la estabilidad y la bioactividad de estos. Para alcanzar este objetivo principal, se plantean tres objetivos específicos:

1. Estudiar la producción de melatonina de diferentes cepas de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, no *cerevisiae* y no *Saccharomyces*.
2. Diseñar un consorcio de cepas que permita aumentar la síntesis de este compuesto en la fermentación.
3. Estudiar las interacciones microbianas, metabólicas y moleculares de este consorcio durante la fermentación alcohólica.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Preparación de medios

Todos los medios empleados en el trabajo se describen en el Anexo I.

#### 3.2. Listado de cepas del screening

De la colección de levaduras de la que se disponía, se hizo una selección de las cepas que se emplearían en el *screening*. Esta se muestra en el Anexo II.

#### 3.3. Ensayo de *screening*

Para hacer el *screening* se llevaron a cabo fermentaciones a pequeña escala en YNB, MS300 y MS5X en placas de 24 pocillos (Greiner CELLSTAR®, Greiner Bio-One). En cada uno de ellos se introdujo 1'5 mL de medio y se inoculó un volumen de 50 µL del precultivo de la cepa de levadura, que había estado creciendo *overnight*, para obtener una OD<sub>600nm</sub> de 0'2 (aprox. 2·10<sup>6</sup> células/mL) en cada pocillo. Cada cepa se inoculó por triplicado. Tras la inoculación, se cerraron las placas con Parafilm (*Thermo Fisher Scientific*) para evitar la evaporación del contenido y se incubaron a una temperatura de 28°C con una ligera agitación en un agitador orbital a 150 rpm durante 120 horas. Tras el tiempo determinado, se detuvo la incubación de las placas y se midió la OD<sub>600nm</sub> de cada una de ellas. Su contenido se extrajo y se centrifugó a 7500 *g* durante 10 min a 4°C. Seguidamente, se separó el sobrenadante del precipitado o *pellet* y se guardó en el congelador.

#### 3.4. Análisis de melatonina mediante UHPLC-Fluorescencia

Para el análisis mediante UHPLC acoplado a detector de fluorescencia, el sobrenadante guardado en el congelador se mezcló con metanol en una proporción 50:50 y se filtró empleando filtros de jeringa de nylon de 0'22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo empleando una columna Accucore™ C18 (4'6 x 150mm, 2'6 µm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con fases móviles A (0'1% de ácido fórmico en agua) y B (0'1% de ácido fórmico en acetonitrilo). El caudal fue de 0'8 mL min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección 20 µL. El gradiente del programa fue el siguiente: 0-2 min, 80% A, 20% B; 2-7 min gradiente desde 20% a 44% de B; 7-11min, 10% A, 90%B; 11-17 min, 80% A, 20% B. La temperatura de la columna se fijó a 30°C y las muestras se mantuvieron a 10°C. Las longitudes de onda de excitación y emisión son 286 nm y 350 nm, respectivamente. Se empleó un detector de fluorescencia equipado con un núcleo Acquity ARC (Waters, Milford, MA, USA) (Waters 2575 Fluorescence), una bomba cuaternaria, un muestreador automático y un desgasificador.

La identificación de la melatonina se basó en su tiempo de retención, determinado por la inyección de patrones de referencia de forma individual. Las curvas de calibración de cada analito, es decir, el área del pico frente a la concentración, fueron lineales y los datos se ajustaron mediante el método de mínimos cuadrados. La linealidad se evaluó mediante el ajuste

de mínimos cuadrados de las curvas de calibración independientes de seis puntos. El tiempo de retención para la melatonina fue de 6'12 min.

### 3.5. Análisis de azúcares y ácidos por UHPLC-IR

Cuando las fermentaciones finalizaron se analizó su contenido en glucosa, fructosa, glicerol y etanol. Para ello, las muestras se centrifugaron a 9000 g durante 5 min, se separó el sobrenadante del precipitado o *pellet* y se diluyó 2 veces con H<sub>2</sub>O mQ estéril. Por último, el sobrenadante diluido se filtró a través de filtros de nylon de 0'22 µm de tamaño de poro (Micron Analítica, España).

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo Surveyor Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipado con un detector de índice de refracción, un muestreador automático y un detector UV-visible. Se inyectó un volumen total de 25 µL en una columna HyperREZ XP Carbohydrate H+8 µm (Thermo Fisher Scientific). La fase móvil empleada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1'5 mM con un flujo de 0'6 mL min<sup>-1</sup> y una temperatura de columna de 50°C. La concentración de cada analito se calculó usando estándares externos y cada muestra se analizó por triplicado.

### 3.6. Fermentaciones mixtas

Las fermentaciones mixtas se desarrollaron en botellas de cristal de 100 mL de capacidad con un volumen final de Mosto Sintético (MS300) de 80 mL y una agitación sobre un agitador orbital a 150 rpm.

Para controlar el desarrollo de las fermentaciones, diariamente se extrajo 1 mL de muestra para medir la densidad empleando un densitómetro Densito 30PX y la OD<sub>600nm</sub> con un espectrofotómetro UVmini-1240. Asimismo, para llevar a cabo los diferentes ensayos sobre las fermentaciones, se sacaron 2 ml de muestra a tres tiempos diferentes: al inicio de la fermentación (IF), 24 h después de la inoculación, en la mitad de la fermentación (MF), cuando los valores de densidad se encuentran entre 1040-1050 kg/m<sup>3</sup>, y en el final de la fermentación (FF), cuando el valor de la densidad es igual o inferior a 998 kg/m<sup>3</sup>. En estos tres tiempos se midió la cantidad de melatonina y azúcares por HPLC, además de realizar recuento en placa de agar YPD, estudiar la implantación y analizar el perfil aromático mediante GC.

#### 3.6.1. Coinoculaciones

Se realizaron dos ensayos de coinoculación. En ambos, a partir de precultivos individuales de las levaduras en YPD, se inoculó 1 mL de cada cultivo para obtener una OD<sub>600nm</sub> final de 0'1 de cada una, que equivale a 10<sup>6</sup> células/mL. Se tomó una muestra inicial para medir su densidad y se incubaron las fermentaciones en el primer ensayo a 28°C y en el segundo ensayo a 20°C.

#### 3.6.2. Inoculaciones secuenciales

Se realizaron dos ensayos de inoculación secuencial. En ambos, a partir de precultivos individuales de las levaduras en YPD, se inoculó 2 mL de cada cultivo para obtener una OD<sub>600nm</sub> final de 0'1 de cada una, que equivale a 10<sup>6</sup> células/mL. En el primer ensayo, se inoculó la segunda cepa de levadura tras 48h de la primera inoculación, y en el segundo ensayo se inoculó

a las 24h. Se tomó una muestra inicial para medir su densidad y se incubaron las fermentaciones a 20°C.

### 3.7. Análisis de la implantación de las cepas de levadura

#### 3.7.1. Muestreo y aislamiento de colonias

De cada una de las réplicas de las fermentaciones se realizaron siembras sobre placas de YPD con el fin de realizar un recuento en placa. A partir de las placas del recuento que correspondían a las fermentaciones mixtas, se seleccionaron entre 6 y 8 colonias aisladas por réplica y se sembraron de nuevo en una placa de YPD 24h antes de llevar a cabo la extracción de DNA.

#### 3.7.2. Extracción de DNA

Se prepararon tubos Eppendorf de 1'5 mL con 100 µL de acetato de litio (LiAc) 200 mM 1% SDS, en los cuales se añade con un asa de siembra un poco de colonia fresca de levadura. Seguidamente, se agitan mediante vortex y se incuban 15 min a 70°C. Tras la incubación, se añaden 300 µL de etanol al 100% frío, se agita mediante vortex para resuspender y se centrifugan a 16'2 g durante 5 min. Se separa el sobrenadante del precipitado o *pellet* y sobre el *pellet* se añaden 300µL de etanol al 70% frío y se agita mediante vortex. De nuevo se centrifugan a 16'2 g durante 5 min, se elimina el sobrenadante al máximo y se secan por vacío. Por último, se añaden 125 µL de H<sub>2</sub>O mQ estéril para resuspender el *pellet*.

#### 3.7.3. Amplificación del DNA ribosomal

Tras la extracción de DNA, se realiza una amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante una PCR con los *primers* ITS1 e ITS4.

*ITS 1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)*

*ITS 4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)*

H <sub>2</sub> O mQ estéril	30,5 µl
Buffer Taq 10x (sin MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTPs	4 µl
Primer ITS 1 [50 µM]	1 µl
Primer ITS 4 [50 µM]	1 µl
Taq pol (BioTAQ-Bioline, Ecogen)	0,5 µl
DNA (400 ng)	5 µl
	Vt: 50 µl

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (*Applied Biosystems SimpliAmp*) siguiendo el siguiente programa: i) un ciclo inicial a 95°C durante 2 minutos, ii) 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55'5°C y 2 minutos a 72°C y iii) un ciclo final de 10 minutos a 72°C. El tamaño del amplicón en el caso de que la cepa sea del género *Saccharomyces* es de un tamaño aproximado de 880 pb.

### 3.7.4. Digestión de los productos de PCR

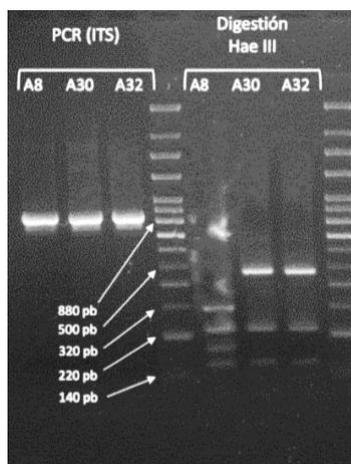
El amplicón resultante de la reacción de PCR es digerido con la enzima de restricción *HaeIII*, que nos permite diferenciar entre las especies de levadura inoculadas. La digestión se llevó a cabo según las siguientes indicaciones y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

H <sub>2</sub> O mQ estéril	7µl
Fast Digest Green Buffer (10X)	2 µl
HaeIII (Fast Digest)	1 µl
DNA (Amplificado con PCR ITS)	10 µl
	Vt = 20 µL

### 3.7.5. Electroforesis

Tras la digestión, se cargó todo el volumen de esta (20 µL) en un gel de agarosa 1,5% (1'20g de agarosa en 80 mL de tampón TAE 1X), junto con un marcador de 100 pares de bases (100pb Thermo Scientific O'GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Ready to use 0.1µg/µl, 50µg). El gel se conecta a una fuente de alimentación para electroforesis con un voltaje de 90V durante 2 horas y se revela empleando un transiluminador UV.

### 3.7.6. Identificación de las especies de levadura



**Figura 4. Patrón de PCR y de restricción con la enzima *HaeIII* de las diferentes cepas de levadura.** Con el resultado de la PCR no es posible diferenciar las especies, mientras que mediante la digestión con *HaeIII* sí se observan diferencias entre la especie *S. cerevisiae* y las especies no *cerevisiae*.

Las especies de levadura se diferenciaron mediante la digestión con la enzima de restricción *HaeIII*, que permite diferenciar entre la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (A8) y las cepas *Saccharomyces no cerevisiae* (A30 y A32). Como vemos en la figura, en la cepa A8 se aprecian 4 bandas (320 pb, 230 pb, 180 pb y 150 pb aproximadamente), mientras que en las cepas A30 y A32 se pueden ver 3 bandas (500 pb, 220 pb y 145 pb aproximadamente). Dado que las fermentaciones son mixtas y siempre están presentes la *Saccharomyces cerevisiae* junto con una de las *Saccharomyces no cerevisiae*, es posible diferenciarlas mediante este patrón de restricción.

### 3.8. Análisis del perfil aromático mediante GC

Los compuestos aromáticos procedentes de las fermentaciones, en concreto los alcoholes superiores y los ésteres, se analizaron mediante la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) utilizando una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100  $\mu\text{m}$  (Supelco, Sigma-Aldrich, Madrid, España). El método de extracción fue el descrito por Stribny et al. (2016). Se añadió 2-heptanona (0,005%) como patrón interno.

En cuanto al equipo, se empleó un cromatógrafo de gases TRACE GC Ultra<sup>®</sup> (Thermo Scientific, MA, EE. UU.) con detector de ionización de llama (FID), equipado con una columna capilar HP-INNOWax de 30 m x 0,25 mm recubierta con una capa de 0,25  $\mu\text{m}$  de polietilenglicol reticulado (Agilent Technologies, CA, EE. UU.). El programa de temperatura del horno fue: 5 min a 35°C, 2°C/min hasta alcanzar los 150°C, 20°C/min hasta alcanzar 250°C y 2 min a 250°C. La temperatura del detector se mantuvo constante a 300°C. Los cromatogramas se analizaron mediante el programa Chrom Quest.

Los compuestos volátiles se identificaron según su tiempo de retención, comparándolos con el tiempo de retención de los compuestos de referencia. La cuantificación de compuestos volátiles se determinó utilizando los gráficos de calibración de los compuestos volátiles estándar correspondientes.

Se analizaron 25 compuestos: 4-metoxi-4-vinilfenol, lactato de etilo, acetato de etilo, etil propanol, acetato de propilo, diacetilo, acetato de isobutilo, 1-propanol, isobutanol, acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, 1-hexanol, etil octano, ácido isobutírico, gamma-butirolactona, dietil succinato, decanoato de etilo, acetato de 2-feniletanol, ácido hexanoico, alcohol bencílico, 2-feniletanol, ácido octanoico y ácido decanoico.

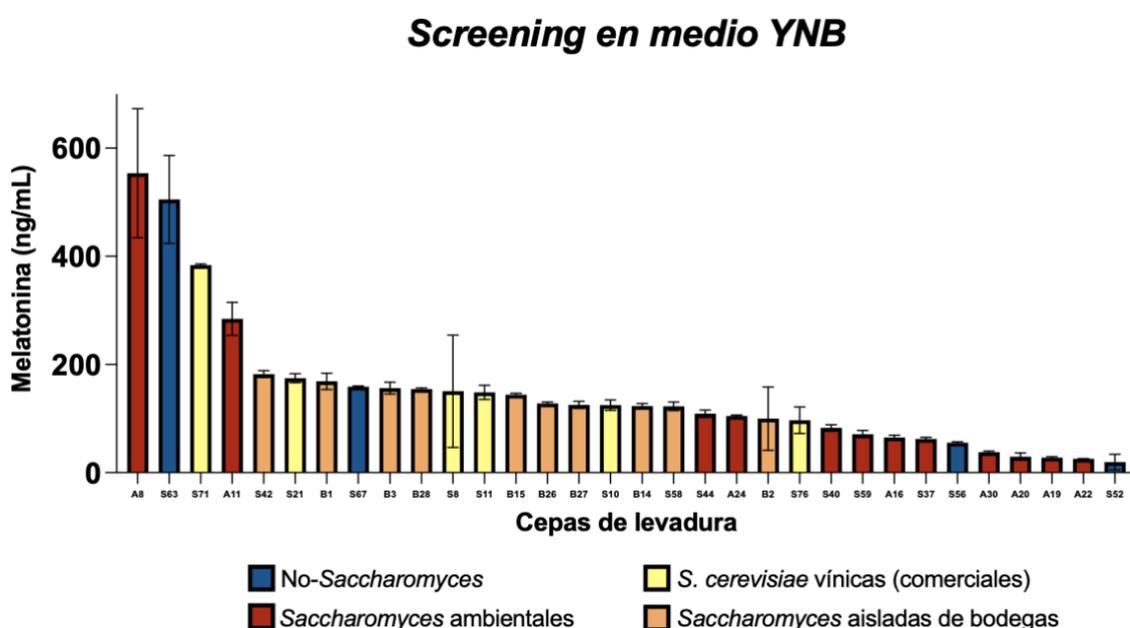
### 3.9. Análisis estadísticos

De todos los experimentos se hicieron tres réplicas. Los datos obtenidos se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Los resultados experimentales se analizaron y compararon mediante análisis estadísticos en el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Se eligió un nivel de significancia del 5% como punto de corte.

## 4. Resultados

### 4.1. Screening de cepas en función de su producción de melatonina

En primer lugar, se realizó un *screening* con 32 cepas de levadura de diferentes especies (*S. cerevisiae*, *S. no cerevisiae* y no *Saccharomyces*) y procedencia en medio YNB enriquecido en L-trp con el objetivo de comprobar cuál es aproximadamente la tendencia de producción de melatonina de las diferentes cepas según su procedencia (Figura 5). Se separaron las diferentes cepas de *Saccharomyces* por procedencia según si estas son comerciales, aisladas de bodega en otros trabajos del grupo de investigación o aisladas de ambientes naturales. En general, las cepas de levadura comerciales son aisladas de bodega, pero se hizo esta diferenciación para separar las cepas de levadura que se emplean en la industria habitualmente de las cepas de levadura que se han aislado de bodegas por parte de este grupo de investigación.

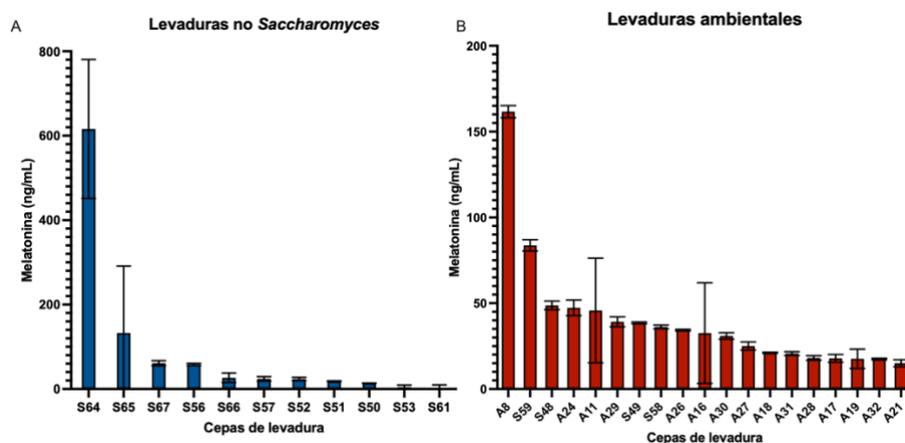


**Figura 5. Screening de producción de melatonina en medio YNB.** La producción de melatonina es superior en las cepas vnicas y aisladas de bodegas, mientras que las cepas ambientales y no *Saccharomyces* muestran una gran variabilidad.

En la Figura 5 se observa que hay una gran variabilidad entre las diferentes cepas del *screening*. Podemos ver que las cepas vnicas o procedentes de ambientes vnicos tienden a producir las cantidades más altas de melatonina y en cantidades muy similares entre ellas. En el caso de las *Saccharomyces* aisladas de bodegas, estas también presentan una producción de melatonina muy similar a las comerciales, pudiendo ser la adaptación a este tipo de ambientes una explicación. Donde observamos una variabilidad muy alta es en las *Saccharomyces* ambientales y las no *Saccharomyces*, que se encuentran en diferentes puntos de la gráfica. En el caso de *Saccharomyces* de diferentes ambientes, vemos como tienen una tendencia a una menor producción de melatonina respecto a las vnicas, habiendo un par de excepciones como la A11, aislada en Perú, y la A8, aislada de El Sauzal, una región vitivinícola importante de Tenerife. En el caso de cepas no *Saccharomyces*, se observa una gran variabilidad entre ellas, ya que son

especies distintas entre sí. Algunas tienen producciones muy altas, como S63, una cepa de la especie *Metschnikowia* sp.

Dado que se observó una variabilidad muy alta en las cepas ambientales y las no *Saccharomyces*, se hizo otro screening en medio YNB con más cepas de estos tipos, para ver si se lograba encontrar, en las cepas de nuestra colección, alguna cepa interesante en cuanto a producción de melatonina.



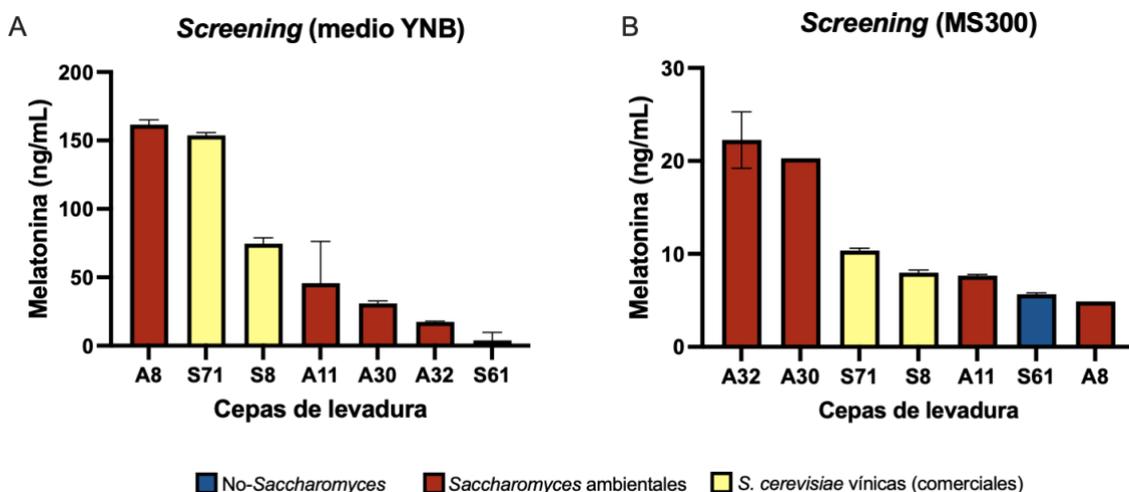
**Figura 6. Screening en medio YNB de levaduras ambientales y no *Saccharomyces*.** Las cepas S64 y S63, no *Saccharomyces*, dan las mayores producciones de melatonina. Entre las ambientales, la que más melatonina produce es la A8, *S. cerevisiae* aislada de El Sauzal.

En la Figura 6 se pueden ver los datos obtenidos en este nuevo *screening*. Podemos ver que en las levaduras no *Saccharomyces* se producen, en algunos casos como en las cepas S64 y S65, cantidades más altas de melatonina que en las levaduras ambientales. En estas últimas, las cepas que más producen son la A8, la S59, la S48, la A24 y la A11. Las cepas A8 y S59 son *S. cerevisiae* aisladas de ambientes enológicos, que concuerda con lo que hemos visto anteriormente, ya que su tendencia es de mayor producción frente a las especies de otras procedencias.

Las cepas que más producen, la S64 y la S65, son de la especie *Trigonopsis cantarelli/Candida cantarelli*. Esta especie se ha evaluado en diferentes estudios y en algunos de ellos se ha visto que es potencialmente perjudicial para el desarrollo de las fermentaciones y las propiedades de los vinos finales (Malfeito-Ferreira, 2019; Portugal et al., 2015; Echeverrigaray et al., 2013), ya que se ha asociado a aromas desagradables y a características no deseadas, como una alta acidez volátil. No obstante, en otros estudios se ha observado que también puede aportar mayor producción de glicerol (García et al., 2010) y compuestos secundarios (Toro et al., 2002). A pesar de esto, para evitar emplear levaduras que puedan producir efectos negativos en los vinos finales, las descartaremos de nuestro *screening*, ya que el consorcio debe estar formado por levaduras que produzcan vinos con características sensoriales adecuadas.

Para decidir qué cepas formarían parte de nuestro *screening*, se hizo una prueba con cepas ya testadas procedentes de cada grupo: dos cepas vínicas, S71 y S8; dos cepas *S. cerevisiae* ambientales, A8 y A11; 2 cepas *S. no cerevisiae*, A30 y A32; y una cepa no *Saccharomyces*, S61. En este ensayo, se comparó su producción de melatonina en medio YNB y en mosto sintético MS300 (Figura 7). El objetivo de este *screening* es comparar la producción de melatonina en el medio del screening enriquecido en L-trp junto con mosto sintético, que será más parecido al

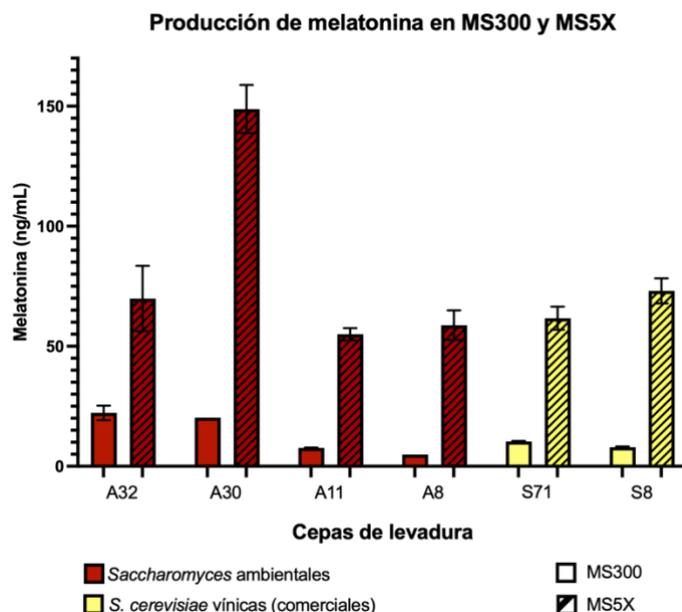
que se llevarán a cabo las fermentaciones finalmente y, por tanto, es interesante para seleccionar las levaduras.



**Figura 7. Screening de siete cepas, vónicas, ambientales y no *Saccharomyces*, en YNB (A) y MS300 (B).** (A) En el medio YNB dan mayor producción las vónicas, S71 y S8, y la aislada ambientalmente, A8. (B) En medio MS300 dan mayor producción las ambientales A32 y A30.

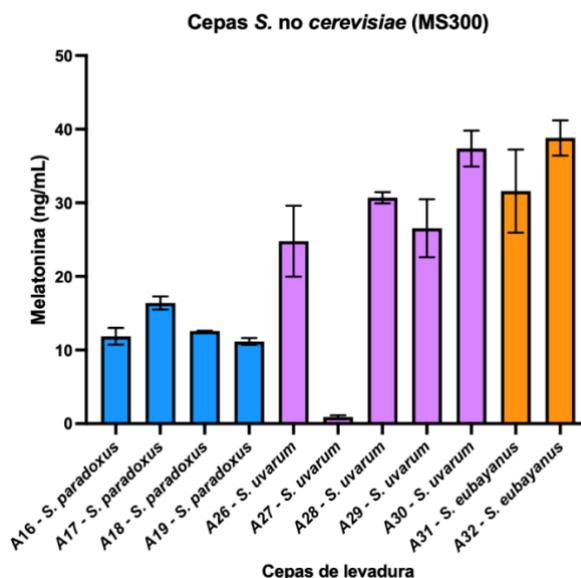
En la Figura 7 observamos que al cambiar de medio YNB a MS300 hay una menor producción de melatonina en el mosto, y la producción que muestran las diferentes cepas cambia en gran medida. En el *screening* con YNB (Figura 7A), la cepa que más produce de forma significativa frente a las demás es la A8, seguida de la S71. Por otro lado, en el *screening* en MS300 (Figura 7B) las dos cepas que más producen son A32 y A30, sin diferencias significativas entre ellas, pero con gran diferencia con respecto a las demás.

Para comprobar si este efecto podía provenir del medio en sí, se hizo un *screening* en mosto sintético enriquecido en aminoácidos aromáticos (MS5X) con estas mismas cepas (Figura 8), asemejando el enriquecimiento que se hace del L-Trp en el medio YNB. Esto se hizo para comprobar si es posible aumentar la síntesis de melatonina incrementando la cantidad de AAA disponible en mostos, pudiendo ser útil para la búsqueda de cepas candidatas.



**Figura 8. Screening comparativo en MS300 y MS5X de cepas vínicas y ambientales.** La producción de melatonina es mayor en el MS5X frente al MS300 para todas las cepas. Resultados de la fermentación con la cepa S61 no mostrados por contaminación.

En la Figura 8 se puede observar que todas las cepas producen mayor cantidad de melatonina en el medio MS5X con respecto a la producción obtenida en el medio MS300. Esto demuestra que al enriquecer el mosto sintético con aminoácidos aromáticos la producción de melatonina es capaz de aumentar. Esto corrobora los estudios previos en los que se ha visto que la producción de melatonina depende, entre otras cosas, de la cantidad de triptófano del medio y de la especie y cepa de levadura empleada en la fermentación. Igual que en el anterior ensayo, las cepas ambientales no *cerevisiae* que más destacan son la A30 y la A32, por lo que determinamos que serían las preseleccionadas para formar parte de nuestro consorcio, ya que aunque en el medio YNB no son de las que más destacan, esta producción en mosto sintético resulta interesante. En el caso de las cepas *S. cerevisiae*, observamos que las que más producen son la S71 y S8, vínicas comerciales, pero dado que queremos priorizar las cepas ambientales sobre las comerciales por su mayor variabilidad, seleccionaremos la cepa A8, que fue la que mayor producción mostró en el medio YNB.



**Figura 9. Ensayo de cepas *S. no cerevisiae* en MS300. (A16-A19) *S. paradoxus*, (A26-A30) *S. uvarum*, (A31-A32) *S. eubayanus*. Se observan diferencias significativas intra e interespecie.**

Por último, se hizo una prueba comparando diferentes cepas de tres especies de *S. no cerevisiae*, con el objetivo de observar si encontrábamos otra cepa que produjera una mayor cantidad de melatonina (Figura 9). Se observó que las que mayor producción dan son las *S. eubayanus*, seguidas de la *S. uvarum*. Entre ambas especies no muestran diferencias significativas, pero sí entre cepas de la misma especie, en el caso de la A30 y la A27. También muestran diferencias significativas con la otra especie estudiada (*S. paradoxus*). Las cepas que anteriormente destacaban por su mayor producción, A30 y A32, de nuevo en este ensayo son las que más melatonina producen.

Por tanto, las cepas que finalmente se seleccionaron son la A30, de la especie *Saccharomyces uvarum* aislada de ambientes naturales; la A32, que pertenece a la especie *Saccharomyces eubayanus* y fue aislada igualmente de ambientes naturales, y la cepa A8, *Saccharomyces cerevisiae* procedente de El Sauzal, y aislada de un ambiente enológico.

## 4.2. Diseño de consorcios

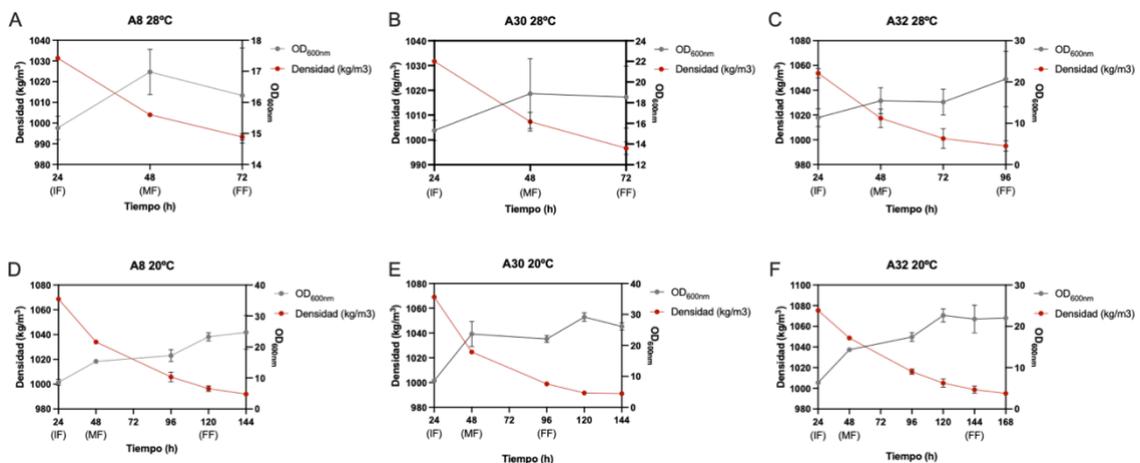
Una vez seleccionadas las cepas de levadura que forman parte de los consorcios, se llevaron a cabo fermentaciones con diferentes condiciones para estudiar finalmente la producción de melatonina, así como las interacciones microbianas y moleculares entre ellas. Los consorcios estarán formados por una especie *S. no cerevisiae* y una cepa *S. cerevisiae*, por tanto, tendremos por un lado el consorcio de las cepas A8+A30 (*S. cerevisiae* y *S. uvarum*) y por otro lado el consorcio de las cepas A8+A32 (*S. cerevisiae* y *S. eubayanus*). En estos ensayos, se estudiarán tanto fermentaciones mixtas como fermentaciones puras para poder observar las diferencias y hacer comparaciones entre ellas.

En todas las fermentaciones se lleva a cabo un control diario de OD<sub>600nm</sub> y densidad (kg/m<sup>3</sup>) con el objetivo de monitorizar el crecimiento de las levaduras, que supone un aumento de biomasa y por tanto de la OD<sub>600nm</sub>, y el consumo de azúcares y la producción de etanol, que conlleva una disminución de la densidad del medio. De igual modo, se hicieron recuentos en placa para

cuantificar las células viables que se encuentran en cada una de las fermentaciones en diferentes puntos. Dado que la OD mide tanto las células viables como las no viables (cantidad de biomasa), además de que puede cuantificar también impurezas del medio, el recuento en placa nos da una cantidad real del número de levaduras vivas que se encuentran fermentando el medio, además de servirnos como control para detectar contaminaciones si las hubiera. En algunas fermentaciones no se pudo hacer el recuento en placa del punto inicial IF, 24h tras la inoculación, ya que la velocidad de la fermentación fue muy rápida y por tanto el primer punto que se tomó ya se encontraba en las densidades correspondientes a la mitad de la fermentación.

#### 4.2.1. Fermentaciones puras

En primer lugar, se llevaron a cabo fermentaciones de las cepas por separado en diferentes condiciones, para así estudiar las características y la cantidad de melatonina producida por estas cuando fermentan en solitario el MS300. Estos ensayos se hicieron a dos temperaturas diferentes: 20°C y 28°C.



**Figura 10. Control diario de la OD<sub>600nm</sub> y densidad en las fermentaciones puras. (A)** Fermentación pura de la cepa A8 a 28°C. **(B)** Fermentación pura de la cepa A30 a 28°C. **(C)** Fermentación pura de la cepa A32 a 28°C. **(D)** Fermentación pura de la cepa A38 a 20°C. **(E)** Fermentación pura de la cepa A30 a 20°C. **(F)** Fermentación pura de la cepa A32 a 20°C.

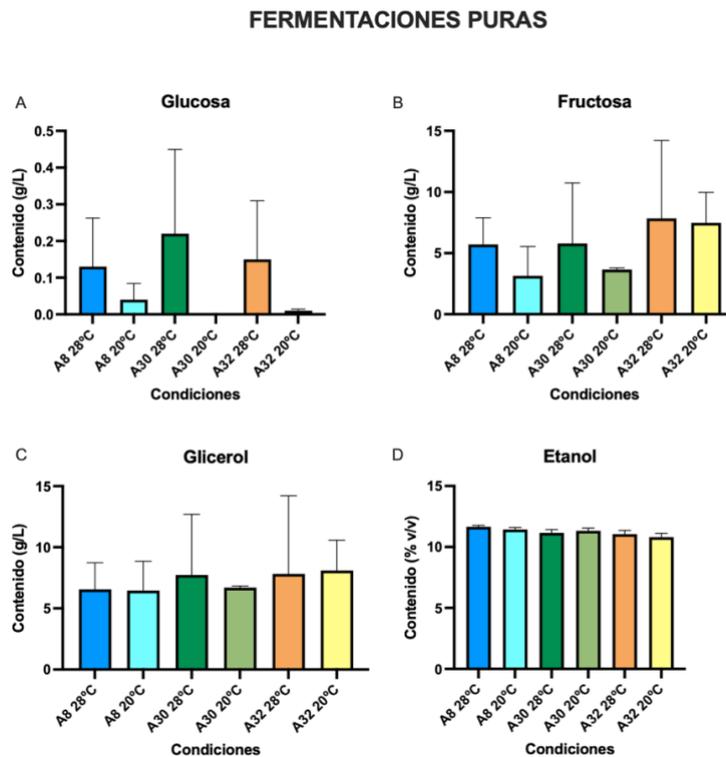
Levadura	MF	FF
A8	$1'98 \cdot 10^8 \pm 0'06 \cdot 10^8$	$1'34 \cdot 10^8 \pm 0'15 \cdot 10^8$
A30	$1'77 \cdot 10^8 \pm 0'49 \cdot 10^8$	$1'17 \cdot 10^8 \pm 0'43 \cdot 10^8$
A32	$4'38 \cdot 10^8 \pm 4'69 \cdot 10^8$	$1'65 \cdot 10^8 \pm 0'35 \cdot 10^8$

**Tabla 1.** Recuento en placa de las fermentaciones puras a 28°C. Valores expresados en (UFC/mL).

Levadura	MF	FF
A8	$1'04 \cdot 10^8 \pm 0'41 \cdot 10^8$	$2'16 \cdot 10^8 \pm 0'16 \cdot 10^8$
A30	$1'50 \cdot 10^8 \pm 0'14 \cdot 10^8$	$2'90 \cdot 10^8 \pm 0'66 \cdot 10^8$
A32	$3'7 \cdot 10^8 \pm 4'1 \cdot 10^8$	$2'96 \cdot 10^8 \pm 0'15 \cdot 10^8$

**Tabla 2.** Recuento en placa de las fermentaciones puras a 20°C. Valores expresados en (UFC/mL).

A partir del control de las fermentaciones (Figura 10, Tablas 1 y 2), podemos observar que las tres cepas son capaces de fermentar tanto a 28°C como a 20°C, ya que con el transcurso del tiempo la densidad disminuye y la OD<sub>600nm</sub> y la población de levaduras aumenta. También se pudo ver que a 28°C las fermentaciones acaban entre las 72 y las 96 horas, pero a 20°C tardan más, entre 144 y 168 horas. La prueba a 20°C se hizo porque las cepas A30 y A32 son criotolerantes, crecen mejor a temperaturas menores de 28°C, que es el óptimo de *S. cerevisiae*. Esta es una característica importante que debemos tener en cuenta en el consorcio, con la cual trabajaremos para beneficiarlas frente a la cepa A8 y observar así el efecto que esto produce en los diferentes parámetros que mediremos cuando las fermentaciones hayan finalizado.



**Figura 11. Análisis por UHPLC-IR de azúcares, glicerol y etanol en las fermentaciones puras. (A)** Contenido de glucosa en g/L. **(B)** Contenido de fructosa en g/L. **(C)** Contenido de glicerol en g/L. **(D)** Contenido de etanol en % (v/v).

En cuanto al análisis de azúcares y ácidos por UHPLC-IR (Figura 11), observamos que en todos los casos se consume prácticamente la totalidad de la glucosa, quedando una cantidad residual significativamente superior en las fermentaciones a 28°C. En cuanto al consumo de fructosa, vemos que las fermentaciones de A8 y A30 a 20°C presentan un consumo significativamente inferior a las demás y sin diferencias significativas entre ellas. Las cantidades de glucosa y fructosa bajas indican una fermentación completa en todos los casos. En cuanto a la producción de glicerol, no encontramos diferencias significativas. En el caso del etanol, observamos que la fermentación de A8 a 28°C produce una cantidad ligeramente superior de etanol de forma estadísticamente significativa. En todas las fermentaciones este compuesto se produce en cantidades por encima del 10 % v/v.

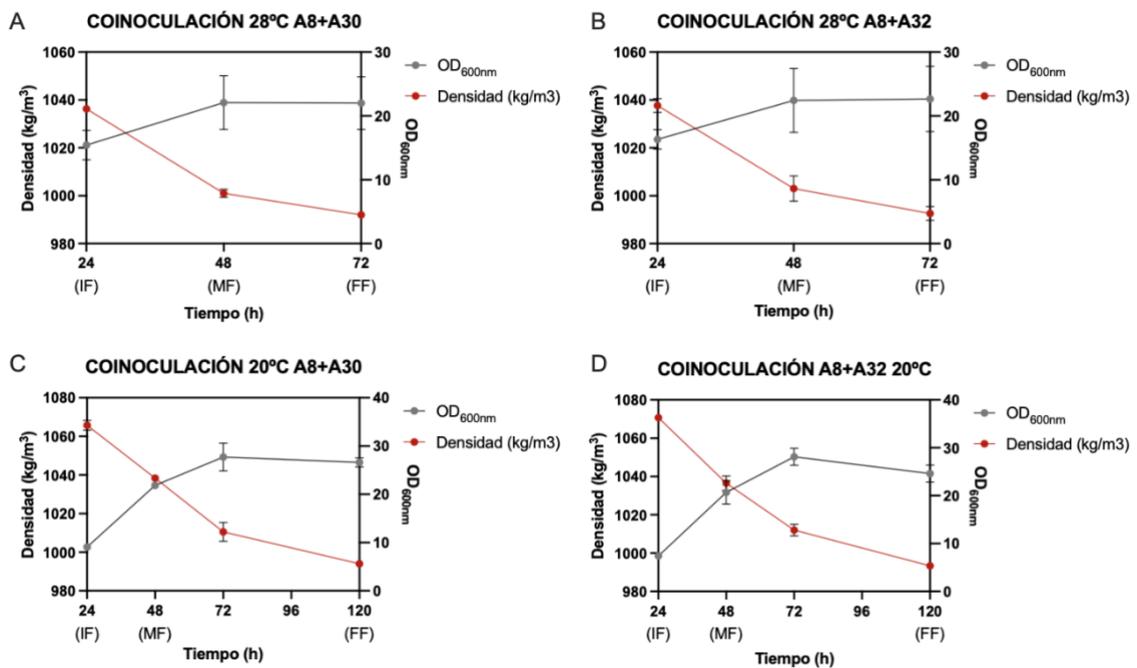
Por lo tanto, estos ensayos corroboran que las cepas candidatas por si solas tienen buenas capacidades fermentativas. En el caso de *S. uvarum* y *S. eubayanus* es algo a destacar, ya que no todas las cepas de estas especies son capaces de finalizar la fermentación.

#### 4.2.2. Consorcios

En cuanto a las fermentaciones llevadas a cabo por los consorcios, estas se llevaron a cabo de dos formas diferentes: coinoiculando las cepas, es decir, inocularlas a la vez en el mosto sintético, e inoculando las cepas secuencialmente, es decir, inocular primero la *S. no cerevisiae* para darle una cierta ventaja y tras un tiempo determinado inocular la *S. cerevisiae*.

#### Coinoculaciones

En el caso de la coinoculación, se realizó a dos temperaturas diferentes: primero a 28°C y después a 20°C.



**Figura 12. Control diario de la OD<sub>600nm</sub> y densidad en las coinoculaciones. (A)** Coinoculación del consorcio A8+A30 a 28°C. **(B)** Coinoculación del consorcio A8+A32 a 28°C. **(C)** Coinoculación del consorcio A8+A30 a 20°C. **(D)** Coinoculación del consorcio A8+A32 a 20°C.

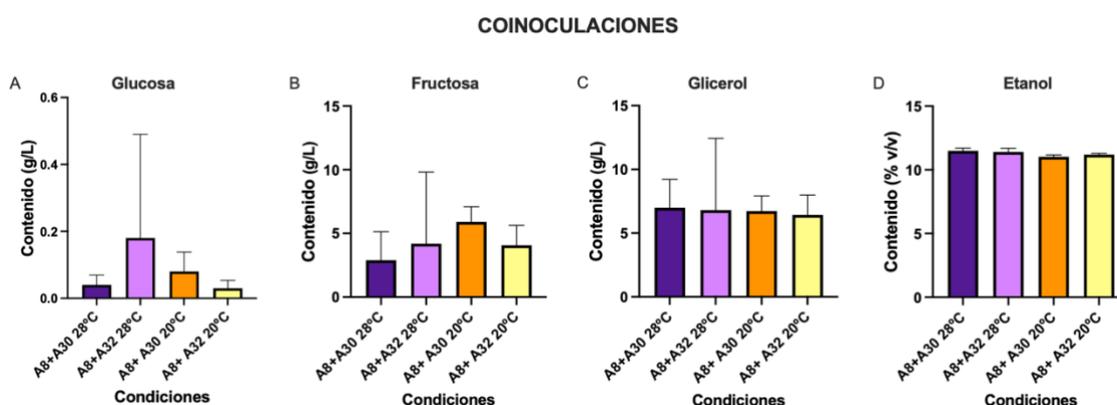
Consorcio	MF	FF
A8+A30	$2'17 \cdot 10^8 \pm 0'1 \cdot 10^8$	$1'9 \cdot 10^8 \pm 0'76 \cdot 10^8$
A8+A32	$2'18 \cdot 10^8 \pm 0'54 \cdot 10^8$	$4'18 \cdot 10^8 \pm 3'91 \cdot 10^8$

**Tabla 3.** Recuento en placa de coinoculación a 28°C. Valores expresados en UFC/mL.

Consorcio	IF	MF
A8+A30	$1'22 \cdot 10^8 \pm 0'09 \cdot 10^8$	$2'00 \cdot 10^8 \pm 0'22 \cdot 10^8$
A8+A32	$1'48 \cdot 10^8 \pm 0'19 \cdot 10^8$	$2'69 \cdot 10^8 \pm 0'57 \cdot 10^8$

**Tabla 4.** Recuento en placa de la coinoculación a 20°C. Valores expresados en UFC/mL.

Observamos que las fermentaciones finalizan sin paradas en las dos condiciones de temperatura y con los dos consorcios, ya que la densidad baja progresivamente hasta encontrarse en valores inferiores a  $998 \text{ kg/m}^3$  y la  $OD_{600\text{nm}}$  va aumentando hasta que llega un punto en el que se mantiene estable o incluso baja ligeramente, en el que la fermentación ya está acabada (Figura 12). En cuanto a los valores de recuento de poblaciones, también se observa que estos aumentan con el tiempo (Tabla 4) o se mantienen más o menos constantes (Tabla 3). En todas las fermentaciones el inóculo inicial fue de  $0.2 \text{ OD}_{600\text{nm}}$  (aproximadamente  $2 \cdot 10^6 \text{ UFC/mL}$ ), por tanto, observamos que en todas ellas el número de células viables aumenta con el transcurso de la fermentación, indicándonos que esta se desarrolla sin paradas hasta el final. En algunos casos, en el punto final en el que la fermentación ya ha finalizado empezamos a ver un decrecimiento de la población de levaduras.



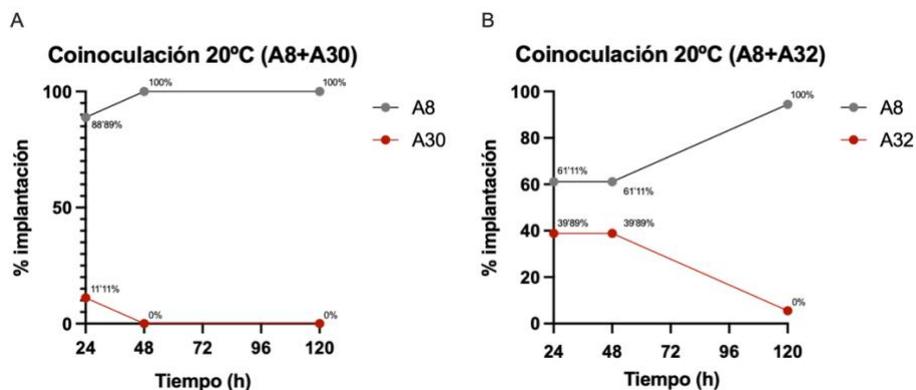
**Figura 13. Análisis por UHPLC-IR de azúcares, glicerol y etanol en las coinoculaciones. (A)** Contenido de glucosa en g/L. **(B)** Contenido de fructosa en g/L. **(C)** Contenido de glicerol en g/L. **(D)** Contenido de etanol en % v/v.

En el análisis de azúcares y ácidos por UHPLC-IR (Figura 13), observamos que, igual que en el caso de las fermentaciones puras, en el consorcio A8+A32 a  $28^\circ\text{C}$  queda una cantidad residual de glucosa superior a la de las demás condiciones. Asimismo, en referencia al consumo de fructosa también vemos diferencias significativas. Observamos que en el caso del consorcio A8+A32 no hay diferencias significativas, pero en el consorcio A8+A30 se consume menos fructosa en frío, a  $20^\circ\text{C}$ , que a una temperatura superior, de  $28^\circ\text{C}$ . En cuanto a la producción de etanol, vemos que el consorcio A8+A30 produce un poco más de etanol que el consorcio A8+A32, pero todas ellas se sitúan entre el 10% y el 15% v/v.

Por otra parte, con el objetivo de controlar la dinámica de poblaciones en las fermentaciones mixtas y registrar qué porcentaje de células de cada especie hay en las fermentaciones en los puntos más importantes, se llevó a cabo un muestreo de las fermentaciones en esos puntos y se identificaron un número de colonias para determinar a cuál de las dos especies pertenecían. En este estudio se observó que en los ensayos en los que se coinoculaban ambas cepas a  $28^\circ\text{C}$ , desde el inicio de la fermentación la totalidad de la población son A8, la cepa *S. cerevisiae* (datos no mostrados). Esto es debido a que, a temperaturas moderadamente elevadas, la *S. cerevisiae* domina sobre las demás levaduras y logra imponerse, siendo estas condiciones inadecuadas para el estudio que queremos realizar ya que el medio no es fermentado por ambas cepas de levadura, sino por una, y por tanto no hay un consorcio entre ellas. Es por esto que consideramos de gran importancia que las especies A30 y A32 sean criotolerantes, ya que podemos utilizar esa diferencia entre ellas y la cepa A8 como una ventaja si bajamos la temperatura de los ensayos. Este es el motivo por el cual se hizo el ensayo a  $20^\circ\text{C}$  y por el cual los ensayos de inoculación

secuencial son a 20°C, para observar si así se conseguía establecer un consorcio entre las cepas y por tanto podíamos ver el efecto de ambas sobre los demás parámetros estudiados.

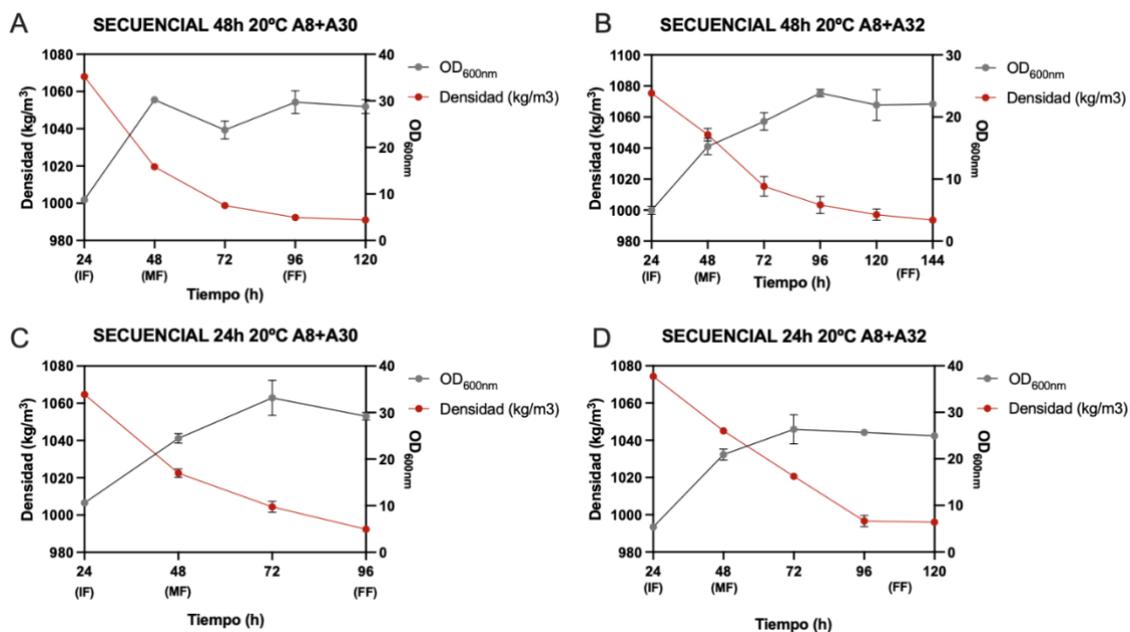
En el caso de las coinoculaciones a 20°C (Figura 14), se pudo observar que la imposición de la cepa A8 (*S. cerevisiae*) no ocurre desde el principio como en el caso anterior, sino que se retrasa a la mitad e incluso el final de la fermentación. En el principio de la fermentación encontramos ambas cepas de levadura en diferentes proporciones dependiendo del consorcio. Podemos observar que la cepa A30 es desplazada mucho más rápido por la A8 (Figura 14A) que la cepa A32 (Figura 14B), ya que desde el principio se encuentra en una proporción mucho más baja que la *S. cerevisiae* (11'11% frente a un 88'89%), y en la mitad de la fermentación ya se impone la A8. En el caso del consorcio A8+A32 (Figura 14B), ambas cepas de levadura se mantienen en una proporción más cercana (61'11% la A8 y 39'89% la A32) hasta la mitad de la fermentación. Al final de la fermentación ya domina la A8. En estos consorcios con estas condiciones sí que podríamos ver la influencia de ambas cepas de levadura en la fermentación y en la producción de melatonina.



**Figura 14. Implantación de las cepas de levadura en las coinoculaciones. (A)** Coinoculación del consorcio A8+A30 a 20°C. **(B)** Coinoculación del consorcio A8+A32 a 20°C.

### Inoculaciones secuenciales

Por otro lado, la inoculación secuencial también se llevó a cabo de dos formas diferentes: en una de ellas la segunda cepa se inoculó a las 48h de haber inoculado la primera, y en la otra se hizo a las 24h. En ambas condiciones la cepa que se inoculó primero fue la *S. no cerevisiae* y ambos ensayos se hicieron a 20°C.



**Figura 15. Control diario de la OD<sub>600nm</sub> y densidad en las inoculaciones secuenciales. (A)** Inoculación secuencial tras 48h del consorcio A8+A30 a 20°C. **(B)** Inoculación secuencial tras 48h del consorcio A8+A32 a 20°C. **(C)** Inoculación secuencial tras 24h del consorcio A8+A30 a 20°C. **(D)** Inoculación secuencial tras 24h del consorcio A8+A32 a 20°C.

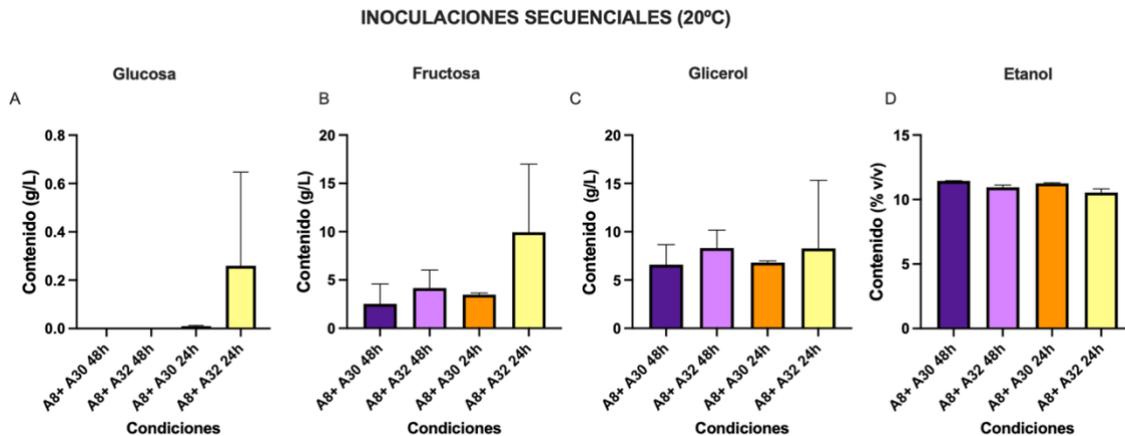
Consorcio	IF	MF	FF
A8+A30	$1'96 \cdot 10^8 \pm 0'08 \cdot 10^8$	$3'97 \cdot 10^8 \pm 0'19 \cdot 10^8$	$3'91 \cdot 10^8 \pm 1'08 \cdot 10^8$
A8+A32	$1'10 \cdot 10^8 \pm 0'24 \cdot 10^8$	$2'39 \cdot 10^8 \pm 0'38 \cdot 10^8$	$5'72 \cdot 10^8 \pm 2'59 \cdot 10^8$

**Tabla 5.** Recuento en placa de la inoculación secuencial tras 48h a 20°C. Valores expresados en UFC/mL.

Consorcio	IF	MF
A8+A30	$1'68 \cdot 10^8 \pm 0'46 \cdot 10^8$	$3'91 \cdot 10^8 \pm 0'21 \cdot 10^8$
A8+A32	$1'19 \cdot 10^8 \pm 0'09 \cdot 10^8$	$3'60 \cdot 10^8 \pm 0'31 \cdot 10^8$

**Tabla 6.** Recuento en placa de la inoculación secuencial tras 24h a 20°C. Valores expresados en UFC/mL.

En este caso ocurre lo mismo que en los anteriores. Vemos que las fermentaciones se desarrollan sin paradas, ya que continuamente aumenta la OD<sub>600nm</sub> y disminuye la densidad (Figura 15). También observamos que la población de levaduras aumenta progresivamente y en uno de los casos se estabiliza al final de la fermentación (Tablas 6 y 7).

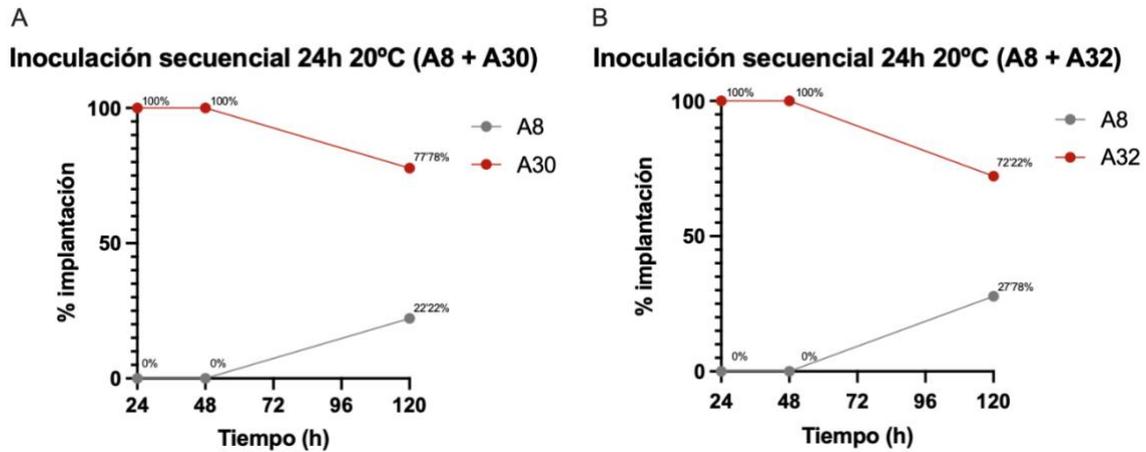


**Figura 16. Análisis por UHPLC-IR de azúcares, glicerol y etanol en las inoculaciones secuenciales. (A)** Contenido de glucosa en g/L. **(B)** Contenido de fructosa en g/L. **(C)** Contenido de glicerol en g/L. **(D)** Contenido de etanol en % (v/v).

En este caso, en el análisis de azúcares y ácidos por UHPLC-IR (Figura 16) en los consorcios inoculados secuencialmente tras 48h encontramos diferencias significativas en cuanto a la producción de etanol, ya que se observa una producción de etanol ligeramente superior en el consorcio A8+A30. Por otro lado, en los consorcios inoculados secuencialmente tras 24h encontramos diferencias significativas en todos los casos. En el consorcio A8+A32 observamos una cantidad residual de fructosa muy superior a la que se cuantifica en el consorcio A8+A30 y en la condición de inoculación secuencial tras 48h. Además, también vemos que hay una cantidad muy pequeña de glucosa, mientras que en las otras condiciones no queda prácticamente nada de este azúcar. En cuanto a la producción de glicerol observamos una producción superior en el consorcio A8+A32, sin diferencias significativas frente al consorcio A8+A32 inoculado tras 48h. Por último, se ha cuantificado una cantidad superior de etanol en el consorcio A8+A30. Estas diferencias nos pueden indicar que la fermentación con el consorcio A8+A32 inoculado secuencialmente tras 24h a 20°C no fermenta tan rápido como los demás, ya que se ve una mayor cantidad de azúcares residuales.

A la hora de estudiar la implantación de las poblaciones, en el caso de la inoculación secuencial con 48 horas de diferencia entre las cepas, se observó que en ambos consorcios desde el principio de la fermentación dominó la cepa no *cerevisiae*, A30/A32 (datos no mostrados). Esto es debido a que estas condiciones le dan demasiada ventaja a estas especies, que consiguen imponerse desde el principio, no permitiendo que la cepa A8 se establezca en el medio cuando esta es inoculada. De igual forma que los consorcios coinoculados a 28°C, estas condiciones no nos sirven para conseguir nuestro objetivo ya que en la fermentación solo participa una de las cepas. Para reducir la ventaja que se les había dado a las cepas A30 y A32, se llevó a cabo el segundo ensayo, reduciendo el tiempo entre las inoculaciones a 24h (Figura 17). En este, se observó que en ambos consorcios se daban situaciones similares. Al principio de la fermentación domina la cepa no *cerevisiae* con un 100% de la implantación, ya que la otra cepa está recién inoculada, y progresivamente la población de A8 va aumentando mientras que la de A30/A32 va disminuyendo, situándose al final de la fermentación en una proporción de aproximadamente 75/25 (77'78% y 22'22% en el caso de A8+A30, Figura 17A; y 72'22% y 27'78% en el caso de A8+A32, Figura 17B). Estos consorcios con estas condiciones de fermentación podrían ser buenos candidatos para el propósito que nos planteamos, de igual forma que la condición de coinoculación a 20°C, ya que ambas cepas se encuentran en la fermentación en

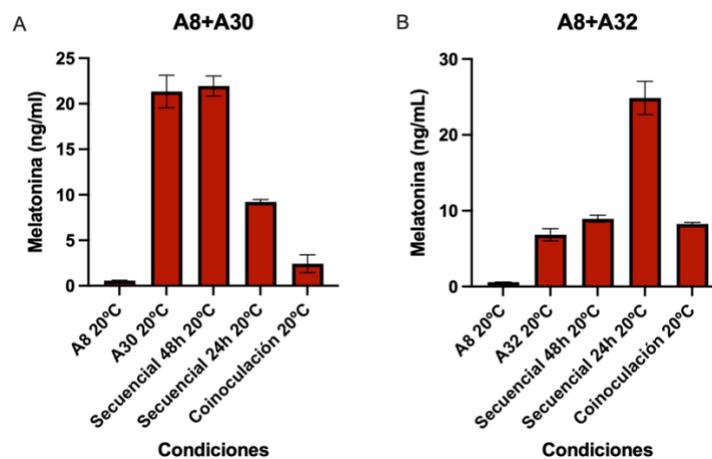
mayor o menor medida, participan en ella y podría observarse el efecto que estas producen en los parámetros finales que medimos.



**Figura 17. Implantación de las cepas de levadura en las inoculaciones secuenciales. (A)** Inoculación secuencial tras 24h del consorcio A8+A30 a 20°C. **(B)** Inoculación secuencial tras 24h del consorcio A8+A32 a 20°C.

### 4.3. Interacciones metabólicas: producción de melatonina (UHPLC-Fluorescencia)

Para analizar el contenido en melatonina de las fermentaciones cuando estas habían finalizado, se empleó UHPLC con detector de fluorescencia, ya que es el equipo del que se dispone. Se trata de un método de buena sensibilidad, que nos proporciona una cuantificación precisa y reproducible en cuanto a los tiempos de retención del analito de interés, permitiéndonos así conseguir una identificación muy exacta de los picos y, por tanto, de los analitos.



**Figura 18. Melatonina producida por los consorcios de levaduras en las diferentes condiciones. (A)** Consorcio A8+A30. **(B)** Consorcio A8+A32.

A la hora de analizar la cantidad de melatonina, solo se tuvieron en cuenta las fermentaciones realizadas a 20°C de temperatura, ya que se decidió que son las más interesantes porque mostraron mayor interacción entre las cepas durante toda la fermentación que en los ensayos a 28°C, descartándose así la coinoculación a 28°C.

En el caso del consorcio A8+A30 (Figura 18A), observamos que la coinoculación genera una cantidad baja de melatonina, aunque superior a la cepa *S. cerevisiae* (A8) pura, que da la menor producción, pero inferior a la cepa *S. uvarum* (A30) pura, que da la mayor producción, junto a la inoculación secuencial tras 48h. En el caso de la inoculación secuencial tras 24h obtenemos una cantidad intermedia: superior a la A8 pura y a la coinoculación, pero todavía inferior a la fermentación con A30 pura y la inoculación secuencial tras 48h. En el caso de la inoculación secuencial tras 48h no vemos diferencias significativas con la fermentación de A30 pura.

Por otro lado, en el consorcio A8+A32 (Figura 18B) observamos una mayor diferencia entre las condiciones que en el consorcio A8+A30. Entre la coinoculación y la inoculación secuencial tras 48h no observamos diferencias significativas, presentan un valor de producción de melatonina intermedio. Ambas producen una cantidad superior de melatonina que las cepas puras, que en este caso son las que menor cantidad de melatonina muestran, aunque la A32 produce significativamente más que la A8. Por otro lado, la inoculación secuencial tras 24h muestra valores mucho más altos que las otras condiciones,  $24'87 \pm 2'19$  ng/mL, situándose también por encima de las condiciones que más producen del consorcio A8+A30. Por tanto, este consorcio con estas condiciones podría ser el más adecuado para el objetivo que deseamos conseguir.

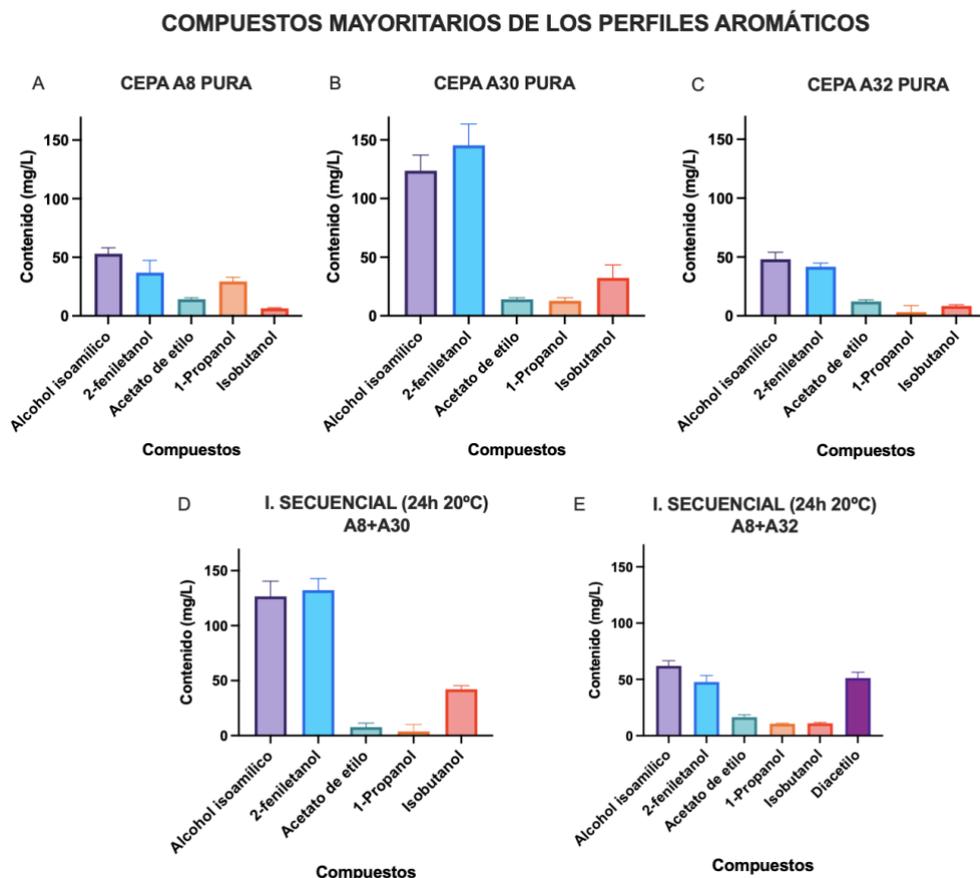
En ambos consorcios, la similitud entre la inoculación secuencial tras 48h y la fermentación pura de A30/A32 es debida a que, como hemos visto en el estudio de implantación, en la inoculación secuencial tras 48h la totalidad de la población de levaduras son A30/A32. No se han detectado células de A8, por tanto, esta no habrá participado en la fermentación y entonces no se ve su efecto, ya que se trata prácticamente de una fermentación pura de la especie A30/A32. En el caso de la coinoculación, en el consorcio A8+A30 el resultado es muy similar al de la fermentación A8 pura porque prácticamente desde el principio dominó la especie A8 frente a la A30, desplazándola antes del punto MF. Por otro lado, en el consorcio A8+A32, sí se implantaron las dos especies desde el principio en una proporción aproximada de 60% A8 y 40% A32, y entre los puntos MF y FF la A8 desplazó por completo a la A32. Esto se ve reflejado en el dato de producción de melatonina, ya que se produce una cantidad sutilmente superior a la que se observa en las fermentaciones puras. No obstante, la inoculación secuencial tras 48h, a pesar de ser como una fermentación pura de A32, muestra un valor un poco más alto que ambas. Por último, en el caso de la inoculación secuencial tras 24h, en el consorcio A8+A30 se observa una cantidad de melatonina producida intermedia entre ambas cepas puras y en el consorcio A8+A32 se observa una producción muy superior a las cepas puras. Este valor de producción diferente al de ambas cepas puras muestra el efecto de la interacción que se ha producido entre las levaduras, ya que en estas condiciones sí que se observa una implantación de ambas, en la que, al principio, la proporción de A30/A32 es del 100% y poco a poco va disminuyendo para dar paso a la A8.

Sin duda, la condición en la que se observa una diferencia más destacable es la inoculación secuencial tras 24h en el consorcio A8+A32, ya que observamos valores mucho más altos que las demás condiciones dentro de su consorcio y además también es superior a los observados en el consorcio A8+A32.

#### 4.4. Interacciones moleculares: perfil aromático (GC)

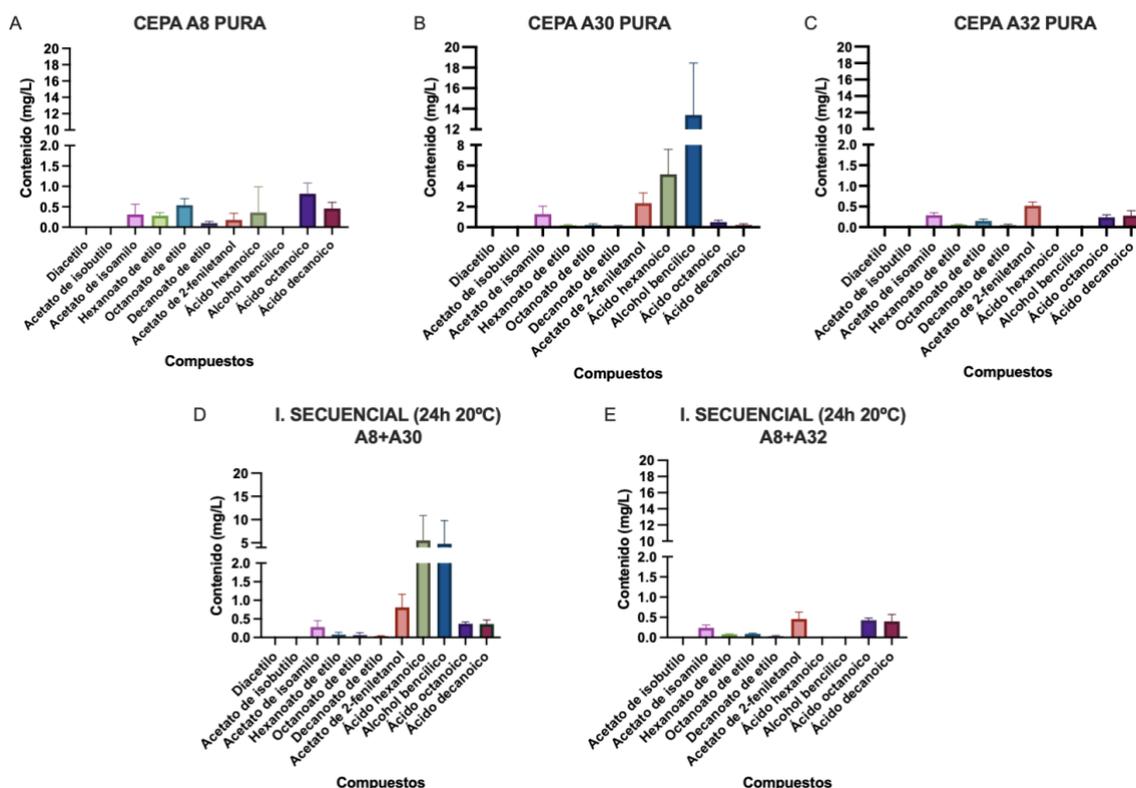
Una vez observado que la condición que más melatonina produce es la inoculación secuencial tras 24h a 20°C, se analizó el perfil aromático del vino final producido por ambos consorcios con estas condiciones mediante cromatografía de gases. También se analizaron las fermentaciones puras para así poder comparar sus perfiles y ver las diferencias. De los 25 compuestos volátiles que se analizaron solo se detectaron 16, algunos de ellos en muy bajas cantidades. Los que se encuentran en cantidades superiores se muestran en la Figura 19, mientras que los que se han detectado a concentraciones inferiores se muestran en la Figura 20. Entre los mayoritarios podemos ver alcoholes superiores (alcohol isoamílico, 2-feniletanol, 1-propanol e isobutanol) y acetato de etilo, el éster de acetato que generalmente se encuentra en mayor concentración en los vinos. Por otro lado, entre los compuestos minoritarios encontramos ésteres de acetato (acetato de isobutilo, acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletanol), ésteres de etilo (hexanoato, octanoato y decanoato de etilo), ácidos grasos (ácido hexanoico, octanoico y decanoico), diacetilo o butadiona y alcohol bencílico.

Es importante destacar que todos estos compuestos aromáticos que se han detectado en las fermentaciones provienen solo del metabolismo de la levadura porque, al tratarse de mosto sintético, no pueden venir de la uva. Por tanto, con un mosto natural de uva los perfiles aromáticos obtenidos podrían ser mucho más ricos e interesantes.



**Figura 19. Compuestos mayoritarios de los perfiles aromáticos (GC).** (A) Fermentación de la especie A8, *S. cerevisiae*, pura. (B) Fermentación de la especie A30, *S. uvarum*, pura. (C) Fermentación de la especie A32, *S. eubayanus*, pura. (D) Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* + *S. uvarum* tras 24h a 20°C. (E) Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* + *S. eubayanus* tras 24h a 20°C.

## COMPUESTOS MINORITARIOS DE LOS PERFILES AROMÁTICOS



**Figura 20. Compuestos minoritarios de los perfiles aromáticos (GC).** (A) Fermentación de la especie A8, *S. cerevisiae*, pura. (B) Fermentación de la especie A30, *S. uvarum*, pura. (C) Fermentación de la especie A32, *S. eubayanus*, pura. (D) Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* + *S. uvarum* tras 24h a 20°C. (E) Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* + *S. eubayanus* tras 24h a 20°C.

En primer lugar, en el caso de las fermentaciones puras (Figuras 19 y 20 A, B y C), observamos que la cepa A30 (*S. uvarum*) produce una cantidad muy superior de alcohol isoamílico y 2-feniletanol que las cepas A8 (*S. cerevisiae*) y A32 (*S. eubayanus*) de forma estadísticamente significativa. También produce cantidades significativamente más altas que las otras dos cepas de isobutanol, acetato de 2-feniletanol, ácido hexanoico y alcohol bencílico. Por otra parte, la cepa A8 produce cantidades significativamente superiores a las cepas A30 y A32 de 1-propanol. A su vez, la cepa A30 produce una cantidad ligeramente superior que la cepa A32 en este compuesto, y produce una pequeña cantidad de acetato de isoamilo, caracterizado con el descriptor “plátano” pero significativamente superior que las demás especies. En cuanto a la presencia de isobutanol, entre las cepas A8 y A32 no se encuentran diferencias significativas. En la presencia de acetato de etilo, caracterizado por el descriptor “afrutado” a concentraciones moderadas, no se aprecian diferencias significativas entre las diferentes cepas. En todas ellas se produce una cantidad relativamente alta. Esto se podría considerar un defecto, ya que a estas concentraciones el aroma del acetato de etilo se asocia con el picado acético. En este caso, esto se debe a que el mosto sintético empleado es pobre en ácidos grasos y por tanto la producción de compuestos relacionados con el picado acético aumenta, pero si empleáramos mosto de uva natural no debería suceder esto. De los demás compuestos que se muestran en el gráfico hay cantidades tan pequeñas que no llegan a apreciarse.

Dado que el 2-feniletanol está caracterizado con el descriptor “rosas” y “floral”, el acetato de isoamilo con “plátano” y “frutal” y el acetato de 2-feniletanol con “floral”, podemos decir que

el vino final producido por la cepa A30 posee estas características aromáticas positivas de forma más pronunciada que el producido por las otras dos cepas, es decir, tendrá un carácter más frutal y floral muy marcado (Alarcón Heredia, 2016; Antón et al., 2011; Catania y Avagnina, 2007c). En cuanto a los alcoholes superiores que también posee en mayor cantidad: alcohol isoamílico, isobutanol y alcohol bencílico, se caracterizan con el descriptor “alcohólico”, por tanto, el vino final también posee esta característica aromática. Por otro lado, tiene una cantidad más alta de ácido hexanoico. Se trata de uno de los principales ácidos grasos más importantes a nivel sensorial en el vino, pero aporta aromas que se asocian a “sudor”, “animales de granja” y “cabra”. Por ello, también es conocido como ácido caproico. El umbral de percepción de este compuesto se encuentra alrededor de los 3 mg/L. Dado que se ha detectado una cantidad de  $5'14 \pm 2'43$  mg/L, sí podríamos detectar este aroma negativo en el vino final fermentado por esta levadura en estas condiciones.

Los vinos finales producidos por las especies A8 y A32 serán similares, excepto porque los producidos por A8 tendrán un carácter más alcohólico debido a la cantidad de 1-propanol que produce. En cuanto a los demás compuestos no presentan diferencias significativas, por tanto, se tratará de vinos finales con cierto carácter floral y afrutado, debido al 2-feniletanol, y también algo alcohólicos, por la presencia de alcohol isoamílico, 1-propanol y butanol.

Por otro lado, en el caso de los consorcios (Figuras 19 y 20 D y E), observamos grandes diferencias significativas entre ellos y también se ven diferencias con las fermentaciones de las cepas puras. En primer lugar, observamos una gran diferencia en cuanto a la producción de 2-feniletanol, alcohol isoamílico, isobutanol y diacetilo. Podemos ver que en el consorcio A8+A30 se producen cantidades significativamente más altas de 2-feniletanol, alcohol isoamílico e isobutanol, lo cual le dará al vino final una intensidad mayor de las características “floral”, “rosas” y “alcohólico”. Otra diferencia muy importante que observamos es que en el consorcio A8+A32 se produce una cantidad importante de diacetilo, compuesto que no hemos detectado ni en las fermentaciones puras ni en el consorcio A8+A32. Este compuesto volátil en pequeñas concentraciones aporta aromas a levadura, frutos secos y tostados, y a concentraciones más altas presenta un aroma mantecoso característico, relacionado con el carácter láctico y con la mantequilla (Catania y Avagnina, 2007a, 2007b). En este caso se encuentra en una concentración alta. En concentraciones altas puede ser entendido como un defecto, pero sería necesario realizar pruebas con paneles de catadores para ver si en este caso se trata de un defecto que conviene modular (Lallemand, 2012) o le aporta un carácter agradable y por tanto es positivo.

No obstante, en el consorcio A8+A32 también se producen cantidades altas de 2-feniletanol, que le aporta un aroma floral y a rosas muy agradable y menores cantidades de alcohol isoamílico e isobutanol, reduciendo así el carácter alcohólico que es posible que resulte excesivo en el caso del consorcio A8+A30 y por tanto se mejore así el perfil organoléptico del vino final. Además, una concentración más baja de alcohol isoamílico puede aportar notas frutales relacionadas con la banana (Loviso y Libkind, 2019), por tanto, tendrá mayor carácter afrutado. También vemos que la cantidad de 1-propanol es ligeramente más elevada.

Por otro lado, en el consorcio A8+A30 encontramos ácido hexanoico y alcohol bencílico, que en el consorcio A8+A32 no aparecen. Esto es debido a la participación de la especie A30 en la fermentación, ya que en las fermentaciones puras hemos visto que solo en el caso de la A30 aparecían. El alcohol bencílico aportará un carácter más alcohólico y el ácido hexanoico producirá los aromas típicos comentados anteriormente, descritos como “cabra”, dado que se encuentra en un valor de  $5'55$  mg/L, superior al umbral de percepción.

## 5. Discusión

### 5.1. *Screening*

En los últimos años, han aparecido múltiples técnicas y aplicaciones pioneras en el ámbito de las levaduras y la elaboración de vino, como por ejemplo la utilización de levaduras no convencionales que presentan buenas capacidades fermentativas (Jolly et al., 2014, 2006) ya sea para fermentar en condiciones en las que otras levaduras no podrían, disminuir la concentración de compuestos indeseables en los vinos finales (Viela, 2018), mejorar la calidad y las características organolépticas de los vinos (Morata et al., 2021; Canonico et al., 2019; Benito et al., 2015), aumentar la concentración de compuestos agradables o deseables desde el punto de vista de los consumidores (Morata et al., 2019; Fernández-Cruz et al., 2019), etc.

Esta búsqueda de levaduras no convencionales se puede llevar a cabo de formas diferentes, pero lo más común es aislarlas de nichos naturales. Las aisladas de entornos relacionados con la fermentación alcohólica poseen una ventaja: se habrán adaptado y podrán sobrevivir sin problemas a las condiciones estresantes que se dan en este proceso. En el caso de las levaduras aisladas de ambientes naturales, estas no estarán tan adaptadas a esas condiciones, pero debido a los nichos únicos en los que se encuentran pueden tener propiedades enzimáticas únicas que no se encuentran generalmente en los entornos relacionados con la fermentación, pero que pueden ser muy útiles a la hora de obtener características diferentes a los vinos finales (Alperstein et al., 2020; Cubillos et al., 2019).

Es por esto que en el *screening* se le quiso dar protagonismo a las cepas no comerciales, aisladas de ambientes naturales o de bodegas, no *Saccharomyces* y *Saccharomyces* no *cerevisiae*, ya que nos planteamos como objetivo encontrar un consorcio de cepas que nos permita aumentar la cantidad de melatonina en los vinos y, por tanto, estudiar si este tipo de cepas hace posible aumentar la variabilidad de la que disponemos, ya que cada ambiente es diferente y cada especie y cepa se comporta de una forma distinta. No obstante, también se ha estudiado la producción de melatonina por parte de cepas *S. cerevisiae*, ya que queremos observar el comportamiento general en cuanto a producción de melatonina de las diferentes especies y, además, queremos incluir una en nuestros consorcios para asegurarnos de que la fermentación se desarrolla correctamente y finaliza sin paradas. En el caso de esta especie, ensayos previos a este trabajo mostraron que las *S. cerevisiae* de bodega se comportan más o menos del mismo modo, por tanto, se han estudiado, pero en el momento de seleccionar cepas para el consorcio nos centramos más en las aisladas de ambientes naturales. Asimismo, se han estudiado cepas comerciales para poder hacer comparaciones, pero a la hora de hacer la selección se ha priorizado las cepas *S. cerevisiae* aisladas de otros ambientes para potenciar así esta variabilidad que queremos explotar.

El propósito del *screening* fue escoger una cepa de *S. cerevisiae* y dos cepas de *Saccharomyces* no *cerevisiae* o no *Saccharomyces* para así poder estudiar cómo se comportan dos combinaciones diferentes durante fermentaciones con diferentes condiciones. La elección de las cepas se basó en su capacidad de producir melatonina y su procedencia, ya que se decidió anteponer las especies aisladas de ambientes naturales por su mayor variabilidad. De esta forma, buscamos enriquecer el consorcio con cepas que nos aporten una mayor diversidad para conseguir así consorcios que produzcan una cantidad mayor de melatonina, pero que también produzcan una mayor diversidad de aromas que las típicas cepas comerciales de *S. cerevisiae*. No obstante, también se tuvieron en cuenta características desde el punto de vista de las condiciones y características de sus fermentaciones.

Tras el *screening*, se seleccionó como cepa *S. cerevisiae* la A8, una cepa de levadura aislada de El Sauzal, una región vitivinícola importante de Tenerife, ya que en el primer ensayo mostró la mejor producción de melatonina en medio YNB. A pesar de que generalmente en MS300 se ha visto que esta producción baja, lo que deseamos obtener es que el consorcio de ambas cepas de levadura en ese medio sea superior a la producción de cada una de las cepas por separado, por tanto, no es un problema ya que se busca una cooperación y una sinergia entre ellas. Por otro lado, a la hora de seleccionar las cepas no *cerevisiae*, finalmente las escogidas fueron las cepas A30 y A32, pertenecientes a las especies *S. uvarum* y *S. eubayanus* respectivamente, por su elevada producción de melatonina, superior a las demás cepas, tanto en mosto sintético (MS300), como en mosto sintético enriquecido con AAA (MS5X), por su procedencia ambiental que podría aportarnos propiedades interesantes y por las buenas características enológicas de la especie y su capacidad de soportar y fermentar correctamente a temperaturas inferiores a las habituales, característica siempre deseable para algunos tipos de vinos, que además de una ventaja adaptativa supone una potencial mejora de las características organolépticas del vino final.

## 5.2. Interacciones microbianas

Las características de los vinos finales están dadas por múltiples factores, desde la calidad y ubicación del viñedo, hasta las técnicas de elaboración, pasando por las levaduras que fermentan el mosto. Si nos centramos en el proceso de fermentación, más allá de los factores ambientales, químicos o de composición del mosto, las interacciones microbianas que se dan entre las diferentes especies de levadura que se encuentran en el medio son un factor muy importante (Bagheri et al., 2017). Estas interacciones determinarán la dinámica de poblaciones que se encuentran en el medio, así como la dinámica y la cinética de la fermentación, y por tanto el resultado final de esta. Los consorcios microbianos en el vino a nivel industrial son difíciles de estudiar, ya que hay una gran variedad de tipos de levadura conviviendo en las diferentes etapas de esta. No obstante, en condiciones de laboratorio controladas es posible inocular el medio a fermentar de forma que contenga solo las cepas de levadura que deseamos estudiar, inoculadas en el momento exacto, y así permitirnos evaluar la dinámica de poblaciones que se desarrolla entre esas cepas en diferentes puntos de la fermentación y el efecto que eso produce en el vino final (Vilela, 2020; Escribano-Viana et al., 2018; Cañas et al., 2015). Además, las condiciones de laboratorio nos permiten que los experimentos sean mucho más reproducibles. Para ello, empleamos mosto sintético en lugar de mosto natural, para que la composición sea exactamente igual en todos los ensayos y para poder ver mejor el efecto de las levaduras en la producción de melatonina y de aromas ya que, al no haber precursores, aromas varietales o melatonina procedente de la uva, todo lo que se cuantifica proviene del metabolismo de la levadura.

En cuanto a los consorcios de levaduras, en diferentes estudios se ha observado que, en algunos de ellos, las diferentes cepas son capaces de “colaborar” entre ellas consiguiendo características deseables de una forma más eficiente que cada una de ellas por separado, actuando de forma sinérgica (Contreras et al., 2015). Actualmente se están llevando a cabo un gran número de estudios que analizan los consorcios microbianos (García et al., 2019), ya que se ha visto que su estudio posee un gran potencial industrial. Esto se ha visto no solo en el ámbito de la enología, sino que también se está estudiando el diseño de consorcios microbianos en otros sectores, como el de los biocombustibles (Ergal et al., 2020; Jiang et al., 2020), la biotecnología industrial (Sabra et al., 2010), la producción de moléculas (Sgobba y Wendisch, 2020), la agricultura (Kong et al., 2018), etc.

En nuestro caso, el estudio de la dinámica de poblaciones en las diferentes condiciones nos ha permitido ver qué condiciones favorecen a cada una de las levaduras y en qué condiciones conseguimos que ambas cepas de levadura coexistan en el medio y participen en la fermentación para así observar el efecto producido por los consorcios. En las fermentaciones, al principio se estableció una temperatura de 28°C, pero después se repitieron los ensayos reduciéndola a 20°C. El objetivo de estas nuevas condiciones es observar las diferencias que se producen al bajar la temperatura, tanto a nivel de síntesis de melatonina como a nivel de interacciones microbianas y moleculares. Además, se ha observado que las bajas temperaturas dan una mayor ventaja a las cepas que no son *cerevisiae* frente a las *S. cerevisiae* (Serra et al., 2005), por tanto, esto también se hizo para reducir la dominancia de *S. cerevisiae* en la fermentación e impedir que se imponga sobre la cepa no *cerevisiae* demasiado rápido, permitiéndonos observar la cantidad de melatonina que se produce en una fermentación mixta en la que se encuentran ambas poblaciones de levaduras durante un tiempo razonable. Por otro lado, las bajas temperaturas favorecen la producción y retención de compuestos volátiles (Beltran et al., 2008, 2007; Torija et al., 2003), lo cual es también un factor beneficioso que podríamos obtener de este consorcio de levaduras a esta temperatura más baja. La intención de realizar fermentaciones a temperatura más baja se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar las cepas no *cerevisiae*, ya que se consideró crucial la criotolerancia mostrada por las cepas A30 y A32 a la hora de su selección frente a otras (López-Malo, 2013).

Además, se observó que el tiempo transcurrido entre las inoculaciones en el caso de la inoculación secuencial también es importante en las interacciones microbianas. Se vio que las inoculaciones debían realizarse con un lapso de 24h entre ellas, ya que si era superior se les daba demasiada ventaja a las cepas pertenecientes a las especies *S. uvarum* y *S. eubayanus*. Por tanto, a nivel de dinámica de poblaciones fueron más interesantes la coinoculación a 20°C y la inoculación secuencial tras 24h a 20°C, para mantener esa presencia con porcentajes importantes de cada una de las especies del consorcio.

En el caso de la coinoculación a 20°C, se pudo observar que la cepa de *S. uvarum* (A30) es desplazada rápidamente por la *S. cerevisiae*, mientras que la cepa de *S. eubayanus* (A32) consigue implantarse junto con la *S. cerevisiae* y se mantiene en el medio hasta pasada la mitad de la fermentación. De este modo, vemos que no solo las condiciones afectan la dinámica de poblaciones, sino que también influye mucho la cepa de levadura empleada y sus características. Por otro lado, en la inoculación secuencial tras 24h a 20°C, vemos que al principio domina la cepa inoculada previamente (*S. uvarum* y *S. eubayanus*), y que a partir de la mitad de la fermentación esta va dejando paso a la segunda cepa inoculada, la *S. cerevisiae*. En estos casos en los que ambas cepas de levadura han estado presentes en el medio y han participado en la fermentación durante un tiempo razonable, hemos observado que en los vinos finales se ven características de cada una de las levaduras que forman parte del consorcio, e incluso en la inoculación secuencial del consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus*, A8+A32, ha mostrado una sinergia que ha supuesto una producción de la cantidad de melatonina en el vino final superior a la de cada una de las cepas por separado. Por tanto, hemos podido ver que las interacciones entre las diferentes levaduras se producen y el efecto que estas provocan en el producto final, pudiendo en un futuro aplicar estos conocimientos a nivel de planta piloto para observar si en volúmenes más grandes estas interacciones microbianas ocurren de la misma forma.

### 5.3. Interacciones metabólicas y moleculares

Como hemos visto, algunos consorcios de levaduras son capaces de producir compuestos que cada una de las cepas por sí sola no son capaces de producir, e incluso aumentar la producción de compuestos que sí se producen de forma individual, pero en menor cantidad. Los consorcios formados por *S. cerevisiae* y cepas de levadura no convencionales como *S. no cerevisiae*, no *Saccharomyces* e híbridos naturales muestran características muy interesantes, ya que estas cepas no convencionales presentan metabolismos muy diferentes al de *S. cerevisiae*. Por tanto, aportan diversidad y complejidad en los vinos finales, ya sea en lo referente a contenido en etanol, ácidos grasos o compuestos del aroma (Bordet et al., 2020; Albertin et al., 2017).

Además, también se ha observado que las diferentes condiciones de fermentación afectan tanto a la dinámica de la fermentación, como a la dinámica de poblaciones y a la producción de compuestos de interés como la melatonina. Como resultado de las fermentaciones por parte de los consorcios, se ha observado que estas producen diferentes cantidades de melatonina dependiendo de las condiciones en las que se desarrolla la fermentación, del consorcio inoculado y también de la implantación de cada población de levaduras en el medio. De las cuatro condiciones estudiadas, las que resultaron más interesantes fueron la coinoculación a 20°C y la inoculación secuencial tras 24h a 20°C, ya que fueron las únicas condiciones en las que realmente se determinó la existencia de un consorcio entre las especies de levadura porque ambas se encontraban fermentando el medio.

En el caso del consorcio *S. cerevisiae* + *S. uvarum*, A8+A30, observamos que la inoculación secuencial tras 48h a 20°C produce una cantidad de melatonina similar a la cepa *S. uvarum* pura, sin diferencias significativas. Esto se respalda con los datos de implantación, ya que se debe a que durante toda la fermentación se impuso la cepa *S. uvarum* y la cepa *S. cerevisiae* no llegó a fermentar el medio, viéndose por tanto solo el efecto de la cepa *S. uvarum*. Algo similar ocurre en el caso de la coinoculación a 20°C, en la que la producción de melatonina es algo superior a la que produce la cepa *S. cerevisiae* pura pero muy inferior a la producida por la cepa *S. uvarum* pura. Observando los datos de implantación, vemos que en estas condiciones la mayor parte del tiempo se implantó la cepa *S. cerevisiae* y por tanto no podemos estudiar el efecto del consorcio porque la cepa *S. uvarum* no participó prácticamente en la fermentación. Por último, en la inoculación secuencial tras 24h a 20°C sí observamos una mayor presencia de la cepa *S. uvarum* a lo largo de la fermentación, que poco a poco va disminuyendo, aumentando así la proporción de la especie *S. cerevisiae*. En este caso, vemos que la producción de melatonina es superior a la de las otras dos condiciones estudiadas, pero es inferior a la producida por la cepa *S. uvarum* pura, por tanto, este consorcio con estas condiciones no nos serviría para aumentar la cantidad de melatonina en los vinos finales ya que lo que queremos es que el efecto del consorcio sea superior al de cualquiera de las cepas puras.

Por otro lado, en el consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus*, A8+A32, vemos que en la condición de inoculación secuencial tras 48h a 20°C ocurre lo mismo que con el consorcio anterior: la cepa *S. eubayanus* se impone y evita que la A8 esté presente en el medio, por tanto, la producción de melatonina es prácticamente igual a la producida por la cepa *S. eubayanus* pura. En el caso de la coinoculación, al principio de la fermentación vemos valores de implantación más cercanos, con dominancia de la cepa *S. cerevisiae* frente a la *S. eubayanus*, que hacia la mitad y el final de la fermentación pasa de dominar a imponerse. Esto se ve reflejado en el dato de producción de melatonina, ya que se produce una cantidad superior a la de la cepa *S. cerevisiae* pura pero similar a la de la cepa *S. eubayanus* pura, sin diferencias significativas. No obstante, en este consorcio sí encontramos unas condiciones que nos permiten aumentar las cantidades de melatonina en los vinos finales y superar las de las fermentaciones puras: la inoculación

secuencial tras 24h a 20°C. En este ensayo, observamos como a nivel de implantación al principio de la fermentación domina la cepa *S. eubayanus*, pero poco a poco va disminuyendo su proporción para dar paso a la A8, hasta que en el final de la fermentación se encuentran en una proporción de aproximadamente 70/30. La participación de ambas cepas de levadura en la fermentación resulta en un aumento de melatonina del vino final de  $24'87 \pm 2'19$  ng/mL de melatonina, cantidad que supera con creces la de las fermentaciones de *S. cerevisiae*, *S. uvarum* y *S. eubayanus* puras. De esta forma, con el consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus*, A8+A32, inoculado secuencialmente a 20°C con 24h de diferencia entre cepas, observamos un efecto sinérgico entre las especies de levadura que nos permite obtener el resultado deseado en cuanto a producción de melatonina. Por consiguiente, mediante la fermentación llevada a cabo por este consorcio con estas condiciones, es posible aumentar la cantidad de melatonina presente en los vinos finales, contribuyendo así a la calidad y estabilidad de los vinos finales y suponiendo una mejora desde el punto de vista de los consumidores. Esto es debido a que este metabolito se asocia con propiedades protectoras para la salud: posee un elevado poder antioxidante, capacidad moduladora del sistema inmunológico, protege frente a patologías neurodegenerativas, etc. A pesar de que las concentraciones producidas son muy pequeñas, se ha descrito que tienen un efecto fisiológico en el consumidor, medido como melatonina en sangre tras la ingesta de vino (Iriti et al., 2010).

En cuanto al perfil aromático, además de la composición del consorcio también afectan las condiciones de inoculación y fermentación. En varios estudios se ha determinado que mediante la inoculación secuencial se consiguen unas características aromáticas mejores que con la coinoculación de las cepas (Tofalo et al., 2016; Renault et al., 2015; Gobbi et al., 2013). También se ha visto que la fermentación a bajas temperaturas enriquece el aroma final del vino. Por esto, está ganando importancia el estudio de consorcios de levaduras que contengan *S. cerevisiae* y una o varias cepas *S. no cerevisiae* con características interesantes como la criotolerancia, para así crear una combinación que consiga una fermentación completa con un perfil aromático más complejo (Zilelidou, 2021). Entre estas cepas se encuentran *S. uvarum* y *S. eubayanus*, que son criotolerantes. Estas se consideran buenas fermentadoras a baja temperatura y han mostrado potencial en la producción de vinos con menos etanol y más contenido en glicerol. A baja temperatura producen vinos con mayor intensidad aromática y compuestos aromáticos muy interesantes (Oliveira et al., 2014; Gamero et al., 2013).

En nuestro caso, hemos observado diferencias en el perfil aromático de cada una de las cepas por separado, y también entre los consorcios. Se ha visto que la cepa A30 es la que más cantidad de compuestos aromáticos produce, predominando el 2-feniletanol (descriptor "rosas") y el alcohol isoamílico, que está caracterizado con el descriptor "alcohólico". También producen cantidades de alcoholes superiores en mayor concentración que las de otras cepas. Por tanto, los vinos producidos por la cepa *S. uvarum* serán más alcohólicos que los producidos por las cepas *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*. El vino con menor intensidad de esta característica será el producido por *S. eubayanus*, ya que presenta una menor cantidad de compuestos alcohólicos. Los vinos producidos por estas tres cepas tendrán un perfil floral y frutal, acompañado de toques alcohólicos que dependerán de la cepa y, en el caso de *S. uvarum*, también aparecen aromas relacionados con el descriptor "floral" (acetato de 2-feniletanol) y un defecto aromático relacionado con el descriptor "animales de granja" (ácido hexanoico).

A la hora de estudiar los consorcios coinoculados secuencialmente tras 24h a 20°C, vemos que el consorcio *S. cerevisiae* + *S. uvarum* presenta cantidades muy altas de 2-feniletanol, descriptor "rosas", pero también de diferentes alcoholes. Estas cantidades tan altas de alcoholes podrían causar un impacto negativo, no obstante, sería conveniente evaluar los vinos finales mediante un panel de catadores, no solo con GC. También aparece el ácido hexanoico, compuesto que como ya hemos mencionado, no es deseable. En el consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus*

observamos cantidades menores de 2-feniletanol, pero también se reduce en gran medida la concentración de alcoholes, pudiendo suponer una mejora del perfil aromático. Además, aparece un compuesto, el diacetilo, que en concentraciones moderadas es agradable. En este caso se encuentra en concentraciones altas y podría resultar un defecto, pero igual que en el consorcio anterior, se deberían realizar más pruebas con paneles de catadores para determinar el perfil aromático de forma más fiable y teniendo en cuenta el punto de vista de los consumidores.

No es posible determinar qué consorcio aporta un mejor perfil aromático sin realizar más pruebas. Sin embargo, sí es posible determinar que existen diferencias entre el perfil aromático de las fermentaciones realizadas por cepas puras y los consorcios, y que el consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus* podría tener una cierta complejidad aromática superior al consorcio *S. cerevisiae* + *S. uvarum* y a las fermentaciones puras, ya que aparece un compuesto aromático nuevo que en las otras condiciones no se detecta. Tal como suponía nuestra hipótesis de partida, el resultado de los aromas fermentativos de los consorcios no se puede entender como una mera suma de los compuestos de las fermentaciones individuales, lo que demuestra cierta colaboración metabólica entre las cepas, aumentando la producción de algunos aromas, como es el caso del diacetilo, que prácticamente no aparece en las fermentaciones puras, pero si presenta una concentración muy significativa en el consorcio de la cepa A8 + A32.

#### **5.4. Futuros enfoques**

El estudio de estos consorcios, de su producción de melatonina y de las diferentes interacciones entre ellos, nos permite definir candidatos potenciales para un posterior desarrollo de consorcios aptos para desarrollar fermentaciones a nivel industrial. El objetivo de estos es obtener vinos a nivel de producción en bodega con mejor calidad y estabilidad, así como con una mayor cantidad de moléculas bioactivas como la melatonina, que aportan propiedades saludables a estos y hacen el producto más atractivo desde el punto de vista del consumidor. Pero, además, el estudio también sirve para demostrar cómo el uso de más de una cepa de levaduras puede resultar en vinos con una mayor complejidad aromática que los producidos con una sola cepa de levadura, la mayoría de ellas de la misma especie y con características muy parecidas. Por otro lado, este estudio también es interesante a la hora de descubrir especies de levadura no convencionales que sean capaces de producir cantidades de melatonina superiores a las cepas ya conocidas, y posteriormente estudiar qué genes son los responsables de esta producción. Esto nos permitiría, mediante ingeniería genética, mejorar estos genes para aumentar esta producción e introducirlos en otras cepas de levadura que nos aporten otras características interesantes en los vinos. Asimismo, también sería posible desarrollar cepas superproductoras de melatonina para poder utilizar este compuesto posteriormente en otros productos como compuesto beneficioso para la salud.

## 6. Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos de este trabajo son:

1. La producción de melatonina muestra diferencias significativas en cada una de las fermentaciones puras, por tanto, cada especie y cepa de levadura presenta una capacidad diferente de sintetizar melatonina fermentando el mismo medio.
2. Las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, por lo general, son mejores productoras de melatonina que las cepas no *Saccharomyces* y *Saccharomyces no cerevisiae*.
3. El consorcio *S. cerevisiae* + *S. eubayanus* inoculado secuencialmente en mosto sintético con 24h de diferencia entre las inoculaciones y a 20°C de temperatura es capaz de producir cantidades más altas de melatonina que cada una de las cepas que lo forman por separado y que el consorcio *S. cerevisiae* + *S. uvarum* en las mismas condiciones.
4. Las diferentes condiciones en las que se llevan a cabo las fermentaciones suponen cambios significativos en cuanto a interacciones metabólicas, microbianas y moleculares.
5. Los perfiles aromáticos de ambos consorcios se caracterizan por notas frutales, florales y alcohólicas, con diferencias significativas entre ellos, por lo que serían necesarias en un futuro pruebas sensoriales con paneles de catadores.

## BIBLIOGRAFÍA

Alarcón Heredia, R. (2016). *Caracterización aromática de vinos de Fondillón de la DO Alicante* (Universitat Politècnica de València).

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., & Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3187-3195.

Albertin, W., Zimmer, A., Miot-Sertier, C., Bernard, M., Coulon, J., Moine, V., ... & Masneuf-Pomarede, I. (2017). Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(20), 7603-7620.

Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarede, I., ... & Sampaio, J. P. (2014). A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature communications*, 5(1), 1-12.

Alperstein, L., Gardner, J. M., Sundstrom, J. F., Sumbly, K. M., & Jiranek, V. (2020). Yeast bioprospecting versus synthetic biology—which is better for innovative beverage fermentation? *Applied microbiology and biotechnology*, 104(5), 1939-1953.

Alsammar, H., & Delneri, D. (2020). An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS yeast research*, 20(3).

Antón, M. J., Suárez, B., & Picinelli, A. (2011). *La naturaleza química del aroma de la sidra* (N. 10.pp. 3338). Tecnología Agroalimentaria. Boletín Informativo del SERIDA.

Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Frontiers in microbiology*, 8, 1988.

Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International journal of food microbiology*, 121(2), 169-177.

Beltran, G., Rozes, N., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2007). Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 809-815.

Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., ... & Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707-717.

Bennett, R. J., & Turgeon, B. G. (2016). Fungal sex: the Ascomycota. *Microbiology spectrum*, 4(5), 4-5.

Bing, J., Han, P. J., Liu, W. Q., Wang, Q. M., & Bai, F. Y. (2014). Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Current biology*, 24(10), R380-R381.

Bisquert, R., Planells-Cárcel, A., Valera-García, E., Guillamón, J. M., & Muñoz-Calvo, S. (2022). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for hydroxytyrosol overproduction directly from glucose. *Microbial Biotechnology*, 15(5), 1499-1510.

Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., & Guillamón, J. M. (2018). Protective role of intracellular melatonin against oxidative stress and UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 318.

Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast–yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms*, 8(4), 600.

Borneman, A. R., & Pretorius, I. S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics*, 199(2), 281-291.

Boynton, P. J., & Greig, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, 31(12), 449-462.

- Canonico, L., Solomon, M., Comitini, F., Ciani, M., & Varela, C. (2019). Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. *Food microbiology*, *84*, 103247.
- Cañas, P. M. I., Romero, E. G., Pérez-Martín, F., Seseña, S., & Palop, M. L. (2015). Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Science and Technology International*, *21*(3), 203-212.
- Catania, C., & Avagnina, S. (2007a). *Implicancias organolépticas de la fermentación maloláctica*.
- Catania, C., & Avagnina, S. (2007b). *Los defectos del vino*.
- Catania, C., & Avagnina, S. (2007c). *Los aromas responsables de la tipicidad y de la vinosidad*.
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(4), 1885-1895.
- Cubillos, F. A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., & Nikulin, J. (2019). Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*, *36*(6), 383-398.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?. *FEMS yeast research*, *14*(6), 826-832.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J. L., & Le Jeune, C. (2004). Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(6), 1140-1148.
- Díaz-Gálvez, Irina & Gutiérrez Gamboa, Gastón. (2020). Rol del nitrógeno en la fermentación alcohólica y su manejo.
- Echeverrigaray, S., Randon, M., Da Silva, K., Zacaria, J., & Delamare, A. P. L. (2013). Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(6), 1019-1027.
- Ergal, Í., Bochmann, G., Fuchs, W., Simon, K., & Rittmann, M. R. (2022). Design and engineering of artificial microbial consortia for biohydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, *73*, 74-80.
- Eizaguirre, J. I., Peris, D., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., De Los Ríos, P., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2018). Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environmental microbiology*, *20*(10), 3732-3743.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., ... & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, *112*, 17-24.
- Fernandez-Cruz, E., González, B., Muñiz-Calvo, S., Morcillo-Parra, M. Á., Bisquert, R., Troncoso, A. M., ... & Guillamón, J. M. (2019). Intracellular biosynthesis of melatonin and other indolic compounds in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts. *European Food Research and Technology*, *245*(8), 1553-1560.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., Garcia-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, *130*(4), 797-813.
- Flores, M. G., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R. J., & Lopes, C. A. (2017). Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *International journal of food microbiology*, *249*, 9-17.
- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., & Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(5), 1405-1414.
- García-Ríos, E., & Guillamón, J. M. (2019). Mechanisms of yeast adaptation to wine fermentations. *Yeasts in Biotechnology and Human Health*, 37-59.

- García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, *119*, 207-220.
- García, V., Vázquez, H., Fonseca, F., Manzanares, P., Viana, F., Martínez, C., & Ganga, M. A. (2010). Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Rev. Argent. Microbiol*, *42*, 226-229.
- Gayevskiy, V., & Goddard, M. R. (2016). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environmental microbiology*, *18*(4), 1137-1147.
- G.H. Fleet (1993). The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification G.H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 1-27
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food microbiology*, *33*(2), 271-281.
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C., & Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food microbiology*, *83*, 71-85.
- Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., & Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental microbiology*, *12*(1), 63-73.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546-567.
- González, S. S., Barrio, E., & Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Applied and environmental microbiology*, *74*(8), 2314-2320.
- González, S. S., Gallo, L., Climent, M. D., Barrio, E., & Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International journal of food microbiology*, *116*(1), 11-18.
- González, S. S., Barrio, E., Gafner, J., & Querol, A. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, *6*(8), 1221-1234.
- Guerrero, J. M., & Reiter, R. J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry*, *2*(2), 167-179.
- Guillamón, J. M., & Barrio, E. (2017). Genetic polymorphism in wine yeasts: mechanisms and methods for its detection. *Frontiers in microbiology*, *8*, 806.
- Gutiérrez Linares, A. (2013). Análisis del metabolismo nitrogenado durante la fermentación alcohólica en levaduras vínicas (Nitrogen metabolism in wine yeast during alcoholic fermentation: effect on growth, fermentation activity and aroma production) Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València.
- Herrero, A. N. (2012). Seguimiento de la melatonina durante la elaboración de vinos tintos y blancos.
- Hittinger, C. T. (2013). *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. *Trends in Genetics*, *29*(5), 309-317.
- Iriti, M., Varoni, E. M., & Vitalini, S. (2010). Melatonin in traditional Mediterranean diets. *Journal of pineal research*, *49*(2), 101-105.
- James, S. A., Cai, J., Roberts, I. N., & Collins, M. D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *47*(2), 453-460.
- Jiang, Y., Dong, W., Xin, F., & Jiang, M. (2020). Designing synthetic microbial consortia for biofuel production. *Trends in biotechnology*, *38*(8), 828-831.
- Jiao, J., Xia, Y., Yang, M., Zheng, J., Liu, Y., & Cao, Z. (2022). Differences in grape-surface yeast populations significantly influence the melatonin level of wine in spontaneous fermentation. *LWT*, 113568.

- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast research*, *14*(2), 215-237.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS one*, *6*(2), e16015.
- Karbownik, M., Lewinski, A., & Reiter, R. J. (2001). Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *33*(8), 735-753.
- Knight, S., & Goddard, M. R. (2015). Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. *The ISME journal*, *9*(2), 361-370.
- Kong, Z., Hart, M., & Liu, H. (2018). Paving the way from the lab to the field: using synthetic microbial consortia to produce high-quality crops. *Frontiers in plant science*, *9*, 1467.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS yeast research*, *3*(4), 417-432.
- Lallemand. (2012). *Esculpir el perfil aromático de los vinos mediante el manejo del diacetilo*.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., ... & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(35), 14539-14544.
- Liti, G., Barton, D. B., & Louis, E. J. (2006). Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, *174*(2), 839-850.
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tschek, G., Leitner, G., Querol, A., ... & Tiefenbrunner, W. (2007). Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research*, *7*(6), 953-965.
- Lopez-Malo, M. (2013). *Metabolic and molecular adaptation of wine yeasts at low temperature fermentation: strategies for their genetic improvement* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
- Lopez-Malo, M., Querol, A., & Guillamon, J. M. (2013). Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS one*, *8*(3), e60135.
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista argentina de microbiología*, *51*(4), 386-397.
- Maclean, C. J., & Greig, D. (2008). Prezygotic reproductive isolation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 1-8.
- Malfeito-Ferreira, M. (2019). Spoilage yeasts in red wines. In *Red wine technology* (pp. 219-235). Academic Press.
- Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014). Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Research International*, *2014*.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., & Dubourdieu, D. (2010). Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International journal of food microbiology*, *139*(1-2), 79-86.
- Morales, L., & Dujon, B. (2012). Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(4), 721-739.

- Morata, A., Loira, I., González, C., & Escott, C. (2021). Non-*Saccharomyces* as biotools to control the production of off-flavors in wines. *Molecules*, 26(15), 4571.
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine freshness. A review. *Biomolecules*, 10(1), 34.
- Morcillo-Parra, M. Á., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2020). Effect of several nutrients and environmental conditions on intracellular melatonin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 8(6), 853.
- Morcillo-Parra, M. Á., Valera, M. J., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2019). Glycolytic proteins interact with intracellular melatonin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 2424.
- Morgan, S. C., Haggerty, J. J., Jiranek, V., & Durall, D. M. (2020). Competition between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in controlled Chardonnay wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 71(3), 198-207.
- Mortimer, R. K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome research*, 10(4), 403-409.
- Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS yeast research*, 15(3), fov009.
- Muñiz Calvo, S. (2021). Biochemical and molecular basis involved in the synthesis of melatonin and other derivatives of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Muñiz-Calvo, S., Bisquert, R., Fernández-Cruz, E., García-Parrilla, M. C., & Guillamón, J. M. (2019). Deciphering the melatonin metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by the bioconversion of related metabolites. *Journal of Pineal Research*, 66(3), e12554.
- Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H., Michaels, C. J., Gini, B., Nueno-Palop, C., ... & Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(6), 2046.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Antunovics, Z., & Sipiczki, M. (2002). *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 727-730.
- Naumov, G. I., Masneuf, I., Naumova, E. S., Aigle, M., & Dubourdieu, D. (2000). Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Research in Microbiology*, 151(8), 683-691.
- Nogués, M. R., Giral, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez-Martos, V., Rodríguez, E., ... & Mallol, J. (2006). Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 142-149.
- Oliveira, B. M., Barrio, E., Querol, A., & Perez-Torrado, R. (2014). Enhanced enzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *PLoS one*, 9(1), e87290.
- Origone, A. C., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Querol, A., & Lopes, C. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast*, 35(1), 157-171.
- Origone, A. C., del Monaco, S. M., Ávila, J. R., Gonzalez Flores, M., Rodríguez, M. E., & Lopes, C. A. (2017). Tolerance to winemaking stress conditions of Patagonian strains of *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum*. *Journal of applied microbiology*, 123(2), 450-463.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Parpinello, G. P., Ricci, A., Folegatti, B., Patrignani, F., Lanciotti, R., & Versari, A. (2020). Unraveling the potential of cryotolerant *Saccharomyces eubayanus* in Chardonnay white wine production. *LWT*, 134, 110183.
- Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Querol, A., & Barrio, E. (2014). On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation. *PLoS one*, 9(4), e93729.

- Pérez-Torrado, R., Barrio, E., & Querol, A. (2018). Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Critical reviews in food science and nutrition*, *58*(11), 1780-1790.
- Peris, D., Pérez-Torrado, R., Hittinger, C. T., Barrio, E., & Querol, A. (2018). On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast*, *35*(1), 51-69.
- Peris, D., Pérez-Través, L., Belloch, C., & Querol, A. (2016). Enological characterization of Spanish *Saccharomyces kudriavzevii* strains, one of the closest relatives to parental strains of winemaking and brewing *Saccharomyces cerevisiae* × *S. kudriavzevii* hybrids. *Food microbiology*, *53*, 31-40.
- Peris Navarro, D., Sylvester, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J. P., Alexander, W. G., & Hittinger, C. T. (2014). Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Molecular Ecology*, *2014*, vol. 23, num. 8, p. 2031-2045.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, *16*(8), 675-729.
- Portugal, C., Pinto, L., Ribeiro, M., Tenorio, C., Igrejas, G., & Ruiz-Larrea, F. (2015). Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii*. *International Journal of Food Microbiology*, *210*, 113-120.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H. V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., & Zambonelli, C. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, *192*(2), 191-196.
- Sabra, W., Dietz, D., Tjahjajari, D., & Zeng, A. P. (2010). Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, *10*(5), 407-421.
- Sgobba, E., & Wendisch, V. F. (2020). Synthetic microbial consortia for small molecule production. *Current opinion in biotechnology*, *62*, 72-79.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *International journal of food microbiology*, *205*, 41-46.
- Su, Y., Origone, A. C., Rodríguez, M. E., Querol, A., Guillamón, J. M., & Lopes, C. A. (2019). Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *International journal of food microbiology*, *291*, 111-120.
- Querol, A., Pérez-Torrado, R., Alonso-del-Real, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B. M., & Barrio, E. (2018). New trends in the uses of yeasts in oenology. *Advances in food and nutrition research*, *85*, 177-210.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J. E., Pulvirenti, A., & Giudici, P. (1999). *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, *177*(1), 177-185.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Maldonado, M. D. (2005). Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *Journal of pineal research*, *39*(2), 215-216.
- Reiter, R. J. (2003). Melatonin: clinical relevance. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, *17*(2), 273-285.
- Rementeria, A., Rodriguez, J. A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J. R., Hernando, F. L., & Sevilla, M. J. (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 201-207.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J. C., & Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, *207*, 40-48.
- Reuter, M., Bell, G., & Greig, D. (2007). Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Current Biology*, *17*(3), R81-R83.
- Riou, C., Nicaud, J. M., Barre, P., & Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast*, *13*(10), 903-915.

- Rodríguez, M. E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M. P., Barrio, E., & Lopes, C. A. (2014). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS yeast research*, *14*(6), 948-965.
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011a). Melatonin: a new bioactive compound in wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(4-5), 603-608.
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011b). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, *126*(4), 1608-1613.
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. D. C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of pineal research*, *53*(3), 219-224.
- Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *60*(7), 1407-1426.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2011a). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food microbiology*, *28*(6), 1155-1161.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A., & Barrio, E. (2011b). Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and environmental microbiology*, *77*(7), 2292-2302.
- Sampaio, J. P. (2018). Microbe profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. *Microbiology*, *164*(9), 1069.
- Sampaio, J. P., & Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and environmental microbiology*, *74*(7), 2144-2152.
- Serra, A., Strehaiano, P., & Taillandier, P. (2005). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International journal of food microbiology*, *104*(3), 257-265.
- Sawers, R. G., & Clark, D. P. (2004). Fermentative pyruvate and acetyl-coenzyme A metabolism. *EcoSal plus*, *1*(1).
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., & Antunovics, Z. (2001). Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek*, *79*(1), 97-105.
- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S. R., Maestroni, G. J. M., Esquifino, A. I., Hardeland, R., & Cardinali, D. P. (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity research*, *7*(4), 293-318.
- Stribny, J., Querol, A., & Pérez-Torrado, R. (2016). Differences in enzymatic properties of the *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* alcohol acetyltransferases and their impact on aroma-active compounds production. *Frontiers in microbiology*, *7*, 897.
- Sunyer-Figueres, M., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2021). Protective effects of melatonin on *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Antioxidants*, *10*(11), 1735.
- Tofalo, R., Patrignani, F., Lanciotti, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Di Gianvito, P., ... & Suzzi, G. (2016). Aroma profile of Montepulciano d'Abruzzo wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 610.
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, *80*(1), 47-53.
- Toro, M. E., & Vazquez, F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(4), 351-358.

Torriani, S., Zapparoli, G., & Suzzi, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75(3), 207-215.

Valera García, E. (2021). Construcción de cepas sobreproductoras de serotonina y melatonina.

Vázquez, J., González, B., Sempere, V., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2017). Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1066.

Vigentini, I., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2019). Genetic improvement of wine yeasts. In *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 315-342). Springer, New York, NY.

Vilela, A. (2020). Modulating wine pleasantness throughout wine-yeast co-inoculation or sequential inoculation. *Fermentation*, 6(1), 22.

Vilela, A. (2018). *Lachancea thermotolerans*, the non-*Saccharomyces* yeast that reduces the volatile acidity of wines. *Fermentation*, 4(3), 56.

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.

Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., & Gírio, F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 376-384.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 3-26). Springer, New York, NY.

Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding wine through yeast interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620.

## ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Medio YPD (Yeast peptone dextrose)	
Glucosa	20 g/L
Peptona bacteriológica	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Agar (para medio sólido)	16 g/L

Medio YNB-80	
Glucosa	80 g/L
Difco Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos ni sulfato de amonio)	1'7 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0'57 g/L
L-triptófano	2'19 g/L

Medio SC (Sintético complete definido)	
Glucosa	20 g/L
Difco Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos ni sulfato de amonio)	1'7 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L
Kaiser complete SC drop-out (Formedium)*	2 g/L
Agar (para medio sólido)	16 g/L

\* Nota: para elaborar medios para completar auxotrofías, use la cantidad indicada por el fabricante

Medio LB (Luria Bertani)	
Triptona	20 g/L
Difco Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos ni sulfato de amonio)	1'7 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (para medio sólido)	16 g/L

Mosto sintético (1 L)	
Glucosa	100 g/L
Fructosa	100 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0'46 g/L
Ácido málico	5 g/L
Ácido cítrico	0'5 g/L
Ácido tartárico	3 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0'75 g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0'5 g/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0'25 g/L
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0'16 g/L
NaCl	0'2 g/L
Vitaminas del stock 100X	10 mL
Oligoelementos del stock 1000X	1 mL
Aminoácidos del stock	13'09 mL (en el caso del MS5X: 7'55 mL del stock sin AAA y 50 mL del stock MS5X)
Factores de anaerobiosis del stock 1000X	1 mL

\* Nota: adaptado de Riou et al. (1997), con un contenido de nitrógeno asimilable por las levaduras de 300 mg/L, una concentración de azúcares reductores de 200 g/L y pH 3'3.

Oligoelementos stock 1000X (MS300)	
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	4 g/L
ZnSO <sub>4</sub>	4 g/L
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	1 g/L
KI	1 g/L
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0'4 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 g/L
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1 g/L
Vitaminas stock 100X (MS300)	
Mio-inositol	2 g/L
Ácido nicotínico	0'2 g/L
Panteonato de calcio	0'15 g/L
Tiamina HCl	0'025 g/L
Piridoxina HCl	0'025 g/L
Biotina	0'0003 g/L

Factores de anaerobiosis stock 1000X (MS300)	
Ergosterol	1'5 g/100 mL
Ácido oleico	0'5 g/100 mL

Stock aminoácidos	
Tirosina	1'95 g/L *
Triptófano	17'42 g/L *
Isoleucina	3'25 g/L
Ácido aspártico	4'42 g/L
Ácido glutámico	11'96 g/L
Arginina	36'79 g/L
Leucina	4'81 g/L
Treonina	7'54 g/L

Glicina	1'82 g/L
Glutamina	49'92 g/L
Alanina	14'56 g/L
Valina	4'42 g/L
Metionina	3'12 g/L
Fenilalanina	3'77 g/ L *
Serina	7'8 g/L
Histidina	3'38 g/L
Lisina	1'69 g/L
Cisteína	2'08 g/L
Prolina	59'93 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	20 g/L

\* Nota: en el MS5X, no añadir estos aminoácidos al stock. En su lugar, añadir 50mL del stock de aminoácidos MS5X. Adaptado de Rodríguez-Naranjo et al. (2012).

Stocks aminoácidos MS5X (añadir 50 mL)	
Tirosina	17'5 g/L
Triptófano	3'8 g/L
Fenilalanina	1'95 g/L

## ANEXO II. LISTADO DE CEPAS EMPLEADAS EN EL SCREENING

LEVADURAS VÍNICAS (COMERCIALES)			
Identificación	Cepa de levadura	Origen	Marca
S8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Lallemand® Uvaferm® CEG
S10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Lallemand® Uvaferm® BC
S11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Lallemand® Uvaferm® VRB
S21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Lallemand® Lalvin® Rhone2226
S71	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Etanol Red
S76	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	PE2

LEVADURAS AISLADAS DE BODEGAS			
Identificación	Cepa de levadura	Origen	Lugar de aislamiento
B1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
B28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
S42	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perú	Vino de Jerez

LEVADURAS AMBIENTALES			
Identificación	Cepa de levadura	Origen	Lugar de aislamiento
A8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tenerife, España (El Sauzal)	Ambiental entorno enológico
A11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perú	Ambiental
A16	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Croacia	Ambiental
A17	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Croacia	Ambiental
A18	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Croacia	Ambiental
A19	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Croacia	Ambiental
A20	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	Castellón, España	Quercus
A21	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	Ciudad Real, España	Quercus
A22	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	España, Ciudad Real, Agudo	Quercus
A24	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Pécs (región vitivinícola de Hungría)	Ambiental
A26	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Ciudad Real, España	Ambiental
A27	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Desconocido	Ambiental
A28	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Desconocido	Ambiental
A29	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Desconocido	Ambiental
A30	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Desconocido	Ambiental
A31	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	Desconocido	Ambiental
A32	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	Desconocido	Ambiental
S37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	México	Quercus

<b>S40</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perú	Cultivo de ágave
<b>S44</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	México	Masato
<b>S48</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Ambiental entorno enológico
<b>S49</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Ambiental entorno enológico
<b>S58</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Ambiental entorno enológico
<b>S59</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Requena, Valencia, España	Ambiental entorno enológico

<b>LEVADURAS NO SACCHAROMYCES</b>			
<b>Identificación</b>	<b>Cepa de levadura</b>	<b>Origen</b>	<b>Lugar de aislamiento</b>
<b>S50</b>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S51</b>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S52</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S53</b>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S56</b>	<i>Wicherhamiella pararugosa</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S57</b>	<i>Wicherhamiella pararugosa</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S61</b>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S63</b>	<i>Metschnikowia sp.</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S64</b>	<i>Trigonopsis cantarelli / Candida cantarelli</i>	Requena, Valencia, España	Bodega

<b>S65</b>	<i>Trigonopsis cantarelli / Candida cantarelli</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S66</b>	<i>Candida sp.</i>	Requena, Valencia, España	Bodega
<b>S67</b>	<i>Candida sp.</i>	Requena, Valencia, España	Bodega