



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOCENCIAS Y CIENCIAS  
AGROALIMENTARIAS**

**TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE CO<sub>2</sub>  
ENDÓGENO SOBRE EL PROTEOMA DE LEVADURAS VÍNICAS  
DURANTE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN LA ELABORACIÓN  
DE CAVA**

**THESIS TITLE: EFFECT OF ENDOGENOUS CO<sub>2</sub> OVERPRESSURE  
ON THE WINE YEASTS PROTEOME DURING THE SECOND  
FERMENTATION IN CAVA ELABORATION**

**DIRECTORES: JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO**

**M<sup>a</sup> TERESA GARCÍA MARTÍNEZ**

**DOCTORANDO/A: JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA**

**FECHA DE DEPÓSITO DE LA TESIS EN EL IDEP: 12/06/2020**

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	1/193



TITULO: *EFEECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE CO<sub>2</sub> ENDÓGENO SOBRE EL  
PROTEOMA DE LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA SEGUNDA  
FERMENTACION EN LA ELABORACION DE CAVA*

AUTOR: *Juan Antonio Porras Agüera*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/  
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS:**

EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE CO<sub>2</sub> ENDÓGENO SOBRE EL PROTEOMA DE LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE CAVA.

**THESIS TITLE:**

EFFECT OF ENDOGENOUS CO<sub>2</sub> OVERPRESSURE ON THE WINE YEASTS PROTEOME DURING THE SECOND FERMENTATION IN CAVA ELABORATION

**DOCTORANDO:** JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA

**INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Los doctores **JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO**, Catedrático de Universidad y **MARÍA TERESA GARCÍA MARTÍNEZ**, Profesora Contratada Doctora, ambos pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la Universidad de Córdoba (UCO).

**INFORMAN:**

Que el trabajo de investigación presentado por Don **Juan Antonio Porras Agüera**, titulado "EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE CO<sub>2</sub> ENDÓGENO SOBRE EL PROTEOMA DE LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE CAVA" ha sido realizado bajo la dirección y supervisión de ambos directores en los laboratorios del IRTA-INCAVI Vilafranca del Penedès (Barcelona), en los del Área de Microbiología de la UCO, en las instalaciones del Departamento de Agricultura de la Universidad de Sassari (Italia) y en el SCAI de la UCO, reuniendo todas las condiciones exigidas para su presentación y, posterior, defensa pública de esta Tesis Doctoral con mención Internacional y en la modalidad de compendio de publicaciones.

El trabajo presentado por D. **Juan Antonio Porras Agüera**, Graduado en Biología por la Universidad de Córdoba, se encuadra en la línea de investigación "Proteómica y Metabolómica de levaduras" de reciente implantación en el grupo de investigación "Vitenol" (<http://www.uco.es/grupos/vitenol/>) que está formado por parte del profesorado del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la UCO. Esta línea de investigación tiene como objetivo principal estudiar las relaciones de proteínas y metabolitos en condiciones enológicas, particularmente, de aquellos relacionados con la calidad organoléptica de los vinos.

El doctorando **Juan Antonio Porras Agüera** ha desarrollado, desde su incorporación al programa de doctorado Biociencias y Ciencias Agroalimentarias, una intensa actividad investigadora, cuya novedad e interés para la comunidad científica internacional está avalada por las publicaciones incorporadas a la Tesis Doctoral como

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	2/193



primer autor de tres artículos de investigación y otros dos enviados a publicar. Los trabajos presentados han sido publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports* (JCR) en las áreas especializadas de Tecnología y Ciencias de los alimentos y de Microbiología.

La revisión bibliográfica consultada y actualizada le ha proporcionado una base sólida sobre su tema de investigación y le ha permitido elaborar una introducción que consta de una parte dedicada a la elaboración de vinos espumosos, levaduras vínicas, ciencias ÓMICAS, pared celular, floculación, autofagia, apoptosis, autólisis, mitocondrias y respuesta de estrés de levaduras vínicas. Los objetivos planteados en relación a la hipótesis formulada tienen una sólida coherencia y han permitido obtener unos resultados importantes e innovadores dentro del área de los vinos espumosos. La metodología llevada a cabo ha hecho posible la consecución de estos objetivos. La investigación experimental realizada ha puesto de manifiesto la importancia del análisis de proteínas para determinar la respuesta de las células de levadura en condiciones de estrés y abre nuevas fronteras para establecer criterios de selección de levaduras en función de las condiciones fisicoquímicas en las que van a ser usadas. Las conclusiones referidas a los objetivos proponen posibles aplicaciones de interés para las industrias de elaboración de vinos espumosos.

La realización de una estancia de tres meses de duración en la Universidad de Sassari (Italia), financiada por el IDEP de la UCO, que ha sido tutorizada por la Dra. Marilena Budroni, donde ha mejorado sus conocimientos en fisiología y genética de levaduras vínicas, le ha permitido acceder a la mención de Doctorado Internacional.

Por todo lo expuesto, se considera que la investigación desarrollada y recogida en la presente Memoria reúne los requisitos de interés, originalidad, novedad y calidad exigidos para una Tesis Doctoral por la UCO, con mención de Doctorado Internacional y por compendios de artículos, y emite este informe favorable para la presentación de la Tesis Doctoral de **D. Juan Antonio Porras Agüera**.

Este trabajo se ha realizado gracias a los siguientes proyectos:

-. "XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación 2018" (MOD 4.2. SINERGIAS, Ref XXIII. PP Mod 4.2) de la Universidad de Córdoba.

-. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, y FEDER: Grant No. RTA2014-00016-C03-03.

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

Córdoba, 8 de junio de 2020

Firma de los directores:

**GARCIA MAURICIO  
JUAN CARLOS -  
30459067Y**

Firmado digitalmente por GARCIA MAURICIO JUAN CARLOS - 30459067Y  
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-30459067Y, givenName=JUAN CARLOS, sn=GARCIA MAURICIO, cn=GARCIA MAURICIO JUAN CARLOS - 30459067Y  
Fecha: 2020.06.08 21:40:18 +02'00'

**GARCIA  
MARTINEZ MARIA  
TERESA -  
30498430Q**

Firmado digitalmente por GARCIA MARTINEZ MARIA TERESA - 30498430Q  
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-30498430Q, givenName=MARIA TERESA, sn=GARCIA MARTINEZ, cn=GARCIA MARTINEZ MARIA TERESA - 30498430Q  
Fecha: 2020.06.08 21:44:56 +02'00'

Fdo.: Dr JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> TERESA GARCÍA MARTÍNEZ

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	3/193



**Informe de los artículos publicados según JCR (Journal Citation Report)**

Revista	JCR	Categoría	Clasificación	Cuartil	Nº de artículos
<i>Microorganisms</i>	4.152	Microbiology	37/134	Q2	2
<i>Food Microbiology</i>	4.155	Food Science and Technology	25/139	Q1	1

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	4/193



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, D. Juan Carlos García Mauricio y D<sup>a</sup> María Teresa García Martínez, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y por su dedicación y esfuerzo constante. A lo largo de estos años de aprendizaje, han demostrado su responsabilidad y me han mostrado su apoyo incondicional para la elaboración de este trabajo.*

*A la Universidad de Córdoba y al programa de doctorado “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”, por aceptarme como estudiante de Doctorado y por su colaboración en este trabajo de investigación.*

*A las diferentes instituciones y entidades necesarias para la financiación de los trabajos de investigación que componen esta Tesis Doctoral: Instituto de Estudios de Postgrado (IDEP) por la beca que me permitió realizar una estancia de tres meses en un centro de investigación extranjero, al XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación y al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.*

*Al D. Juan José Moreno Vigara, responsable del grupo de investigación “Vitenol” por su apoyo y responsabilidad en el devenir de este trabajo. A los profesores M<sup>a</sup> Carmen Millán y Rafa Peinado, personal técnico (M<sup>a</sup> Carmen Fernández), estudiante D. Rafael Martínez, del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología, por facilitarme los materiales necesarios para la realización de este trabajo, y por permitirme utilizarlos, proporcionándome su colaboración y apoyo en momentos de duda.*

*Mención especial a mis compañeros del Departamento de Microbiología: Jaime, Fran, Juanje, Irene, Nuria, Silvia, Minami, por todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntos durante estos años, y, sobre todo, me gustaría agradecer a M<sup>a</sup> Carmen, compañera en esta nueva etapa para ambos, en la que hemos aprendido mucho con nuestro apoyo mutuo. Todos me habéis apoyado en esta dura etapa, de la cual me llevo grandes amistades.*

*Al “Dipartimento di Agraria” de la Universidad de Sassari (Italia) y en especial a la Dra. Marilena Budroni por su excelente acogida y dedicación, y por brindarme desde el*

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	5/193



*primer momento su apoyo tanto a nivel profesional como personal. También me gustaría agradecer a los Dres. Giacomo Zara, Severino Zara e Ilaria Mannazzu, y a los miembros del Departamento: Chiara, Angella, Francesco, Gavino, Nadine y Lea por su colaboración y por prestarme su ayuda en todo momento durante mi estancia.*

*Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a mis padres, hermano, tíos, a mi pareja, y familia en general por darme su apoyo en los momentos más complicados, por estar siempre ahí cuando lo necesitaba, y animarme en todo momento a seguir y terminar.*

*A todos los que me han acompañado y ayudado durante esta etapa ¡MUCHAS GRACIAS!*

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	6/193



## ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Levaduras vínicas .....	5
1.1.1 Levaduras de vino espumoso.....	7
1.1.2 Levaduras de flor .....	12
1.2 Las ciencias ómicas del vino .....	14
1.2.1 Proteómica .....	15
1.2.2 Metabolómica .....	19
1.3 Pared celular de levadura .....	21
1.3.1 Composición y organización molecular .....	22
1.3.2 Integridad de la pared celular .....	25
1.4 Floculación.....	28
1.4.1 Genes <i>FLO</i> .....	28
1.4.2 Factores medioambientales que afectan a la floculación.....	29
1.5 Autofagia .....	30
1.5.1 Inducción de la autofagia.....	31
1.5.2 Selección y empaquetado del cargo.....	32
1.5.3 Nucleación vesicular.....	32
1.5.4 Formación y expansión del autofagosoma .....	33
1.5.5 Acoplamiento y fusión vesicular .....	33
1.5.6 Degradación vesicular y transporte al citoplasma .....	34
1.5.7 Reciclaje .....	34
1.5.8 Mitofagia .....	36
1.6 Apoptosis .....	36
1.6.1 Inducción de la apoptosis .....	37
1.6.2 Regulación de la apoptosis .....	40
1.7 Autolisis .....	43
1.7.1 Cambios morfológicos.....	44
1.7.2 Cambios bioquímicos .....	45
1.8 Mitocondria.....	48
1.8.1 Ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos .....	49
1.8.2 Fosforilación oxidativa.....	50
1.8.3 Transporte e importe de proteínas .....	51

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	7/193



1.8.4	Metabolismo de especies reactivas de oxígeno .....	53
1.8.5	Metabolismo de aminoácidos .....	53
1.8.6	Metabolismo de lípidos .....	54
1.8.7	Biosíntesis del cluster Fe/S y de hemo .....	55
1.8.8	Fragmentación mitocondrial y muerte celular programada.....	56
1.9	Respuesta a estrés .....	58
1.9.1	Estrés osmótico.....	59
1.9.2	Estrés oxidativo .....	60
1.9.3	Estrés por etanol .....	61
1.9.4	Estrés por falta de nutrientes .....	62
1.9.5	Estrés por temperatura .....	64
1.9.6	Estrés por sobrepresión de CO <sub>2</sub> .....	65
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
2.1	Hipótesis de partida .....	67
2.2	Objetivos.....	67
2.2.1	Objetivo general .....	67
2.2.2	Objetivos específicos.....	67
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	70
3.1	Microorganismos y condiciones experimentales .....	70
3.1.1	Cepas de levadura.....	70
3.1.2	Medios de cultivo y condiciones de fermentación .....	70
3.2	Análisis proteómico .....	72
3.2.1	Muestreo .....	72
3.2.2	Extracción de proteínas .....	72
3.2.3	Identificación y cuantificación de proteínas .....	74
3.3	Viabilidad celular.....	76
3.4	Análisis de parámetros generales del vino.....	77
3.5	Parámetros de confianza y estadística .....	79
3.6	Estudio de la actividad killer de la toxina <i>Kpkt</i> .....	81
3.6.1	Extracción de la toxina nativa en <i>Tetrapisispora phaffii</i> .....	81
3.6.2	Extracción de la toxina recombinante en <i>Pichia pastoris</i> .....	81
3.6.3	Ensayos <i>killer</i> : efectividad de la toxina nativa y recombinante .....	81
3.6.4	Eficiencia de la toxina <i>killer</i> en la autólisis.....	82
3.7	Análisis de esporas y tétradas .....	83
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	8/193



4.1	Identificación y comparación de las proteínas relacionadas con la pared celular, floculación, adhesión celular y formación de biofilm durante la segunda fermentación en botella en dos cepas vínicas. ....	85
4.2	Descripción y estudio de las proteínas relacionadas con la autofagia, apoptosis y autólisis de levaduras vínicas que podrían mejorar la calidad del cava.....	87
4.2.1	Proteínas relacionadas con la autofagia durante la segunda fermentación en botella. ....	87
4.2.2	Proteínas relacionadas con los procesos de apoptosis y autólisis durante la segunda fermentación en botella. ....	90
4.2.3	Aceleración de la autólisis de levaduras durante la segunda fermentación en botella. ....	92
4.3	Estudio de la importancia de orgánulos celulares como la mitocondria en la segunda fermentación en botella.....	98
4.4	Comparación de las proteínas de estrés de levaduras bajo presión de CO <sub>2</sub> con proteínas de estrés sin presión. ....	100
5.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....	102
6.	REFERENCIAS .....	108

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	9/193



## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características más relevantes para la selección de cepas de levaduras vínicas (OIV, 2012). .....	5
<b>Figura 2.</b> Proceso de elaboración de vino espumoso siguiendo el método tradicional (“Champenoise”). Modificado por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Torresi et al. (2011). .....	8
<b>Figura 3.</b> Botellas de Cava en rima (al fondo) y en pupitre (al frente). .....	10
<b>Figura 4.</b> Velo de flor formado en la superficie de un vino fino de la DOP Montilla-Moriles. ....	13
<b>Figura 5.</b> Niveles de información biológica que afectan al proceso de elaboración de vino. ....	19
<b>Figura 6.</b> Estructura y composición molecular de la pared celular de levadura. ....	22
<b>Figura 7.</b> Vía de integridad de la pared celular (CWI) en <i>S. cerevisiae</i> . <i>PHS</i> (PHytoSphingosine); <i>PI4,5P<sub>2</sub></i> (PhosphatidyInositol-4,5-biPhosphate); <i>PH</i> ( <i>Pleckstrin Homology</i> ); <i>GS</i> ( <i>Glucan Synthase</i> ); <i>MP</i> (Membrana Plasmática); <i>GEF</i> ( <i>Guanosine nucleotide Exchange Factor</i> ); <i>MAPK</i> ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ). Modificada por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Levin (2005). .....	27
<b>Figura 8.</b> Esquema resumen de los eventos más importantes que tienen lugar durante el proceso de autofagia. Las proteínas de color azul y rojo se requieren específicamente para la autofagia selectiva (vía <i>Cvt</i> ) y autofagia no selectiva, respectivamente. Aquellas de color verde representan proteínas que participan en ambos procesos. <i>PAS</i> ( <i>Pre-Autophagosomal Structure</i> ); <i>Cvt</i> ( <i>cytoplasm to vacuole transport</i> ); <i>PE</i> ( <i>PhosphatidylEthanolamine</i> ); <i>HOPS</i> ( <i>HOmotypic fusion and Protein Sorting</i> ). (Modificado por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Levine y Klionsky, 2004). .....	35
<b>Figura 9.</b> Principales proteínas, vías metabólicas y procesos relacionados en el proceso de apoptosis en levadura. <i>MAPK</i> ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ); <i>NO</i> ( <i>Nitric Oxide</i> ); <i>NH<sub>3</sub></i> (amoníaco); <i>PKA</i> ( <i>Protein Kinase A</i> ); <i>ROS</i> ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ) (Carmona-Gutiérrez et al., 2010). .....	43
<b>Figura 10.</b> Cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de autólisis. Figura modificada por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Alexandre y Guilloux-Benatier (2006). .....	45

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	10/193



**Figura 11.** Esquema resumen de los procesos biológicos más relevantes que tienen lugar en la mitocondria de levadura. La ruta respiratoria incluye los complejos I-IV de la cadena de transporte electrónica y el complejo V, una ATP sintasa. Realizado por el autor de la Tesis Doctoral. .... 57

**Figura 12.** Estreses típicos durante la fermentación del mosto y las etapas post-fermentativas de la elaboración de vinos espumosos y finos. Figura modificada por el autor de la Tesis Doctoral a partir de Matallana y Aranda (2017). .... 59

**Figura 13.** Flujo de trabajo desarrollado para el análisis proteómico. Se ilustran las diferentes etapas: diseño experimental y muestreo, lisis celular, extracción de proteínas, separación de proteínas mediante *OFFGEL*, digestión de las proteínas con tripsina, análisis de los péptidos resultantes mediante espectrometría de masas, identificación y cuantificación de proteínas, mediante el empleo de algoritmos y bases de datos. .... 74

**Figura 14.** Condiciones de estudio y cepas usadas para determinar el papel de los genes *BGL2* y *LCL3* durante la segunda fermentación y autólisis. .... 83

**Figura 15.** Micromanipulador Singer MSM System. .... 84

**Figura 16.** Resultados de los ensayos *killer* llevados a cabo para la toxina recombinante procedente de *P. pastoris*. 1 y 2 (toxina clon 38), 3 (toxina clon 26, control positivo), 4 (toxina clon 17, control negativo). .... 94

**Figura 17.** Resultados de los ensayos *killer* para determinar la eficiencia de la toxina recombinante y la nativa procedente de *T. phaffii*. 1 (toxina clon 24, control negativo), 2 (toxina recombinante clon 38, control positivo), 3 y 4 (toxina nativa no precipitada y precipitada, respectivamente). .... 95

**Figura 18.** Resultados de viabilidad de las esporas de la cepa *S. cerevisiae* P29 crecidas en medio de esporulación. .... 97

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	11/193



## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características deseables de las cepas de segunda fermentación. (Torresi et al. 2011; OIV, 2012 y referencias actualizadas por el autor). .....	11
<b>Tabla 2.</b> Cepas de levadura usadas en los experimentos. ....	70
<b>Tabla 3.</b> Nombre y composición de los medios de cultivo usados en esta Tesis.....	71
<b>Tabla 4.</b> Programas y análisis estadísticos realizados en los estudios correspondientes. ....	80
<b>Tabla 5.</b> Resultados de viabilidad en vino obtenidos en cada condición de estudio (con presión y sin presión) y en cada cepa. Los datos representan los valores medios $\pm$ desviación estándar. N.d. No detectado.....	96

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	12/193



**ABREVIATURAS**

2D-PAGE	Two Dimensions Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ACP	Acyl Carrier Protein
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
Atg	Autophagy
ATP	Adenosine TriPhosphate
BAK	Bcl-2-homologous Antagonist/Killer
BAX	Bcl-2-Associated X protein
CE	Capillary Electrophoresis
CI	Chemical Ionization
CL	Cardiolipin
Cvt	Cytoplasm to vacuole targeting
CWI	Cell Wall Integrity
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DI	Direct Infusion
DOP	Denominación de Origen Protegida
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
FAS	Fatty Acid Synthesis
GAP	GTPase-Activating Protein
GAPDH	GlycerAldehyde-3-Phosphate DesHydrogenase
GC	Gas Chromatography
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GO	Gene Ontology
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GS	Glucan Synthase
GTP	Guanosine TriPhosphate
HOG	High-Osmolarity Glycerol
HOPS	Homotypic Fusion and Protein Sorting
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
HSP	Heat Shock Protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IM	Isolated Membrane
IPG	Immobilized pH Gradient
ISC	Inositol phosphoSphingolipids phospholipase C
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC	Liquid Chromatography
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT	Mating Type
MIA	Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly
MS	Mass Spectrometry
NCR	Nitrogen Catabolite Repression
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	13/193



NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PA	Phosphatidic Acid
PAM	Presequence-Associated Motor
PAS	Pre-Autophagosomal Structure
PC	Phosphatidylcholine
PCD	Programmed Cell Death
PE	PhosphatidylEthanolamine
PG	Phosphatidylglycerol
PGP	Phosphatidylglycerol-phosphate
PH	Pleckstrin Homology
PHS	PHytoSphingosine
pI	Punto isoelectrico
PI4,5P2	Phosphatidylinositol 4,5-BiPhosphate
PKA	Protein Kinase A
PS	Phosphatidylserine
PtdIns	Phosphatidylinositol
Q	Quadrupole
QIT	Quadrupole Ion Trap
ROS	Reactive Oxygen Species
SAM	Sorting and Assembly Machinery
SBF	SCB (Swi4/6 cell Cycle Box) Binding Factor
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SNARE	SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle
TIM	Translocase of the Inner Membrane
ToF	Time of Flight
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TOR	Target of rapamycin
Vps	Vacuolar protein sorting

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	14/193



## RESUMEN

Durante los últimos años, el consumo y exportación de vinos espumosos está en auge. La elaboración de vino espumoso siguiendo el método tradicional o “Champenoise” es un proceso altamente tecnificado que está formado por dos etapas fermentativas. En la primera, el mosto procedente del prensado de la uva es transformado en un vino base, al que se adiciona azúcar y se inocula con levaduras seleccionadas en botella cerrada para llevar a cabo la segunda fermentación. Una vez finaliza esta segunda etapa fermentativa, las levaduras se someten a un largo período de envejecimiento sobre lías. La etapa global que comprende la segunda fermentación y el período de crianza recibe el nombre de “prise de mousse” o toma de espuma. Además de los estreses típicos de una fermentación, como alto contenido en etanol y falta de nutrientes, durante la segunda fermentación también afectan otros factores a las levaduras, como baja temperatura y sobrepresión de CO<sub>2</sub> endógeno. Las cepas de segunda fermentación deben ser capaces de adaptarse y tolerar estos estreses para mantener la viabilidad y asegurar el éxito de esta etapa. Para ello las células disponen de mecanismos como la autofagia, proceso inducido bajo condiciones de falta de nutrientes que les permite sobrevivir mediante el reciclaje de sus propios componentes intracelulares. Una vez los compuestos tóxicos como el etanol incrementan en el vino, el papel que juegan orgánulos como la mitocondria resultaría de gran importancia para la adaptación y resistencia a estas condiciones. Sin embargo, la mayoría de las células mueren en los primeros meses de envejecimiento y su contenido intracelular es liberado al vino a través de la acción de enzimas hidrolíticas, en el proceso conocido como autólisis. Dicho proceso contribuye enormemente a la mejora de la calidad y propiedades organolépticas de los vinos espumosos. Durante la autólisis, la rotura de la pared celular de las levaduras y liberación de sus componentes es un hecho importante. En este contexto, las manoproteínas son esenciales desde el punto de vista enológico, mejorando la estabilidad de los vinos y potenciando sus propiedades organolépticas. Además de la tolerancia a los distintos estreses, la capacidad de floculación de las cepas es un criterio de selección que permite una buena separación de las levaduras durante la etapa de removido.

La respuesta de las levaduras a la sobrepresión de CO<sub>2</sub> se ha estudiado principalmente desde el punto de vista proteómico, ya que este enfoque permite analizar el comportamiento de las levaduras ante condiciones de estrés de una manera global. Aunque es un enfoque interesante, la mayoría de las investigaciones sobre la segunda

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	15/193



fermentación de los vinos espumosos se basan en enfoques transcriptómicos y metabolómicos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo aportarían nueva información y complementarían a los trabajos ya existentes.

En esta Tesis Doctoral se estudió y comparó el comportamiento del proteoma de dos cepas de levadura industriales, *Saccharomyces cerevisiae* P29 y G1, bajo condiciones de sobrepresión por CO<sub>2</sub>, típicas de la elaboración de vino espumoso. Mientras la cepa P29 es comúnmente usada en la elaboración de estos vinos y por ello está perfectamente adaptada a estas condiciones tan especiales, la cepa G1 es una levadura de velo de flor responsable de la crianza biológica de los vinos finos, no familiarizada por tanto con estas condiciones fermentativas. Aunque mostraron pautas similares en su cinética de fermentación, el comportamiento a nivel proteómico fue diferente bajo condiciones de presión. Estas diferencias vienen dadas por la plasticidad del proteoma bajo condiciones de estrés, el cual permite a las levaduras adaptarse de distinta manera, pero igual de eficiente para lograr su supervivencia. Proteínas relacionadas con mecanismos adaptativos como la autofagia, la respuesta a estrés y remodelamiento e integridad de la pared celular, se detectaron en ambas cepas bajo condiciones de presión. La respuesta proteómica de *S. cerevisiae* P29 a la sobrepresión por CO<sub>2</sub> estuvo caracterizada por un aumento de proteínas de estrés involucradas principalmente en la síntesis de glicerol, la resistencia a metabolitos tóxicos, la eliminación de ROS y la acumulación de energía. También se encontraron proteínas mitocondriales requeridas para la cadena respiratoria y la síntesis de aminoácidos ramificados asociados a la formación de compuestos aromáticos, bajo estas condiciones. Estos resultados podrían explicarse debido a la respuesta causada por la acumulación de etanol a lo largo de la segunda fermentación, más que a la sobrepresión por CO<sub>2</sub> endógeno. Por otro lado, la respuesta proteómica de la levadura de velo de flor *S. cerevisiae* G1 estuvo marcada por una alta abundancia de manoproteínas, un mayor requerimiento de proteínas responsables de la síntesis y remodelación de la pared celular, y un elevado contenido de enzimas hidrolíticas asociadas con el proceso de autólisis. Estos resultados, junto con su capacidad para flocular y tolerar altas concentraciones de etanol, convierten a la cepa G1 en una alternativa interesante para la mejora y producción de vino espumoso.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	16/193



## ABSTRACT

During the last years, the consumption and export of sparkling wines has been booming. Sparkling wine elaboration following the traditional method or “Champenoise” is a highly technical process which consists of two fermentative stages. In the first phase, the must coming from the pressing of grapes is transformed into a base wine, which is added with sugar and inoculated with selected yeasts to carry out the second fermentation in sealed bottle. Once this fermentative stage is over, yeast cells are subjected to a large aging period in contact with yeast lees. The whole process involving the second fermentation and aging is called “prise de mousse” or foam production. Apart from the typical fermentation stresses as high ethanol content and nutrient starvation, during the second fermentation, other factors as low temperature and endogenous CO<sub>2</sub> overpressure affect yeast cells. Second fermentation strains must be capable of adapting and tolerating these stresses in order to preserve cell viability and ensure the success of this stage. For this purpose, yeast cells have mechanisms such as autophagy, process induced under starvation conditions which allow them to survive via recycling of their own intracellular components. Once toxic compounds as ethanol increase in the wine, the role which play certain organelles as mitochondria would be of great importance for the adaptation and resistance to these conditions. However, most of cells die at the first months of aging and their intracellular content is released into the wine through the action of hydrolytic enzymes, in a process known as autolysis. This process contributes hugely to quality improvement and organoleptic properties of sparkling wines. During this process, the yeast cell wall breakdown and the release of its components is an important fact. In this context, cell wall mannoproteins are essential from the enological point of view, improving the wine stability and enhancing their organoleptic properties. In addition to the stress tolerance, the flocculation capacity of the yeast strains is selection criteria which allow a proper separation of yeast cells during wine clarification.

The yeast response to CO<sub>2</sub> overpressure has been studied mainly from the proteomic point of view, since this approach allow to analyze the yeast behavior under stress conditions in a global way. Even though it is an interesting approach, most of research about second fermentation of sparkling wine is based on transcriptomic and metabolomic approaches. Therefore, the results obtained in this work would generate new information and complement the existing works.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	17/193



In this Thesis the proteome behavior was studied and compared in two industrial yeast strains, *Saccharomyces cerevisiae* P29 and G1, under CO<sub>2</sub> overpressure conditions, typical of sparkling wine elaboration. Whereas P29 strain is commonly used in the elaboration of these wines and for these reason, it is perfectly adapted to these special conditions, the G1 strain is a flor yeast responsible for biological aging of sherry wines, and therefore, not familiar with these fermentative conditions. Although both strains show similar patterns in their fermentation kinetics, the behavior at proteomic level was different under pressure conditions. These differences come from the proteome plasticity under stress conditions, which allow yeast cells to adapt in a different way, but just as efficient to achieve their survival. Proteins related to adaptive mechanisms such as autophagy, stress response and cell wall remodeling and integrity, were detected in both yeast strains under pressure conditions. The proteomic response of *S. cerevisiae* P29 to CO<sub>2</sub> overpressure was characterized by an increase in stress proteins mainly involved in glycerol synthesis, resistance to toxic metabolites, ROS removing and energy accumulation. Mitochondrial proteins required for respiratory chain and branched-amino acid metabolism associated with aromatic compounds formation, were also found under these conditions. These results could be explained due to the cell response caused by ethanol accumulation along the second fermentation, more than endogenous CO<sub>2</sub> overpressure. On the other hand, the proteomic response of the flor yeast *S. cerevisiae* G1 was marked by a high abundance of mannoproteins, a high requirement of proteins responsible for cell wall synthesis and remodeling, and a high content of hydrolytic enzymes associated with autolysis process. These results, along with its capacity to flocculate and tolerate high ethanol concentrations, make G1 strain an interesting alternative for sparkling wine improvement and production.

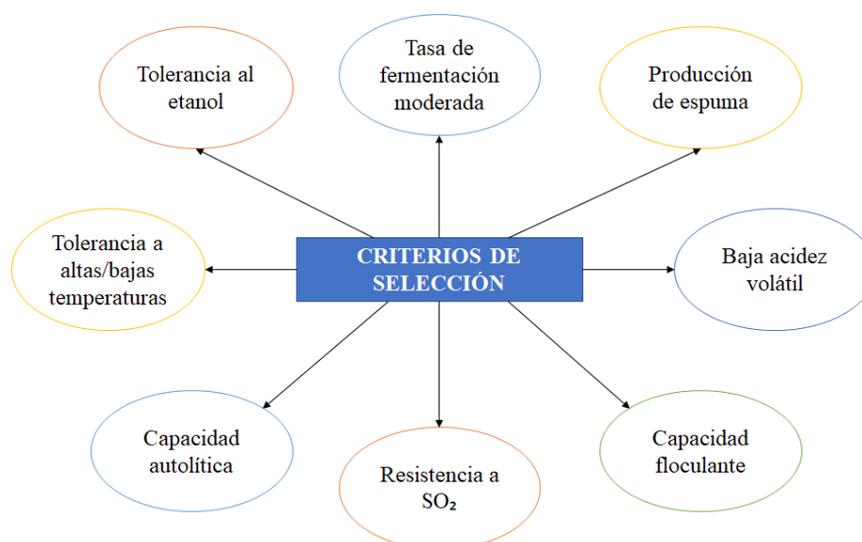
Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	18/193



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Levaduras vínicas

La microbiota de la uva, mosto y vino es muy compleja y diversa en términos de variedad de microorganismos (Köning et al., 2017). Entre las levaduras presentes, especialmente en la superficie de la uva, aquéllas pertenecientes al género *Hanseniaspora* representan el 50-75% de la población total, seguida por otros géneros como *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* o *Torulaspota*. A pesar de esta variedad de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* se ha establecido como la especie dominante en los procesos fermentativos y elaboración de vino, debido principalmente a su gran adaptabilidad en diversas condiciones medioambientales como pH bajo, alta concentración de etanol o limitación de nutrientes, además de su poderosa capacidad fermentativa (Fleet y Heard, 1993; Bauer y Pretorius, 2000), con respecto a las cepas no-*Saccharomyces*. Sin embargo, diversos estudios (Ciani y Maccarelli, 1997; Romano et al., 2003; Xufre et al., 2006; Ciani et al., 2010; Benito et al., 2019) demostraron que aunque las cepas de levadura no-*Saccharomyces* no son capaces de soportar estos tipos de estrés, siendo superadas por cepas de *S. cerevisiae* una vez los niveles de etanol en el medio alcanzan los 4-5% v/v, su crecimiento durante la fermentación vínica contribuye considerablemente a las propiedades organolépticas y la calidad del producto final (Benito et al., 2019).



**Figura 1.** Características más relevantes para la selección de cepas de levaduras vínicas (OIV, 2012).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	19/193



Desde el punto de vista genético, las cepas de levaduras vínicas son principalmente diploides, poliploides e incluso aneuploides (Codón et al., 1995). Su gran variabilidad en la capacidad de esporulación y viabilidad de spora ha sido atribuida al alto polimorfismo de sus cromosomas. Esto representa una gran ventaja para su adaptación a los cambios medioambientales y para la sobreexpresión de genes involucrados en la fermentación (Guijo et al., 1997; Pérez-Ortín y García-Martínez, 2005; Carrascosa et al., 2011). Además, las levaduras vínicas son generalmente homotáticas, es decir, son capaces de cambiar su tipo sexual ( $a$  o  $\alpha$ ), aunque también pueden ser heterotáticas, donde las células de levadura permanecen en un estado haploide con un locus MAT estable hasta que encuentran otras células con el tipo sexual opuesto (Bakalinsky y Snow, 1990). En cuanto a la morfología celular, las levaduras vínicas presentan una pared celular rígida que les confiere resistencia contra cambios en la presión osmótica y otro tipo de estreses externos. Aparte de esta estructura, las levaduras también disponen de múltiples orgánulos subcelulares típicos de células eucariotas como núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondria o vacuola. Numerosas enzimas presentes en el citoplasma juegan un papel importante en la fermentación alcohólica y metabolismo del carbono, donde la mitocondria es responsable del cambio de metabolismo que experimentan ciertas levaduras durante el proceso fermentativo (Moreno-García et al., 2014).

La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico complejo donde las levaduras juegan un papel fundamental convirtiendo los azúcares de la uva en etanol y dióxido de carbono, además de en otros productos y metabolitos secundarios más destacables como glicerol, acetato, succinato, piruvato, alcoholes superiores y ésteres, que afectan al aroma y estabilidad del vino. *S. cerevisiae* se considera como uno de los pocos tipos de levadura que son capaces de crecer bajo condiciones estrictamente anaerobias (Visser et al., 1990). En presencia de oxígeno y cierta cantidad de azúcar fermentable ( $< 100$  mg/L), la levadura crece rápidamente aumentando su biomasa, pero no produce etanol ya que a bajos niveles de azúcar el metabolismo de la glucosa es llevado a cabo mediante respiración (efecto Pasteur). Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas o cuando los niveles de azúcar son elevados ( $> 100$  mg/L), la fermentación se realiza liberando tanto etanol como  $CO_2$ , aunque el crecimiento celular en este caso es bajo y limitado. Esto es debido a que concentraciones altas de azúcar inhiben la síntesis de enzimas respiratorias y aumentan la tasa de fermentación, proceso conocido como efecto Crabtree o anti-Pasteur (De Deken, 1966; Rodrigues et al., 2006).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	20/193



Aparte del poder fermentativo, se deben considerar otros criterios adicionales para la selección de una cepa de levadura adecuada (Figura 1). Estas características han evolucionado sustancialmente (Regodon et al., 1997; Ranieri y Pretorius, 2000; Fleet, 2008) basándose sobre todo en la búsqueda de propiedades que mejoren el proceso fermentativo y la calidad del vino. Además, otros estudios (Suárez-Lepe y Morata, 2012) se han centrado en nuevos criterios de selección que potencien características como el color (mediante la formación metabólica de pigmentos, aumento de la estabilización coloidal y ausencia de actividad glucosidasa), aroma (mediante la formación de compuestos volátiles) y cuerpo (mediante la producción de polialcoholes). Aunque los criterios mostrados en la Figura 1 podrían servir para seleccionar la cepa más apropiada en términos generales, aquéllos relacionados con la temperatura, espuma, floculación o actividad autolítica, dependen del tipo de vino a elaborar. En esta Tesis Doctoral se usaron dos cepas de levaduras, una cepa comúnmente destinada a la elaboración de cava y otra responsable de la crianza biológica en vinos finos, por lo que los siguientes capítulos se centrarán en las principales características de estas levaduras y en los métodos de producción en los que intervienen.

### 1.1.1 Levaduras de vino espumoso

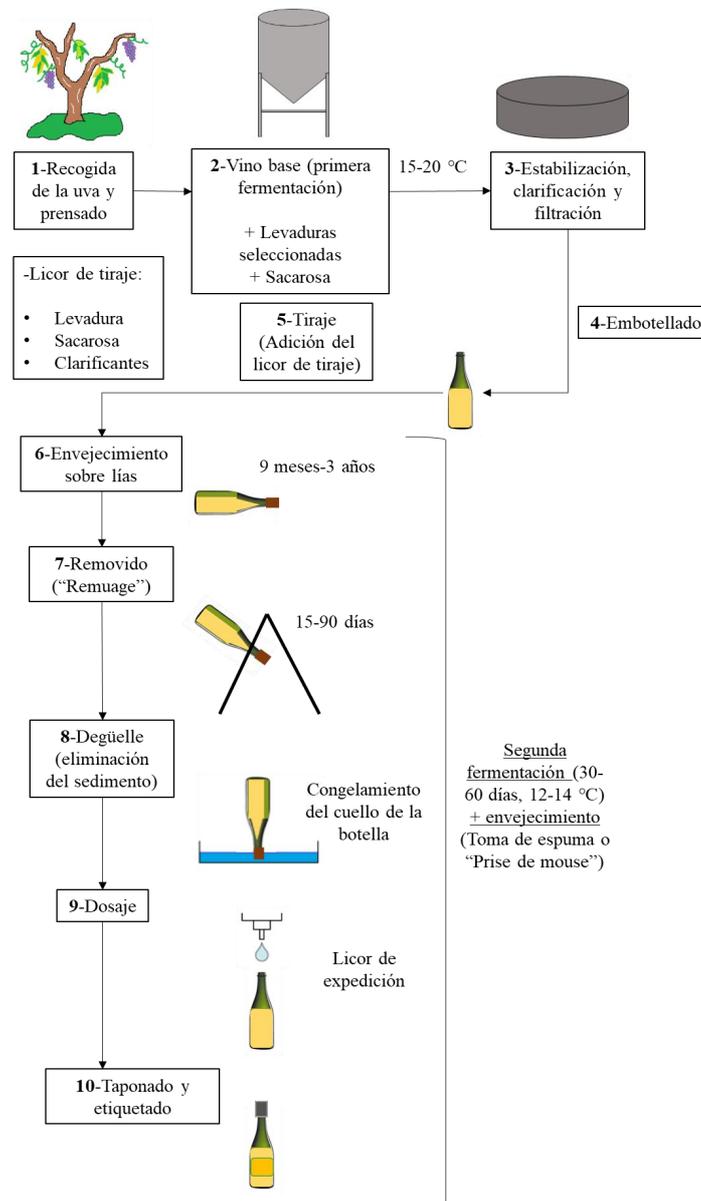
#### Proceso de elaboración de los vinos espumosos

Actualmente, la producción de vino espumoso está incrementando considerablemente a escala global y hay una tendencia a encontrar variedades de uva alternativas para producir vinos espumosos de calidad (OIV, 2020). Los vinos espumosos son vinos que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico de origen endógeno. En España, la mayoría de los vinos espumosos pertenecen a la Denominación de Origen Protegida (DOP) Cava y son elaborados siguiendo el método tradicional o “Champenoise”, donde el vino debe permanecer en contacto con las levaduras al menos 9 meses. La característica principal del método tradicional consiste en llevar a cabo una segunda fermentación y un período de envejecimiento en la misma botella que llega directamente al consumidor. Durante el año 2017, la comercialización de Cava experimentó un crecimiento del 3% respecto al año anterior, con un total de 252,5 millones de botellas expedidas. Estos datos sitúan al Cava como líder de las DOPs españolas en el mercado exterior y la primera en cuanto a cifras de exportación de vinos elaborados por el método tradicional (<https://www.revistaalimentaria.es/vernorticia.php?noticia=buenos-resultados-del-sector->

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	21/193



[del-cava](#)). La Figura 2 muestra las diferentes etapas del proceso de elaboración de vino espumoso siguiendo el método tradicional. La producción de estos vinos especiales implica dos etapas fermentativas. Durante la primera fermentación, el vino base es producido fermentando cada variedad de uva por separado en fermentadores a temperatura controlada (15-20 °C).



**Figura 2.** Proceso de elaboración de vino espumoso siguiendo el método tradicional ("Champanoise"). Modificado por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Torresi et al. (2011).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	22/193



Las uvas se prensan en diferentes etapas y a distintas presiones para obtener vinos de alta calidad. Para asegurar una correcta finalización del proceso fermentativo y evitar subproductos indeseables que puedan afectar a las propiedades del vino, generalmente se añaden al mosto levaduras seleccionadas de *S. cerevisiae*. Una vez la fermentación ha acabado, el vino base se separa del sedimento formado por las lías (mezcla de levaduras y agentes clarificantes) durante el proceso de clarificación.

El siguiente paso conlleva la adición de sulfitos, cuyos niveles deben permanecer por debajo de 15 mg/L para permitir un correcto crecimiento de la levadura durante la segunda fermentación. Después, el producto debe ser mezclado con vino base producido de otros años usando distintas variedades de uvas. La estabilización tartárica tiene lugar para prevenir la formación de bitartrato potásico en la botella, debido a las bajas temperaturas y a la concentración de etanol. Una vez estabilizado, el vino base finalmente se filtra para eliminar cristales de bitartrato y otros restos, y se lleva a cabo la segunda fermentación (Carrascosa et al., 2011).

El proceso donde tiene lugar tanto la segunda fermentación como la autólisis de las levaduras se conoce como toma de espuma o por su término en francés “prise de mousse”. Este proceso comprende los siguientes pasos: tiraje, apilado de las botellas, removido del sedimento, degüelle y dosaje. La fase de tiraje consiste en el llenado de las botellas con el vino base y el licor de tiraje. Este licor está básicamente formado de una suspensión de levaduras ( $1-1.5 \times 10^6$  células/mL) como inóculo, sacarosa (20-25 g/L) como fuente de carbono, fosfato diamónico como fuente de nitrógeno, y generalmente un agente clarificante como la bentonita (3g/100 L) para favorecer la floculación y la eliminación del sedimento. Una vez la mezcla está embotellada, estas botellas son apiladas horizontalmente, posición conocida como rima, en cámaras termostalizadas a 14-16 °C especialmente diseñadas para esta etapa, donde el vino debe estar en contacto con las lías de levadura por un largo período de envejecimiento, de al menos 9 meses en el caso de los vinos Cava (Figura 3). Durante este tiempo, el proceso de autofagia se induce como una respuesta adaptativa que permite la supervivencia celular mediante el reciclaje de los propios componentes y orgánulos celulares (Abeliovich et al., 2001). Los estudios realizados por Cebollero y Gonzalez (2006) demostraron que la autofagia ocurre durante la segunda fermentación en la producción de vinos espumosos. Este hecho fue demostrado por la presencia de autofagosomas (vesículas de doble membrana que transportan fracciones del citoplasma hacia la vacuola) dentro de la vacuola de levadura

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	23/193



y por la degradación de la proteína Ald6p (acetaldehído deshidrogenasa). Además, estos autores propusieron la manipulación genética de genes relacionados con la autofagia como un método para acelerar el envejecimiento y la autólisis en levaduras vínicas. En este proceso autolítico, diversas enzimas hidrolíticas (glucanasas, proteasas, manosidasas y nucleasas) actúan liberando los componentes celulares en el vino, hecho muy relevante desde el punto de vista de sus propiedades organolépticas (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006). Estos procesos biológicos se explicarán con más detalle en los apartados 1.5 y 1.7, respectivamente.



**Figura 3.** Botellas de Cava en rima (al fondo) y en pupitre (al frente).

Una vez se ha completado el envejecimiento sobre lías, las botellas se colocan en pupitres (Figura 3) y se giran manualmente para dirigir el sedimento, formado por las lías y sustancias adheridas, hacia el cuello de la botella durante la fase de removido. Mediante el removido en pupitre clásico, las botellas reciben el “golpe de puño” y se colocan por el cuello en los agujeros del pupitre. El removido se realiza girándolas cada 3-4 días durante un período de 1-2 meses, hasta que las botellas alcanzan la posición vertical invertida. Las máquinas actuales, giropalets, permiten manipular un mayor número de botellas de una sola vez, lo que acelera y facilita el proceso. El siguiente paso se denomina degüelle, donde se elimina el sedimento localizado en el cuello de la botella. Para ello, el cuello se sumerge en un líquido refrigerante que provoca su congelación, permitiendo la eliminación de las lías y evitando así la pérdida de gas carbónico. Durante el degüelle, se lleva a cabo la adición del licor de expedición para compensar la posible pérdida de líquido. Este licor es una mezcla de vinos y licores, específica de cada bodega, con

azúcares y sulfitos añadidos. Finalmente, la botella se cierra con un tapón de corcho y se etiqueta.

### Características deseables para la selección de cepas de vino espumoso

La selección de levaduras para la segunda fermentación en vinos espumosos debería ser considerada como un factor clave. Estas levaduras deben reunir una serie de características especiales para tolerar las condiciones típicas de la segunda fermentación (Tabla 1) (Torresi et al., 2011; Garofalo et al., 2016; Vigentini et al., 2017).

**Tabla 1.** Características deseables de las cepas de segunda fermentación. (Torresi et al. 2011; OIV, 2012 y referencias actualizadas por el autor).

Características	Referencias
Etanol (10-12% v/v), bajo pH (2.9-3.2) y tolerancia a baja temperatura (10-15 °C)	<i>Stanley et al., 2010; Ma y Liu, 2010; Borrull et al., 2015</i>
Capacidad floculante	<i>Coloretti et al., 2006; Bauer et al., 2010; Soares, 2011; Tofalo et al., 2016</i>
Fenotipo <i>killer</i>	<i>Todd et al., 2000; Velázquez et al., 2016</i>
Potenciamiento de propiedades sensoriales	<i>Suárez-Lepe y Morata, 2012</i>
Propiedades espumantes	<i>Blasco et al., 2011, Coelho et al., 2011</i>
Tolerancia al CO <sub>2</sub> (6 bares)	<i>Kemp et al., 2015</i>
Capacidad autolítica	<i>Martínez-Rodríguez et al., 2001; González et al., 2003; Cebollero et al., 2005; Núñez et al., 2005; Tabera et al., 2006; Palomero et al., 2007</i>

Las cepas de levadura se eligen por su capacidad para llevar a cabo la fermentación bajo condiciones de estrés como alto contenido en etanol, alta acidez, bajo pH y temperatura. Aparte de estos factores críticos, las levaduras tienen que soportar sobrepresión por CO<sub>2</sub> (generalmente valores de 6 bares) asociados a esta segunda fermentación (Kemp et al., 2015). En el proceso industrial, las células deben ser eliminadas antes de seguir procesando el vino. Los métodos actuales de eliminación celular, como clarificación o filtración, consumen demasiado tiempo y dinero. En este



contexto, la floculación (adhesión célula-célula) es una propiedad deseable de las cepas industriales, permitiendo la fácil separación de las células de levadura del producto final, especialmente en la producción de vino espumoso por el método tradicional (Vidgren y Londesborough, 2011). En este contexto, numerosos enfoques se han centrado en la obtención de cepas floculantes específicamente adaptadas a las condiciones típicas en la elaboración de vino espumoso (Coloretti et al., 2006; Tofalo et al., 2016). Además, otros estudios se basan en la aplicación de nuevos sistemas de inmovilización de levaduras vínicas como las denominadas biocápsulas de levaduras (Puig-Pujol et al., 2013; López de Lerma et al., 2018), propuestas como un método natural y de bajo coste que permite solventar problemas durante el proceso industrial como el removido de las lías. Otro aspecto importante a tener en cuenta para seleccionar cepas de levadura para la segunda fermentación es su capacidad autolítica. Un gran número de investigaciones se han centrado en acelerar la autólisis de diversas formas: mediante la adición de enzimas como glucanasas al vino (Palomero et al., 2009; Rodríguez-Nogales et al., 2012; Torresi et al., 2014), usando una mezcla de cepas *killer* y sensibles (Todd et al., 2000), o a través de ingeniería genética de las cepas vínicas (González et al., 2003; Cebollero et al., 2005; Tabera et al., 2006). El desarrollo de cepas con autólisis acelerada se presenta como un aspecto beneficioso ya que acortaría el período de envejecimiento, permitiendo una rápida liberación de los componentes celulares. Además, el efecto positivo de las cepas con una alta capacidad autolítica en la calidad y las propiedades espumantes de los vinos espumosos se ha puesto en evidencia por diversos autores (Martínez-Rodríguez et al., 2001; Núñez et al., 2005). En cuanto a las propiedades espumantes, las manoproteínas liberadas durante la autólisis contribuyen a su calidad ya que están involucradas en su formación y estabilización (Blasco et al., 2011). Las manoproteínas de la pared celular han atraído recientemente la atención de enólogos e investigadores del sector debido a sus numerosos beneficios desde el punto de vista de las propiedades del vino como aroma, color, sensación en boca o estabilidad tartárica (Caridi et al., 2006). González-Ramos y González, 2006 observaron que la delección de algunos genes (*GAS1*, *GPI7* o *KN4R*) podría incrementar la cantidad de manoproteínas presentes en el vino. Después, este mismo grupo de investigación propuso la construcción de cepas recombinantes con el gen *KNR4* deleccionado, para mejorar muchos aspectos relacionados con estas glicoproteínas y otros parámetros tecnológicos del vino (González-Ramos et al., 2008).

### 1.1.2 Levaduras de flor

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	26/193



Los vinos finos son elaborados siguiendo un método especial conocido como crianza biológica. Un proceso llevado a cabo en Francia, Italia, Sudáfrica, Hungría, Armenia, USA (California), el sur de Australia y España. En España al método de crianza biológica se le conoce con el nombre de “sistema de criaderas y soleras”. La crianza biológica supone la participación de un tipo de levaduras especiales llamadas levaduras de flor o de velo de flor, principalmente cepas de *S. cerevisiae*, que son capaces de crecer en la superficie del vino desarrollando un biofilm, llamado comúnmente “flor” o “velo” (Figura 4), de ahí el nombre característico de estas levaduras (Peinado y Mauricio, 2009; Alexandre, 2013; Legras et al., 2016). Diversos estudios sobre la evolución de la población de levaduras de flor durante la crianza biológica confirmaron la presencia de cuatro variedades distintas (siendo más del 95% aquellas levaduras pertenecientes a *S. cerevisiae*), incluyendo a *S. cerevisiae beticus* (75%), *montuliensis* (15%), *cheresiensis* (5%) y *rouxii* (1%) (Cordero-Bueso et al., 2018). Estos estudios también describieron diferencias según las características metabólicas de la variedad, indicando, por ejemplo, que *S. cerevisiae beticus* está presente en vinos más jóvenes debido a su rápida capacidad para formar velo, mientras otras variedades como *montuliensis* predominan en etapas más tardías, ya que toleran más altas concentraciones de acetaldehído (Martínez et al., 1997). Además, Esteve-Zarzoso et al. (2001) observaron la presencia de un patrón específico en levadura de flor (regiones ITS-1 y 2, y el gen para el ARNr 5.8S) sólo después de que los vinos fueran enriquecidos con etanol y nunca durante la fermentación alcohólica.



**Figura 4.** Velo de flor formado en la superficie de un vino fino de la DOP Montilla-Moriles.

Durante la crianza biológica, el vino contiene concentraciones elevadas de etanol y glicerol, pero no de azúcares fermentables. Estos cambios en el medio llevan a las

levaduras de flor a modificar su metabolismo, permitiéndoles utilizar otras fuentes de carbono no fermentables, como etanol y glicerol (Mauricio et al., 1997). Las reacciones catabólicas para degradar estos compuestos requieren del oxígeno que se encuentra en la superficie del vino en contacto con el aire. Por ello, las levaduras de flor desarrollan un velo o biofilm como un mecanismo de adaptación a estas condiciones, asegurándoles el acceso al oxígeno de la superficie (Alexandre et al., 2013; Legras et al., 2016). La formación de biofilm está altamente asociada al estado nutricional del vino, siendo inducida por la disminución de las fuentes de carbono fermentables, nitrógeno o la presencia de otras fuentes de carbono como glicerol o acetato de etilo (Zara et al., 2010). Además, estudios realizados por Mauricio y Ortega (1997) sugirieron que una corta aireación podría mejorar la composición aromática de los vinos ya que incrementa el consumo, por parte de las levaduras, de algunos compuestos nitrogenados como la prolina, triptófano, ácido glutámico, iones amonio, lisina y arginina.

Entre los genes que participan en la formación de biofilm, *FLO11* ha sido considerado como un gen clave en este proceso, como se confirma en numerosos estudios (Ishigami et al., 2004; Zara et al., 2005; Fidalgo et al., 2006). Se conoce que la sobreexpresión de este gen resulta en una hidrofobicidad elevada en la superficie celular, permitiendo la formación de agregados celulares que atrapan las burbujas de CO<sub>2</sub>, procedentes de la fermentación, y promoviendo la formación de biofilm (Zara et al., 2005). Aparte de los genes *FLO*, una serie de genes han sido recientemente identificados y asociados a este proceso, incluyendo a *HSP12* (Zara et al., 2002), *NRG1* (Ishigami et al., 2004), *BTN2* (Espinazo-Romeu et al., 2008), y los genes de pared celular *CCW14* y *YGPI* (Moreno-García et al., 2018).

## 1.2 Las ciencias ómicas del vino

Las tecnologías y técnicas ómicas se refieren al análisis global de macromoléculas biológicas (ADN, ARN y proteínas) y metabolitos en una célula, tejido, organismo o población, en un momento determinado o bajo ciertas condiciones. Estas nuevas metodologías han conducido a la aparición de novedosos campos de estudio: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, según el nivel de información biológica que se esté investigando (Figura 5). Consecuentemente, todas estas tecnologías proporcionan enormes cantidades de datos que necesitan ser monitorizados y simplificados mediante el

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	28/193



uso de bases de datos y análisis estadísticos. En este contexto, la comunidad científica puede verse beneficiada de la creación de bases de datos y repositorios de genes, transcritos, proteínas y metabolitos para compartir sus datos, a través de la mejora de las tecnologías ómicas y el desarrollo de nuevas estrategias (Giacometti et al., 2013). Además, debido a que ningún análisis puede cubrir toda la red biológica y las interacciones moleculares por sí solo, algunos estudios se han centrado en usar la integración de múltiples técnicas ómicas para dar una información más precisa de cualquier organismo vivo (Zhang et al., 2010), lo que se conoce como biología molecular de sistemas.

En cuanto a la ciencia del vino, la levadura *S. cerevisiae* se usa como un organismo modelo para el estudio de las relaciones existentes entre las ciencias ómicas. Por ejemplo, análisis del genoma comparativo de cepas industriales han sido realizados por muchos autores (Borneman et al., 2008; Rossouw et al., 2009; Rossouw et al., 2010). Beltran et al. (2006) llevaron a cabo la integración de un enfoque transcriptómico y otro metabólico para investigar la respuesta de las cepas de levadura a bajas temperaturas durante las fermentaciones industriales. Otros autores se han centrado en el descubrimiento de genes en levadura involucrados en la tolerancia a estreses medioambientales y a la resistencia al etanol mediante el uso de un análisis de todo el genoma (Auesukaree et al., 2009; Teixeira et al., 2009). Además, la evolución del proteoma de la levadura y su correlación con el transcriptoma durante la fermentación alcohólica ha sido desarrollado por Rossignol et al. (2008). Estos autores observaron diferencias en términos de abundancia proteica, pero esto no se correlacionó con los cambios de los transcritos, concluyendo que los ARNm son selectivamente degradados y traducidos a lo largo de la fase estacionaria.

### 1.2.1 Proteómica

Las proteínas son una parte esencial de los organismos vivos, ya que forman parte de estructuras celulares, participan como enzimas en vías metabólicas, y también actúan como reguladores de estas vías. Esta ciencia –ómica se centra en la identificación y cuantificación del conjunto de proteínas que se encuentran en una célula, organismo o tejido, en un cierto estado de crecimiento y en una condición específica. La proteómica comprende distintas técnicas basadas en la separación e identificación, aunque hay dos estrategias principales:

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	29/193



- a) Electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE, Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis): las proteínas son separadas en base a su punto isoeléctrico (pI) y masa. Esta técnica generalmente es seguida de espectrometría de masas y permite la visualización de algunas proteínas después de la separación, aunque la aplicación de varios pigmentos fluorescentes ha mejorado sustancialmente la sensibilidad de esta técnica (O'Farrel, 1975; Sonck et al., 2009).
- b) Procedimiento libre de geles: estas técnicas son capaces de detectar miles de proteínas de una sola vez, permitiendo también la identificación de proteínas con baja abundancia (Wolff et al., 2006). El término “shotgun” se refiere al estudio de las proteínas contenidas en una muestra a partir del análisis directo y rápido de la mezcla compleja de péptidos resultantes de su digestión enzimática sin necesidad de una separación previa mediante técnicas electroforéticas (Wu y MacCoss, 2002). Así pues, esta técnica permite la identificación de proteínas en mezclas complejas utilizando una combinación de cromatografía líquida (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) y espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry), proporcionando un intervalo dinámico más amplio y una mayor cobertura de proteínas que con las técnicas de proteómica clásicas que emplean electroforesis, particularmente para proteínas hidrófobas y proteínas con baja abundancia (Qi y Li, 2010). En esta Tesis Doctoral se ha usado el fraccionador *OFFGEL*, monitorizado para analizar muestras complejas. Esta técnica proporciona una separación proteica eficiente y reproducible basada en tiras de gradiente de pH inmovilizado (*IPG, Immobilized PH Gradient*) que focalizan las proteínas según su punto isoeléctrico (Hörth et al., 2006; Chenau et al., 2008). Los estudios realizados por Franchin et al. (2014) propusieron un paso adicional con acetonitrilo durante la extracción proteica, para mejorar la recuperación de la muestra hasta en un 40%.

La metodología usada en cualquier experimento de proteómica debe incluir los siguientes pasos: diseño experimental, muestreo, preparación de la muestra, extracción proteica, separación de extractos proteicos, análisis *MS*, identificación de proteínas, análisis estadístico y validación (Jorrín-Novo et al., 2009). Tanto el diseño experimental como la preparación de la muestra son etapas esenciales en cualquier experimento de

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	30/193



proteómica. La distribución de la cantidad de proteínas de la muestra, la pérdida asociada al material del analito o al análisis *MS*, o el límite de detección, son algunos de los parámetros a tener en cuenta durante un análisis proteómico. En los últimos años, los diseños y estrategias experimentales en proteómica han evolucionado junto con las técnicas usadas. La espectrometría de masas está experimentando un cambio constante debido a la mejora de la maquinaria empleada, los protocolos, así como por el desarrollo de nuevos métodos de disociación. Los experimentos basados en *MS* conllevan muchas etapas como son la preparación de la muestra (*SDS*, *Sodium Dodecyl Sulfate-PAGE*), cromatografía líquida, ionización por “electrospray” y análisis *MS* (Cravatt et al., 2007).

Aparte de la evolución de las tecnologías proteómicas, la aparición continua y actualización de diferentes bases de datos y algoritmos de cuantificación está favoreciendo la investigación proteómica en términos de eficiencia y precisión. Entre las bases de datos más comunes usadas en proteómica podemos destacar las siguientes: NCBI’s Entrez Protein, RefSeq, Swiss-Prot, Uniprot y TrEMBL. La elección de una base de datos adecuada es crucial para el diseño experimental y depende del objetivo del estudio, ya que todas proporcionan distintas herramientas para la identificación proteica. En esta Tesis Doctoral, se usaron principalmente dos bases de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) y *SGD* (*Saccharomyces* Genome Database, <https://www.yeastgenome.org/>) para la selección de proteínas. Ambas disponen de información relevante procedente de la literatura para cada proteína y también suministran diversas herramientas como las “*Gene Ontology annotations (GO)*” para agrupar las proteínas en términos ontológicos (*GO Terms*) dependiendo de la ontología elegida en cada caso (proceso biológico, función molecular y componente celular; Figura 5) (Apweiler et al., 2004; Cherry et al., 2011).

En cuanto a los estudios proteómicos llevados a cabo en levadura, la mayoría se centran en los cambios que tienen lugar durante la fermentación alcohólica y la respuesta al estrés. Estudios realizados por Brosnan et al. (2000) observaron que la respuesta al estrés durante la fermentación de dos cepas industriales está basada en la expresión de la proteína Hsp104p, cuyo patrón de inducción fue distinto según la cepa y fue reprimida a lo largo de la fermentación. Trabalzini et al. (2003) observaron cambios en el proteoma durante el agotamiento de la glucosa, antes de la entrada a la fase estacionaria. Además, encontraron que las proteínas involucradas en la adaptación a la limitación por glucosa son dirigidas contra los efectos del etanol. En este contexto, Zuzuarregui et al. (2005)

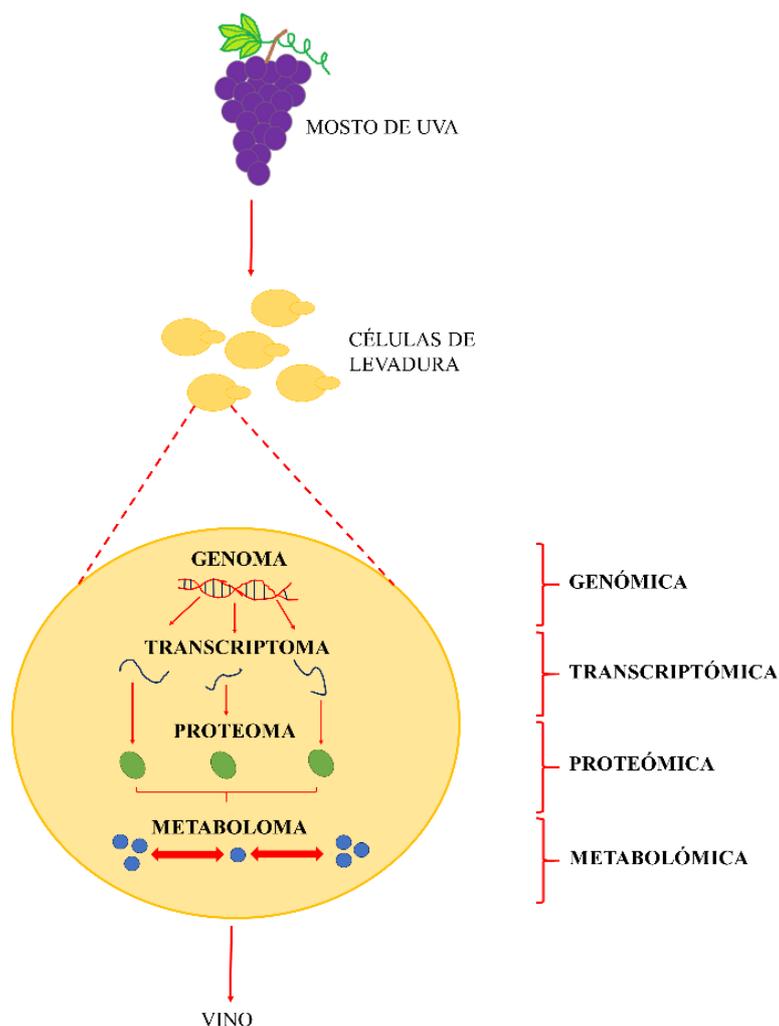
Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	31/193



realizaron una comparación transcriptómica y proteómica usando dos cepas de levaduras comerciales para entender las bases de la adaptación a la fermentación, observándose diferencias a nivel de expresión génica y de abundancia de proteínas. Las diferencias en la expresión se asociaron con el metabolismo de los carbohidratos, represión catabólica por nitrógeno y respuesta a estímulos; y en cuanto a las proteínas, éstas se relacionaron con la respuesta a estrés y fermentación. Se realizaron otros estudios proteómicos para dilucidar el papel de orgánulos como la mitocondrial en levadura de flor, en los que se observó la presencia de muchas proteínas mitocondriales relacionadas con la resistencia al etanol, respiración celular, mantenimiento del genoma mitocondrial y apoptosis (Moreno-García et al., 2014). Otras investigaciones centradas en el metabolismo del carbono en levadura de flor revelaron que las proteínas detectadas bajo condiciones de formación de biofilm estaban principalmente relacionadas con el catabolismo de fuentes de carbono no fermentables, los ciclos del glioxilato y de los ácidos tricarbóxicos (*TCA*, *TriCarboxylic Acid cycle*), respiración celular y metabolismo del inositol (Moreno-García et al., 2015). Recientemente, estos mismos autores analizaron el proteoma de la levadura de velo bajo condiciones de formación de velo, revelando que las levaduras se encontraban en fases iniciales para la formación de velo, debido a la presencia abundante de proteínas requeridas para el metabolismo oxidativo, protección contra las especies reactivas del oxígeno (*ROS*, *Reactive Oxygen Species*), y metabolismo de fuentes de carbono no fermentables (etanol) (Moreno-García et al., 2017).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	32/193





**Figura 5.** Niveles de información biológica que afectan al proceso de elaboración de vino.

### 1.2.2 Metabolómica

Esta ciencia –ómica se centra en el análisis imparcial, tanto no dirigido como dirigido, de los metabolitos celulares, que se encuentran en el nivel más bajo de información biológica (Figura 5). De hecho, esta ciencia ha aparecido hace poco como un área de investigación emergente en otros campos, como genómica y biología de sistemas. Mientras el análisis no dirigido permite el descubrimiento de nuevos compuestos o un rendimiento más alto, el análisis dirigido presenta una interpretación más fácil de los resultados y su relación, ya que se limita el intervalo de detección. Sin embargo, esto último, podría convertirse en una desventaja, ya que no se consideran muchos compuestos, que sí se pueden detectar en un análisis global, aunque muchos de ellos

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	33/193



todavía no están registrados en bases de datos (Villas-Bôas et al., 2005; Patti et al., 2012; Wanichthanarak et al., 2015).

En la mayoría de los análisis metabolómicos, los compuestos de cada muestra deben ser previamente separados mediante cromatografía y posteriormente identificados por espectrometría de masas. La espectrometría de masas mide el ratio masa/carga ( $m/z$ ) de iones para identificar y cuantificar moléculas en mezclas simples y complejas. Un espectrómetro de masas contiene una fuente de iones, un analizador de masas y un detector de iones. Diversas fuentes de iones están disponibles actualmente como son la ionización por electrospray (*ESI, ElectroSpray Ionization*), ionización por impacto de electrones (*EI, Electron Ionization*), ionización por impacto químico (*CI, Chemical Ionization*), ionización mediante láser asistida por matriz (*MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), ionización mediante bombardeo de átomos rápidos (*FAB, Fast atom bombardment*), termospray, o la ionización química por presión atmosférica (*APCI, Atmospheric pressure chemical ionization*). En cuanto a los analizadores de masas, los más usados son: el cuadrupolo (*Q, Quadrupole*), la trampa de iones cuadrupolar (*QIT, Quadrupole Ion Trap*) y el tiempo de vuelo (*ToF, Time of Flight*). Entre ellos, los cuadrupolos son más baratos y simples de usar, mientras que el resto son más eficientes ya que ofrecen una resolución más alta (Pinu, 2018).

En cuanto a las técnicas y tecnologías más empleadas actualmente se encuentran:

- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*GC, Gas Chromatography-MS*): esta técnica es una de las más usadas actualmente, ofreciendo una alta resolución y sensibilidad, acompañado con el análisis simultáneo de los distintos grupos de metabolitos. Sin embargo, requiere derivatización química para aquellos metabolitos que no son volátiles (Pinto et al., 2018; Schueuermann et al., 2019).
- Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (*LC, Liquid Chromatography-MS*): la cromatografía líquida, y especialmente la de alta resolución (*HPLC*), es una técnica que posee menos resolución que la cromatografía de gases; sin embargo, permite medir un amplio intervalo de analitos, tiene una alta sensibilidad y no requiere derivatización de la muestra lo que supone una importante ventaja con respecto a la anterior (Capone et al., 2011; Theodoridis et al., 2012).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	34/193



- Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE, Capillary Electrophoresis-MS): esta técnica posee una mayor resolución que la HPLC, que permite un rápido análisis y no requiere derivatización de los compuestos. Por el contrario, posee una menor reproducibilidad y sensibilidad, y ciertas incompatibilidades con MS (Vanhoenacker et al., 2001).
- Espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR, Nuclear Magnetic Resonance): este es el único método de análisis en metabolómica que no requiere de una separación previa de los compuestos para ser detectados. Todos los metabolitos pueden ser medidos simultáneamente y la preparación de las muestras no requiere mucha manipulación por lo que puede ser recuperada para posteriores análisis. Aunque es verdad que permite un análisis más rápido, este método también tiene ciertas desventajas como la baja sensibilidad comparada con el resto de técnicas que emplean espectrometría de masas, y que el proceso de identificación puede ser laborioso (Rochfort et al., 2010).

Aparte de estas técnicas, otras como la infusión directa acoplada a espectrometría de masas (DI, Direct Infusion-MS) se usa ampliamente para perfiles metabólicos (Villas-Bôas et al., 2005). La mayor ventaja de este método es que requiere sólo una pequeña cantidad de muestra y no necesita derivatización, además de que se detectan más metabolitos que con la técnica GC-MS. En cuanto a los estudios metabolómicos realizados hasta el momento en la industria del vino espumoso, la mayoría se centran en la evaluación del aroma y los cambios que tienen lugar durante la segunda fermentación, (Mamede et al., 2005; Ganss et al., 2011; Martínez-García et al., 2017; Ubeda et al., 2019). Además, recientemente, Martínez-García et al., 2020 han estudiado los compuestos volátiles que influyen en el aroma en vinos espumosos producidos por primera vez por una levadura de flor.

### 1.3 Pared celular de levadura

La pared celular de levadura es una estructura rígida, flexible y al mismo tiempo dinámica, localizada entre la membrana plasmática y el medio extracelular. La pared celular no sólo proporciona protección contra las condiciones osmóticas y los estreses físicos y químicos, sino que también mantiene la morfogénesis celular y sirve de soporte para proteínas. Aparte de estas funciones esenciales, también participa en otros procesos

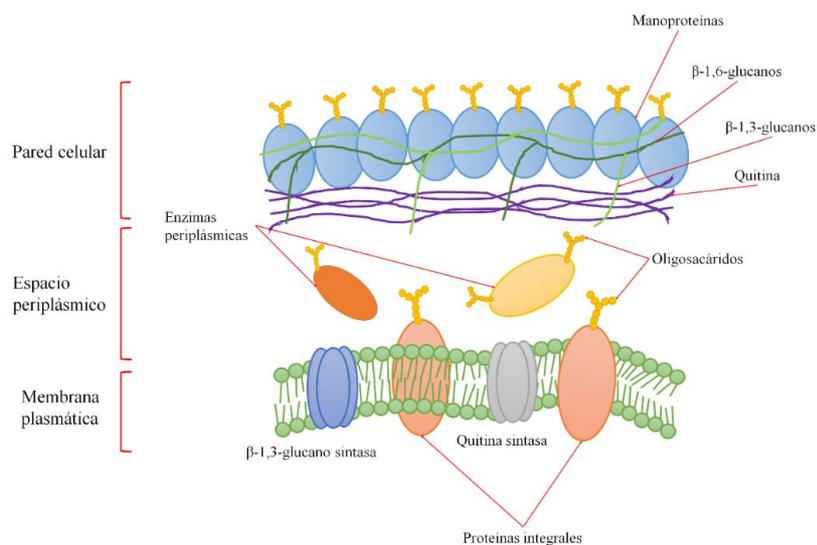
Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	35/193



como la floculación, reproducción, formación de biofilm y crecimiento invasivo (Klis et al., 2006).

### 1.3.1 Composición y organización molecular

La pared celular de la levadura está formada por  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucanos, representando el 30-45 y el 5-10% de la masa de la pared, respectivamente; glicoproteínas, especialmente manoproteínas (30-50%); y quitina (1.5-6%). Según el ciclo celular, la disponibilidad de nutrientes o cambios debido a condiciones externas, la forma y la composición de la pared celular son variables (Klis et al., 2006; Kalebina y Rekestina, 2019). Los  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucanos forman una red a lo largo de la pared celular, mientras que el componente quitina permanece cerca de la membrana plasmática. Por otra parte, la mayoría de las glicoproteínas (modificadas mediante la unión de N- y O-oligosacáridos) se mantienen unidas a la membrana plasmática a través de anclajes glicosilfosfatidilinositol *GPI* (Glycosylphosphatidylinositol), mientras que otras son secretadas dentro del espacio periplásmico (Figura 6). Éste se encuentra entre la pared celular y la membrana plasmática, y en él se localizan enzimas importantes como invertasas o algunas glucanasas de gran interés para la enología, ya que son las responsables de la degradación de la pared celular de las levaduras durante la autólisis de los vinos espumosos (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006). Todos estos componentes, integrados en la pared celular mediante entrecruzamiento, son descritos en detalle a continuación.



**Figura 6.** Estructura y composición molecular de la pared celular de levadura.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	36/193



### Componente glucano

Los glucanos son el componente estructural mayoritario de la pared celular, representando aproximadamente el 35-55% de su peso. La mayoría de los glucanos forman cadenas  $\beta$ -1,3 interconectadas con polímeros  $\beta$ -1,6. Las funciones de los  $\beta$ -1,3-glucanos se han relacionado con la fuerza mecánica y flexibilidad de la pared, y se consideran un componente estructural esencial (Klis et al., 2002). Por otra parte, estudios estructurales sobre los  $\beta$ -1,6-glucanos muestran su papel estructural y su función a la hora de unir manoproteínas mediante anclaje *GPI* (Kollár et al., 1997). La síntesis de  $\beta$ -1,3-glucanos tiene lugar en un complejo proteico asociado con la membrana plasmática conocido como glucano sintasa. Esta asociación con la membrana plasmática provoca una integración más fácil con la pared celular de las nuevas cadenas de glucanos, ya que estos polímeros son liberados dentro del espacio periplásmico (Douglas et al., 2001). El complejo  $\beta$ -1,3-glucano sintasa consiste en dos subunidades catalíticas, codificadas por los genes *FSK1* y *FSK2* (Inoue et al., 1995; Mazur et al., 1995; Mio et al., 1997), y una subunidad reguladora, codificada por el gen *RHO1* (Qadota et al., 1996; Kondoh et al., 1997). Por el contrario, el mecanismo sintético de los  $\beta$ -1,6-glucanos no se conoce del todo hasta el momento. Estudios genéticos de estos polímeros han identificado numerosos genes involucrados en su proceso sintético. Todos ellos han sido detectados en distintos pasos de la vía secretora, incluyendo retículo endoplásmico (*KRE5*, *CWH41*, *ROT2*, *CNE1*), Golgi (*KRE6*, *SKN1*), citoplasma (*KRE11*) y superficie celular (*KRE9*, *KNH1*, *KRE1*), sugiriendo que los eventos intracelulares y aquellos que ocurren en la superficie celular requieren de la biosíntesis de  $\beta$ -1,6-glucanos (Shahinian et al., 2000).

### Componente glicoproteico

La mayoría de las proteínas de la pared celular son glicoproteínas que han sufrido modificaciones (N- y O-glicosilación) durante la vía secretora. Aparte de estas modificaciones, los anclajes *GPI* se añaden a algunas proteínas de pared celular para permitir su unión a la pared celular y membrana plasmática.

Estos procesos de N- y O-glicosilación están altamente conservados en eucariotas. La glicosilación o glucosilación se define como el proceso de adición de carbohidratos a una proteína, que tiene lugar en el retículo endoplásmico. El primer paso sería su translocación al retículo, donde una vez introducida, un oligosacárido común que consiste en 2 moléculas de N-acetilglucosamina, 3 de glucosa y 9 de manosa, es transferido al residuo

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	37/193



de asparagina de una proteína. Un lípido de la membrana del retículo llamado dolicol fosfato es el responsable de transferir el oligosacárido dentro del retículo. Después de que el oligosacárido es transferido a la proteína, ésta sufre diferentes modificaciones en el retículo endoplasmático y Golgi, donde largas cadenas de azúcares son añadidas o eliminadas de su estructura. Un ejemplo de este proceso sería la síntesis de manoproteínas en levadura, que se forman por la adición de largas cadenas de manosas con enlaces  $\alpha$ -1,6 junto con cadenas cortas de manosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,2 y 1,3 (Cabib et al., 1988). Por otra parte, en cuanto a la O-glicosilación, ésta tiene lugar en el retículo endoplasmático mediante la adición de un solo azúcar formado por unos pocos residuos de monosacáridos, mientras que en el caso de la N-glicosilación, los oligosacáridos, en vez de unirse a los residuos de asparagina, éstos se unen a los grupos hidroxilo de los residuos de serina y treonina de la proteína. La elongación de las cadenas de oligosacáridos ocurre en el aparato de Golgi gracias a la participación de unas enzimas conocidas como manosiltransferasas.

Además, numerosas glicoproteínas de pared celular reciben un anclaje *GPI*, que sirve para unir la proteína a la membrana. Estas proteínas también disponen de un péptido señal, reconocido por un complejo proteico de la membrana del retículo endoplasmático llamado *GPI* transaminasa, cuya función es mediar la transferencia del anclaje *GPI* a la nueva proteína sintetizada (Bowman et al., 2006). Una vez el anclaje *GPI* se une a la proteína, esta se descarga en el Golgi a través del transporte vesicular y finalmente a la membrana plasmática.

Entre las glicoproteínas, las manoproteínas, proteínas glicosiladas que contienen residuos de manosa, son las más relevantes desde el punto de vista enológico. Las manoproteínas representan el 35-50% de la pared celular y están conectadas a la matriz de  $\beta$ -1,3-glucanos a través de enlaces covalentes (Klis et al., 2002). A las manoproteínas se le han atribuido diversas funciones enológicas que han sido descritas por distintos autores, entre las que se incluyen su influencia en el aroma del vino (Lubbers et al., 1994; Chalier et al., 2007; Juega et al., 2012), en su color (Guadalupe et al., 2010), en las propiedades espumantes (Núñez et al., 2006; Blasco et al., 2011), en la combinación con compuestos fenólicos (Riou et al., 2002; Escot et al., 2001), en promover la fermentación maloláctica mediante el crecimiento de las bacterias del ácido láctico (Guilloux-Benatier et al., 1995; Diez et al., 2010), en la prevención de cristales proteicos (Waters et al., 1994; Dupin et al., 2000) y en la floculación (Suzzi et al., 1984; Saulnier et al., 1991; Guiraud

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	38/193



y Fontana, 1992). Por todas estas razones, la sobreproducción de manoproteínas se ha convertido en uno de los aspectos más deseables para la selección de las cepas de levadura para vinos espumosos (Guadalupe et al., 2010).

### Componente quitina

La quitina es un largo homopolímero lineal de N-acetilglucosamina unida por enlaces  $\beta$ -1,4, y está considerada como el componente minoritario de la pared celular (1.5-6%). En *S. cerevisiae*, la quitina se encuentra principalmente formando el septo primario y en las cicatrices de los bordes tras la gemación, aunque se piensa que también puede encontrarse en las paredes laterales (Klis et al., 2002). La síntesis de quitina se lleva a cabo por la quitina sintasa, una enzima integral de membrana que cataliza la transferencia de N-acetilglucosamina a las cadenas nuevas de quitina. Se han descubierto tres diferentes quitina sintasas en *S. cerevisiae* (Chs1p, Chs2p y Chs3p) (Roncero, 2002). Chs1p se requiere para la reparación del septo de quitina durante la citocinesis (Cabib et al., 1992); Chs2p es responsable de la síntesis de quitina en el septo primario durante la citocinesis (Schmidt et al., 2002); y Chs3p participa en la síntesis de la mayoría de la quitina de la pared celular (90-95%), la formación del septo de quitina y la pared de quitosano de la spora (Pammer et al., 1992; Ziman et al., 1996).

#### 1.3.2 Integridad de la pared celular

La pared celular es una estructura dinámica debido a las numerosas alteraciones que soportan las levaduras en respuesta a las cambiantes condiciones externas. En *S. cerevisiae*, la modulación de estos cambios morfológicos se debe a la activación de la vía de la integridad de la pared celular (*CWI, Cell Wall Integrity*). Esta vía de señalización consiste en una familia de sensores de superficie acoplados a una proteína llamada Rho1p, responsable de la activación de un grupo de efectores que regulan un amplio rango de procesos biológicos incluyendo la síntesis de  $\beta$ -glucanos, construcción y remodelamiento de la pared celular, u otros procesos relacionados con la vía secretora (Levin, 2005).

La vía efectora Rho1 más estudiada ha sido la cascada *MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)* activada por Pkc-1, una de las cinco cascadas *MAPKs* en *S. cerevisiae* involucradas en la construcción y síntesis de pared celular (Figura 7). Esta vía se activa en respuesta a muchas señales externas como son la disponibilidad de nutrientes, las altas temperaturas, la baja osmolaridad, las feromonas reproductoras y la regulación del ciclo celular. Estas señales son percibidas por los sensores localizados en la membrana

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	39/193

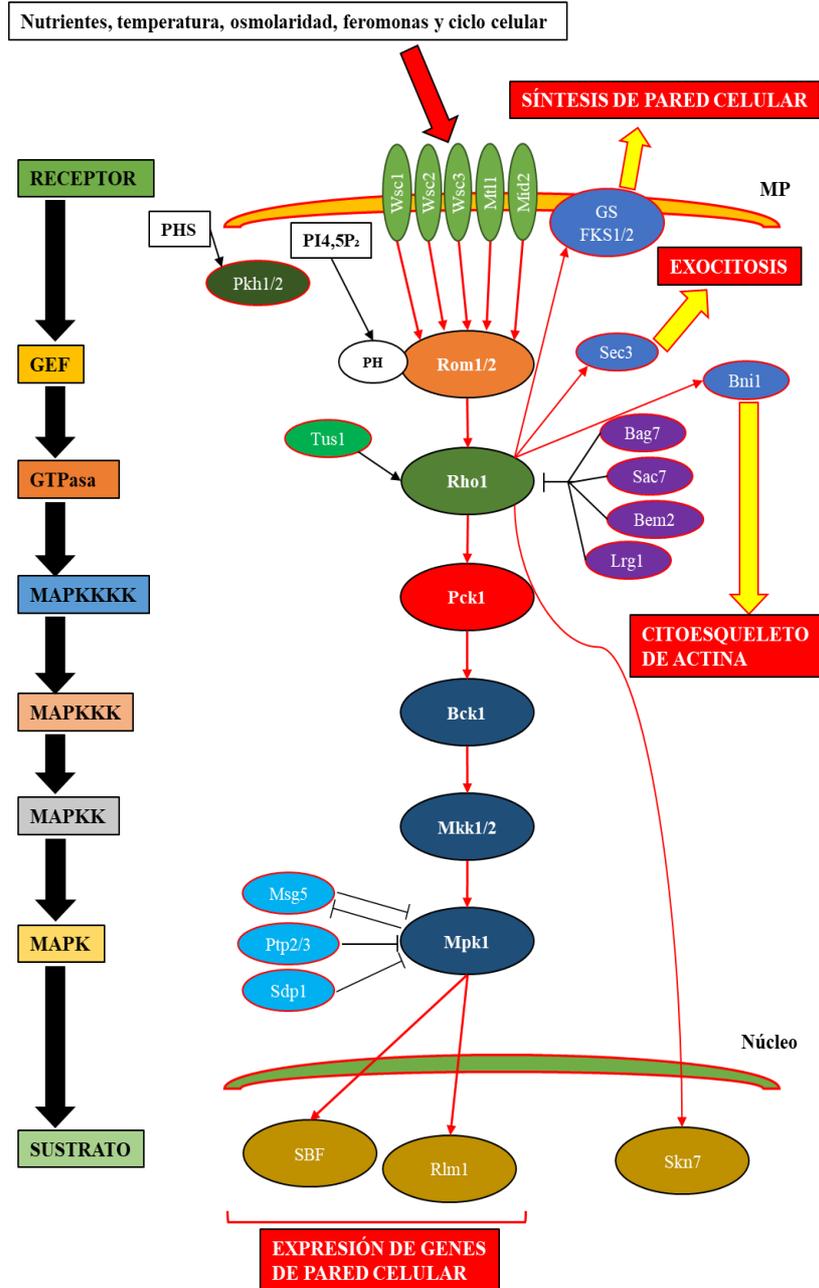


plasmática. En las levaduras, se han identificado una familia de cinco sensores: Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p, Mt11p y Mid2p (Verna et al., 1997; Lodder et al., 1999; Ketela et al., 1999; Philip y Levin, 2001).

Estos sensores junto con el efector fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (*PI4,5P2*, *Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate*), que recluta al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*GEF*, *Guanosine nucleotide Exchange Factor*) Rom1/2p a la membrana plasmática mediante los dominios con homología a la Pleckstrina (*PH*, *Pleckstrin Homology*), son responsables de la activación de la GTPasa Rho1p, la cual cambia de su estado inactivo (unida a *GDP*) a su estado activo (unida a *GTP*). Esta proteína-G, considerada como el regulador más importante de la vía de integridad, activa un amplio rango de efectores, incluyendo la cascada quinasa Pkc1-MAP (Nonaka et al., 1995), la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa (síntesis de pared celular) (Mazur y Baginsky, 1996; Arellano et al., 1996), la formina Bni1p (organización de la actina) (Evangelista et al., 1997), y el componente del complejo exocitosis Sec3p (secreción polarizada) (Guo et al., 2001). Además, el factor de transcripción Skn7p podría ser activado por Rho1p en respuesta a condiciones de estrés tanto oxidativo como de la pared celular (Alberts et al., 1998). Las proteínas activadoras de GTPasa (*GAP*, *GTPase-activating protein*) que inhiben a Rho1 (Bem2p, Sac7p, Bag7p y Lrg1p) (Schmidt et al., 2002), como también el *GEF* de Rho1 (Tus1p) y las proteínas quinasas (Pkh1/2p) (Schmelzle et al., 2002) activadas por fitoesfingosina (*PHS*, *PHytoSphingosine*) se muestran en la Figura 7. Estas proteínas quinasas también contribuyen a la organización de la actina mediante la activación de Pkc1p. Una vez Pkc1p es activada, la cascada se inicia. Esta cascada implica a las proteínas quinasas Bck1p, Mkk1/2p y Mpk1p, que son fosforiladas secuencialmente. Al mismo tiempo, Mpk1p es desregulado por cuatro fosfatasa entre las que se incluyen Msg5p, Ptp2/3p y Sdp1p. Dos factores de transcripción son dianas de la proteína quinasa Mpk1p: el factor *SBF* (*Swi4/Swi6 protein complex*) y Rlm1p (Gustin et al., 1998; Levin, 2005). El complejo *SBF* contribuye a la regulación de la transición entre las fases G<sub>1</sub>/S a lo largo del ciclo celular y a la expresión de los genes de síntesis de pared celular. Por otra parte, Rml1p es responsable de la mayoría de la respuesta transcripcional generada durante la vía de integridad de la pared, participando de manera importante en la construcción de la pared celular (Nasmyth y Dirick, 1991; Jung y Levin, 1999).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	40/193





**Figura 7.** Vía de integridad de la pared celular (CWI) en *S. cerevisiae*. PHS (PHytoSphingosine); PI4,5P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate); PH (Pleckstrin Homology); GS (Glucan Synthase); MP (Membrana Plasmática); GEF (Guanosine nucleotide Exchange Factor); MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Modificada por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Levin (2005).

## 1.4 Floculación

La floculación en levaduras se define como un proceso no sexual, homotípico, reversible, multivalente y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el que las células de levadura se agregan formando masas multicelulares conocidas como flóculos. La capacidad para flocular es una característica deseable para la selección de cepas de levadura en la elaboración de vino espumoso debido a su relevancia en etapas clave del proceso industrial. De hecho, la floculación se considera una forma rápida, económica y natural para eliminar el depósito formado por las levaduras durante las etapas de removido y degüelle, y también favorece el proceso previo de clarificación del mosto (Pozo-Bayón et al., 2009; Soares, 2011).

### 1.4.1 Genes *FLO*

En levaduras, el proceso de floculación se lleva a cabo por la acción de una familia de proteínas llamadas “floculinas” o “Proteínas Flo”. En *S. cerevisiae*, hay al menos 9 genes que codifican floculinas: *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*, *FLONL*, *FLONS* y *Lg-FLO1*. El gen *FLO11*, aparte de la floculación, también está involucrado en el crecimiento filamentoso, adhesión a superficies sólidas y formación de biofilm (Bayly et al., 2005). Entre ellos, el más estudiado y caracterizado ha sido el gen *FLO1*, identificado y localizado al final del brazo derecho del cromosoma I (Teunissen et al., 1993; Watari et al., 1994; Bidard et al., 1995). Los genes (*FLO5*, *FLO9* y *FLO10*) comparten un 96, 94 y 58% de homología, respectivamente, con el gen *FLO1*. Otro gen *FLO* como *FLO8* codifica un factor de transcripción responsable de la regulación de los genes *FLO*. Estudios realizados por Bester et al. (2006), describieron que este gen junto con el activador transcripcional Mss11p (involucrado en la regulación durante la degradación del almidón, formación de pseudohifas y crecimiento invasivo) inducen floculación, siendo la diana el gen *FLO1*. La floculación puede ser inhibida por la concentración de azúcar en el medio y según el tipo de azúcar que la reprima hay dos tipos de fenotipos: Flo1 y NewFlo. Los fenotipos Flo1, incluyendo los genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* y *FLO10*, se reprimen específicamente por manosa; mientras que los fenotipos NewFlo (*FLONL*, *FLONS* y *Lg-FLO1*), que contienen la mayoría de las cepas usadas en la elaboración de cerveza, son reprimidos por manosa, maltosa y glucosa. Además, en el caso del fenotipo NewFlo atribuido por *Lg-FLO1*, éste es reprimido también por galactosa (Vidgren y Londesborough, 2011).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	42/193



#### 1.4.2 Factores medioambientales que afectan a la floculación

Aparte de la genética, la floculación también se ve afectada por diversos parámetros externos como el oxígeno, pH, temperatura, cationes, etanol y nutrientes.

- a) Contenido en oxígeno: Se ha demostrado que una aireación normal favorece la floculación, mientras que una fuerte aireación o condiciones anaeróbicas conducen a una floculación temprana e incompleta. El oxígeno no actúa directamente en la floculación, sino mediante las síntesis de ergosterol y ácidos grasos insaturados, responsables, por ejemplo, de la estabilización de las floculinas en la superficie celular (Straver et al., 1993). Además, las condiciones aeróbicas y anaeróbicas también han sido asociadas a la expresión diferencial de manoproteínas de pared celular, que podrían afectar al proceso de floculación (Abramova et al., 2001).
- b) pH: Para una correcta floculación, el pH del medio debe encontrarse entre 2.5-9.0, aunque muchas cepas usadas en la elaboración de cerveza necesitan un intervalo de pH entre 2.5-5.5 (Stratford, 1996). Los cambios extremos en el intervalo de pH modifican los flóculos, provocando su dispersión mediante la alteración de la ionización de los aminoácidos de las lectinas (Jin et al., 2001).
- c) Temperatura: Parece ser un efecto dependiente de la cepa, ya que aquéllas con fenotipo Flo1 son capaces de llevar a cabo la floculación a temperaturas más altas y a intervalos más amplios que las cepas NewFlo. Además, la temperatura influye sobre el metabolismo de la levadura y la producción de CO<sub>2</sub>, que resulta en una reducción de la turbulencia (Speers et al., 2006), y es responsable de la dispersión de los flóculos durante la interacción célula-célula (Taylor y Orton, 1975).
- d) Cationes: La floculación necesita de la acción de distintos cationes para su funcionamiento. Entre ellos, los iones calcio son los principales efectores de la adhesión celular y la floculación, actuando en un amplio intervalo de pH (Stratford, 1989). Estos autores concluyeron que el calcio es esencial para iniciar la floculación y otros iones como el magnesio pueden inducir este proceso de manera indirecta. Otros cationes como Co<sup>2+</sup>, K<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> o Al<sup>3+</sup>, han sido considerados como promotores de la floculación, probablemente, mediante la competencia por los sitios para el calcio de las lectinas, aunque esto no provoca una correcta conformación de las lectinas

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	43/193



(Soares, 2011). Por otra parte, cationes como  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $La^{3+}$  y  $Pb^{2+}$  inhiben la floculación (Kuriyama et al., 1991; Gouveia y Soares, 2004).

- e) Etanol: El efecto positivo de la concentración de etanol en la floculación no se ha descrito hasta el momento, aunque sí se ha observado que una repulsión electrostática célula-célula es provocada por el etanol, junto con un cambio en la conformación de la pared celular, que favorece la floculación. Estos efectos parecen ser dependientes del fenotipo de la cepa de levadura según la concentración de etanol (Dengis et al., 1995; Jin y Speers, 2000). Entre los efectos negativos, las concentraciones altas de etanol (> 10% v/v) inhiben la expresión de los genes *FLO* (Claro et al., 2007).
- f) Azúcares y otros nutrientes: Distintos azúcares pueden inhibir la floculación, lo que permite su distinción entre los dos fenotipos (Flo1 y NewFlo), mediante las interacciones célula-célula y la dispersión de los flóculos (Soares, 2011). Aparte del azúcar, la limitación de nitrógeno ha sido descrita por afectar el inicio de la floculación (Sampermans et al., 2005).

## 1.5 Autofagia

El proceso de autofagia en levaduras es la vía de tráfico vacuolar más importante y se define como un proceso, generalmente, citoprotector que implica la digestión de material intracelular (no sólo de proteínas sino también de orgánulos citoplasmáticos) en la vacuola (Carmona-Gutiérrez et al., 2018). Este proceso se induce bajo condiciones de limitación de nutrientes y da lugar a la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que llevan a cabo el transporte de porciones del citoplasma a la vacuola para su degradación y posterior reciclaje (Levine y Klionsky, 2004). La autofagia es esencial para mantener la homeostasis celular y la supervivencia en diferentes condiciones de estrés como la limitación de nutrientes, estrés del retículo o la infección provocada por patógenos (Mizushima et al., 2008). Por otro lado, cuando los nutrientes se encuentran disponibles en el medio, la célula responde por medio de una vía constitutiva de tráfico vacuolar llamada vía *Cvt* (*cytoplasm to vacuole targeting*) (Harding et al., 1995). Mediante esta vía, enzimas vacuolares como la aminopeptidasa I (Ape1p) y la  $\alpha$ -manosidasa (Ams1p), previamente sintetizadas como precursores inactivos en el citoplasma (Hutchins y Klionsky, 2001), son incorporadas en vesículas de doble membrana llamadas vesículas *Cvt*, similares a los autofagosomas aunque, en este caso,

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	44/193



de menor tamaño y sin transportar contenido citoplasmático. Estas vesículas son transportadas a la vacuola donde estas enzimas funcionan como hidrolasas residentes (Scott et al., 1997). La morfología de la autofagia y la vía *Cvt* son muy similares y, de hecho, la mayoría de la maquinaria molecular que interviene en el proceso de autofagia, también opera de manera selectiva en la vía constitutiva (Khalfan y Klionsky, 2002).

Este proceso fue descrito por primera vez en *S. cerevisiae* a través de la acumulación de cuerpos autofágicos en levaduras deficientes en proteasas vacuolares bajo condiciones de limitación de nutrientes (Takeshige et al., 1992). Diversos autores han estudiado la autofagia durante las fermentaciones vínicas mediante enfoques genéticos o de microscopía electrónica para describir las funciones de los genes relacionados con la autofagia y detectar la presencia de estructuras típicas de este proceso en levaduras (Cebollero y González, 2006; Cebollero et al., 2008; Tabera et al., 2006; Piggott et al., 2011; Orozco et al., 2012). Se han usado diversos marcadores para detectar la autofagia en levaduras. De hecho, Cebollero y González (2006) demostraron que la autofagia se inducía durante la segunda fermentación de los vinos espumosos a través de dos técnicas: la degradación de la proteína Ald6p y la presencia de cuerpos autofágicos en las vacuolas. El uso de la proteína Ald6p como marcador de autofagia fue propuesto por Onodera y Ohsumi (2004), ya que esta aldehído deshidrogenasa es sólo degradada durante el proceso autofágico. Numerosos estudios transcriptómicos y genómicos han analizado la expresión de genes relacionados con la autofagia durante la fermentación alcohólica, generalmente, para permitir la supervivencia celular bajo condiciones de estrés nutricional (Rossignol et al., 2003; Penacho et al., 2012; Piggott et al., 2011).

Varios análisis genéticos o de microscopía por fluorescencia han descubierto los genes de autofagia (Klionsky, 2003). Un total de 31 genes *ATG* relacionados con la autofagia se han identificado en *S. cerevisiae*, de los cuales 18 de ellos están involucrados en la formación del autofagosoma (Suzuki and Ohsumi, 2007). Aunque este proceso se origina de forma orquestada y dinámica, se divide en distintos pasos (Figura 8), que incluyen su inducción y posterior formación de vesículas, selección y transporte del material citoplasmático, y su fusión con la vacuola (Klionsky, 2005).

### 1.5.1 Inducción de la autofagia

La autofagia se induce, principalmente, por la limitación nutricional del medio, mediante un mecanismo molecular donde participa la proteína quinasa Tor, un inhibidor

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	45/193



de la autofagia, el cual se encuentra inactivo bajo condiciones de disponibilidad de nutrientes (Schmelzle y Hall, 2000), sin embargo, en estas condiciones la autofagia se induce, aunque a un nivel basal muy bajo (Noda y Ohsumi, 1998). Esta inducción llevada a cabo por Tor puede provocar la inhibición de la autofagia de dos maneras: la primera, mediante una señal de transducción a través de varios efectores, controlando la transcripción y traducción; y la otra forma sería causando la hiperfosforilación de la proteína Atg13p y disminuyendo su afinidad por Atg1p (Kamada et al., 2000; Abeliovich, 2004). Por el contrario, en ausencia de nutrientes, Tor es inactivada y las proteínas Atg13p y Atg1p son desfosforiladas parcialmente, provocando un aumento de su afinidad y la posterior inducción de la autofagia.

### 1.5.2 Selección y empaquetado del cargo

El proceso autofágico puede ser selectivo o no selectivo. En *S. cerevisiae*, la mayoría de los componentes de la maquinaria de autofagia están involucrados también en la vía constitutiva *Cvt*. Esta vía implica el reconocimiento selectivo y específico de la carga, donde proteínas como Atg11p y Atg19p son requeridas para su transporte. El receptor Atg19p es responsable del reconocimiento y unión de la carga, en este caso de la aminopeptidasa Ape1p en su forma inactiva (prApe1p) junto con la  $\alpha$ -manosidasa Ams1p, formando complejos Atg19p-prApe1p. Tras esto, la interacción con Atg11p causa el transporte de este complejo al *PAS* (*Pre-Autophagosomal Structure*), donde se empaqueta en vesículas *Cvt* (mediante su interacción con Atg8p) que posteriormente, se dirigen a la vacuola (Levine y Klionsky, 2004; Song y Kumar, 2012).

### 1.5.3 Nucleación vesicular

Tanto las vesículas que actúan en la autofagia como aquéllas que participan en la vía *Cvt* son generadas en el *PAS* por la acción de dos complejos fosfatidilinositol 3-quinasa (PtdIns 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase) de clase III: el complejo I que se requiere en la autofagia y vía *Cvt*, y que incluye a las subunidades Vps30/Atg6p, Vps34p, Vps15p y Atg14p; y el complejo II, que opera en la vía *Vps* (*vacuolar protein sorting*), formado por las mismas subunidades mencionadas para el complejo I con la adición de Vps38p (Kihara et al., 2001). La fosfatidilinositol 3-quinasa Vps34p se encarga de fosforilar específicamente el complejo junto con la acción de Vps15p (Stack et al., 1995).

Además de estos complejos, Atg9p es la única proteína integral de membrana localizada en la membrana del *PAS*, citoplasma y superficie mitocondrial (Noda et al.,

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	46/193



2000; Lang et al., 2000; Reggiori et al., 2005). Diversos estudios han sugerido que esta proteína puede servir como un transportador de membrana para la formación del autofagosoma, siendo la mitocondria la principal fuente (He y Klionsky, 2007).

#### 1.5.4 Formación y expansión del autofagosoma

De los 31 genes de autofagia, 18 de ellos (Atg1-10p, Atg12-14p, Atg16-18p, Atg29p y Atg31p) participan en la formación del autofagosoma (Klionsky et al., 2003). Esta etapa comprende el secuestro de porciones del citoplasma junto con orgánulos en una vesícula de doble membrana llamada, en un principio, fagóforo o membrana aislada (*IM, Isolated Membrane*). La formación del autofagosoma depende en gran medida de su reclutamiento al *PAS* mediante la interacción de las proteínas Atg (Suzuki et al., 2007).

Durante el proceso de formación del autofagosoma, hay un número de proteínas que forman parte de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina, Atg12p-Atg5p-Atg16p y Atg8p-*PE* (*PhosphatidylEthanolamine*) (Ohsumi, 2001; Yorimitsu y Klionsky, 2005). Ambos sistemas pueden ser inducidos por la acción de la enzima activadora de ubiquitina E1 Atg7p. Una vez activado el sistema Atg12p, ésta se transfiere a la enzima de conjugación tipo E2 Atg10p y, posteriormente, se une a los residuos de lisina de la proteína Atg5p, formando el complejo Atg12p-Atg5p (Mizushima, 1998; Ohsumi, 2001). Después, a este complejo proteico se le une la proteína Atg16p, lo que permite su transporte a la membrana del autofagosoma y su asociación mediante Atg5p (Kirisako et al., 1999; Hanada et al., 2007; Suzuki et al., 2007). En el sistema Atg8p-*PE*, el otro sistema tipo ubiquitina, la proteína Atg8p es procesada por Atg4p (cisteína proteasa), lo que permite la activación de Atg8p por parte de la enzima Atg7p, y su transferencia a la enzima E2 Atg3p (Mizushima, 1998; Ichimura et al., 2000; Kirisako et al., 2000). Finalmente, Atg8p se une a la diana lipídica *PE* formando el complejo Atg8p-*PE*. Ambos sistemas participan en la formación del autofagosoma y su adecuada expansión (Mizushima et al., 1999).

#### 1.5.5 Acoplamiento y fusión vesicular

Tras la formación del autofagosoma, las subunidades pertenecientes a los sistemas de conjugación son liberadas al citoplasma para su posterior degradación. El complejo Atg8p-*PE* se une a la vesícula hasta su llegada a la vacuola, donde se libera por la acción de Atg4p (Kirisako et al., 2000). Luego, la vesícula se fusiona con la vacuola, proceso que requiere de la participación de una serie de proteínas llamadas *SNARE* (*Soluble NSF*

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	47/193



*Attachment Protein Receptor*): Vam3p, Vam7p, Vti1p, Ykt6p, la GTPasa Rab Ypt7p, Sec18p y el complejo proteico *Vps/HOPS* (*HO*motypic fusion and *Protein Sorting*) de clase C (Levine y Klionsky, 2004). Recientemente, se han caracterizado dos proteínas, Mon1p y Ccz1p, relacionadas también en esta etapa de fusión. El complejo formado por estas dos proteínas es esencial para el acoplamiento de Ypt7p, la formación del complejo *SNARE* y su interacción con el complejo *HOPS* (Klionsky, 2005).

#### 1.5.6 Degradación vesicular y transporte al citoplasma

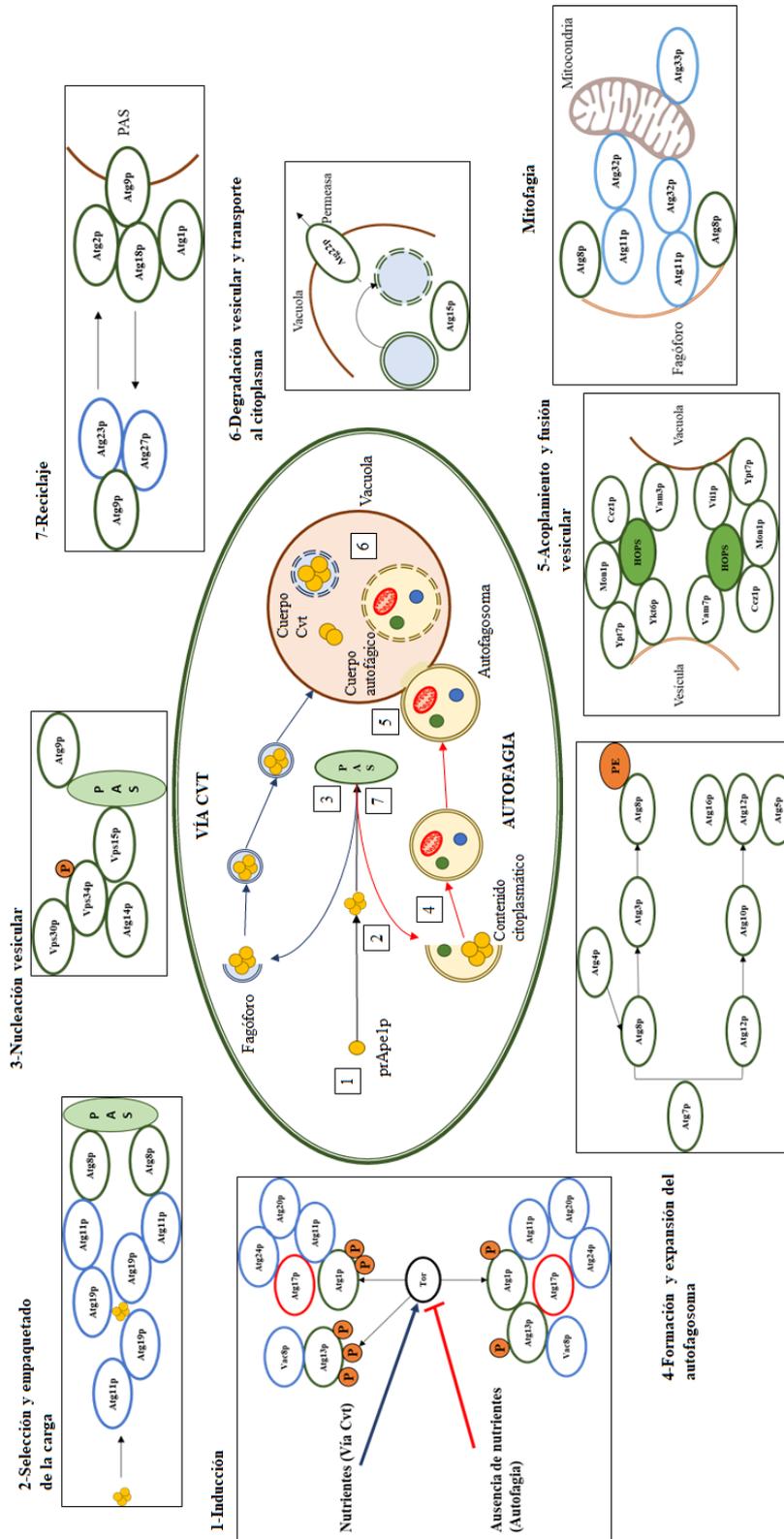
Una vez la vesícula se fusiona con la vacuola, ésta libera su contenido en el lumen, pasándose a llamar cuerpo autofágico o *Cvt* (vesículas formadas por una sola membrana), según el tipo de vesícula fusionada. La membrana de las vesículas se degrada por la proteína Atg15p, una fosfolipasa localizada en el lumen de la vacuola (Epple et al., 2001; Yorimitsu y Klionsky, 2005). Diversas hidrolasas residentes, como Ape1p (activada previamente mediante su procesamiento proteolítico en el lumen vacuolar) y las proteinasas A y B entre otras en la vacuola, son responsables también de la degradación del contenido de las vesículas. Los componentes degradados en moléculas son transportados posteriormente al citoplasma mediante el uso de permeasas integrales localizadas en la membrana vacuolar como Atg22p (Yang et al., 2006).

#### 1.5.7 Reciclaje

Las proteínas que participan en la autofagia y en la vía *Cvt* usan un transporte retrógrado para permitir su reutilización. Un ejemplo de esto es la proteína Atg9p, requerida tanto para la autofagia como la vía *Cvt*. Estudios realizados por He y Klionsky (2007) sugieren que Atg9p podría transportar membrana desde la mitocondria al *PAS* para la adecuada formación del autofagosoma. Por otro lado, el transporte anterógrado de Atg9p al *PAS* es facilitado por las proteínas Atg11p, Atg23p y Atg27p, formando estas dos últimas un complejo con Atg9p (Legakis et al., 2007). Por último, el transporte desde el *PAS* a la mitocondria o citoplasma requiere de la participación de otro complejo proteico formado por Atg1p, Atg2p y Atg18p. En la Figura 8 se muestra el esquema general del proceso de autofagia.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	48/193





**Figura 8.** Esquema resumen de los eventos más importantes que tienen lugar durante el proceso de autofagia. Las proteínas de color azul y rojo se requieren específicamente para la autofagia selectiva (vía *Cvt*) y autofagia no selectiva, respectivamente. Aquellas de color verde representan proteínas que participan en ambos procesos. *PAS* (*Pre-Autophagosomal Structure*); *Cvt* (*cytoplasm to vacuole transport*); *PE* (*PhosphatidyEthanolamine*); *HOPS* (*HOmotypic fusion and Protein Sorting*). (Modificado por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Levine y Klionsky, 2004).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	49/193



### 1.5.8 Mitofagia

La mitofagia representa un proceso selectivo por el cual la mitocondria se transporta y degrada en la vacuola mediante macroautofagia. Durante este proceso, la proteína Atg32 actúa como un receptor específico de mitofagia (Kanki et al., 2009b), que interactúa con Atg11 y Atg8 para el reclutamiento y transporte, del autofagosoma que contiene la mitocondria, a la vacuola (Fukuda y Kanki, 2018). La unión de estas proteínas es esencial para inducir la mitofagia, y la interacción de Atg32 con Atg11 requiere de la fosforilación de una serina de la proteína Atg32. Aparte de estos componentes, otros factores se han relacionado con la mitofagia como es el caso de las proteínas Atg33 y Dnm1. La primera de ellas fue identificada por Kanki et al. (2009a), aunque su función se desconoce hasta el momento, y el segundo requiere GTPasa para la fisión mitocondrial, sin embargo, estudios han demostrado que también participa en la mitofagia (Mao y Klionsky, 2013). En medios con deficiencia de nutrientes como nitrógeno, la mitofagia supone un evento esencial para mantener la viabilidad celular y de esta manera eliminar las ROS acumuladas dentro de las mitocondrias (Kanki et al., 2015).

### 1.6 Apoptosis

La apoptosis en levaduras se define como un tipo de muerte celular programada (*PCD*, *Programed Cell Death*), que implica la presencia de ciertas características morfológicas y bioquímicas efectuadas por diversos factores apoptóticos (Carmona-Gutiérrez et al., 2018) (Figura 9). Este proceso fue descubierto en células de *S. cerevisiae* que presentaban una mutación en el gen *CDC48*, requerido para la división celular, la degradación proteica dependiente de ubiquitina y el tráfico vesicular (Madeo et al., 1997). Debido a su descubrimiento en levadura, se han descrito también numerosos genes ortólogos en mamíferos como la caspasa Mca1p/Yca1p (Madeo et al., 2002), Nma111p (Fahrenkrog et al., 2004), Aif1p (Wissing et al., 2004), Ndi1p (Li et al., 2006) o el inhibidor apoptótico Bir1p (Walter et al., 2006), junto con diversas vías conservadas relacionadas con el proteosoma, la mitocondria o incluso el citoesqueleto de actina (Manon et al., 1997; Orłowski, 1999; Ludovico et al., 2002; Fannjiang et al., 2004; Gourlay y Ayscough, 2005; Pozniakovsky et al., 2005). Al igual que en mamíferos, las células de levadura también muestran ciertos marcadores de apoptosis como fragmentación del ADN, condensación de la cromatina, acumulación de ROS, exposición de la fosfatidilserina en las membranas

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	50/193



celulares y liberación de citocromo c de la mitocondria (Ludovico et al., 2002; Carmona-Gutiérrez et al., 2010). El hecho de que los organismos hayan desarrollado tal programa de suicidio celular, conservado a lo largo de la evolución, podría ser beneficioso para aquellos microorganismos que formen comunidades celulares (biofilms). Estas comunidades son estructuras dinámicas donde los miembros interactúan entre ellos. Bajo ciertas condiciones, la muerte de una sola célula, generalmente dañadas, infectadas o envejecidas, contribuiría enormemente a la supervivencia y éxito reproductor de los miembros más jóvenes de la población celular (Büttner et al., 2006; Carmona-Gutiérrez et al., 2010).

### 1.6.1 Inducción de la apoptosis

La apoptosis puede ser inducida tanto por factores exógenos (químicos, metales, drogas o expresión de proteínas heterólogas) como endógenos (mutaciones o el propio envejecimiento celular).

#### a) Factores exógenos:

- Peróxido de hidrógeno y ácido acético

Experimentos con levaduras sometidas a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido acético provocan una inducción de la apoptosis debido a la acumulación de ROS, lo que hace a estas moléculas reguladores clave en este proceso (Madeo et al., 1999). La formación de estas ROS ha sido atribuida principalmente al proceso de respiración celular que tiene lugar en la mitocondria (Pan, 2011). Entre las moléculas llamadas ROS destacan compuestos oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Un fallo en el mecanismo de defensa antioxidante de la célula resulta en la aparición del estrés oxidativo, que compromete enormemente la viabilidad y supervivencia celular.

Ciertas proteínas como la caspasa Mca1p, el factor inductor de apoptosis Aif1p o la GTPasa Rho5p se han relacionado con la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Madeo et al., 2002; Wissing et al., 2004; Singh et al., 2008). Se ha descrito que tanto el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como el ácido acético actúan como inductores de uno de los principales marcadores de apoptosis como es la fragmentación del ADN (Ribeiro et al., 2006). Bajas concentraciones de ácido acético (20-120 mM) provocan apoptosis en células de *S. cerevisiae* con crecimiento exponencial, mostrando los marcadores típicos de este proceso de muerte como son: condensación de la cromatina y fragmentación del ADN nuclear, o el aumento de fosfatidilserina en la membrana plasmática. Por otra parte, altas concentraciones de ácido

acético (200 mM) llevan a la muerte celular por necrosis, un proceso de muerte celular producido por daños celulares tales como disrupciones químicas o físicas en la membrana plasmática (Eisenberg et al., 2010). Otro de los orgánulos que participa de forma indirecta en la apoptosis inducida por ácido acético es la vacuola, ya que, en respuesta al tratamiento con ácido acético, la proteasa vacuolar Pep4p se libera de la vacuola al citoplasma, lo que provoca la degradación de la mitocondria (Pereira et al., 2010).

- Metales y sustancias tóxicas

Numerosos metales como cobre, manganeso o hierro y tóxicos como el etanol son capaces de inducir apoptosis en levaduras. Estudios realizados por Liang y Zhou (2007), describieron los efectos en levadura de dos metales, cobre y manganeso. Estos autores investigaron las rutas moleculares en las que participan estos metales y demostraron que ambos causan la muerte celular vía apoptosis, resaltando el papel clave de la mitocondria. En este contexto, altas concentraciones de hierro desencadenan la muerte celular programada debido a la producción de elevadas cantidades de radicales hidroxilo (Almeida et al., 2008). Además, estos autores investigaron el papel de la proteína Isc1p en la resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en el envejecimiento, mediante la regulación de los niveles de hierro intracelular y la apoptosis.

En cuanto a las sustancias tóxicas, la muerte celular inducida por etanol se ha estudiado muy bien en levadura (Kitagaki et al., 2007; Guaragnella et al., 2012; Pérez-Gallardo et al., 2013). Se ha observado que elevadas concentraciones de etanol durante la fermentación contribuyen a la apoptosis celular y a la generación de marcadores típicos apoptóticos. Los experimentos llevados a cabo por Kitagaki et al. (2007) concluyeron que la muerte inducida por etanol podría ser mediada por la mitocondria. Estos autores descubrieron que la proteína de fisión mitocondrial Fis1p podría estar involucrada en este tipo de muerte ya que mutantes deficientes en esta proteína exhibían altas cantidades de ROS sin embargo, no consiguieron correlacionar la fragmentación mitocondrial en respuesta a etanol con la muerte celular. Esta acumulación de ROS en respuesta a etanol también fue descrita por Pérez-Gallardo et al. (2013), aunque en este caso, esta fue atribuida a la disfunción mitocondrial debido a mutaciones de los genes *ISC* (*Inositol phosphoSphingolipids phospholipase C*) y a su sistema de ensamblaje iónico.

También se han identificado como inductores de apoptosis en levaduras el calcio (Bonilla y Cunningham, 2002; Pozniakovsky et al., 2005), la toxina osmotina de plantas

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	52/193



(Narasimhan et al., 2001), la aspirina (Balzan et al., 2004) y sustancias antitumorales (Aouida et al., 2007).

- Expresión heteróloga de genes proapoptóticos

Se ha demostrado que la expresión heteróloga de proteínas como Bax origina la muerte en levaduras, debido a la liberación del citocromo c desde la mitocondria y a la generación de ROS, características propias de su homólogo en mamíferos (Greenhalf et al., 1996; Ligr et al., 1998). Por otra parte, la expresión heteróloga de inhibidores de Bax como Bcl-2 o Bcl-xL, previene la muerte celular inducida por esta proteína, pero potencia aquella producida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido acético (Gross et al., 2000; Chen et al., 2003; Saraiva et al., 2006).

b) Factores endógenos:

- Mutaciones

Numerosos defectos por mutaciones puntuales en proteínas clave que participan en procesos como la N-glicosilación, daño en el ADN o ubiquitinación resultan en la PCD en levaduras (Mazzoni et al., 2005; Hauptmann et al., 2006; Yang et al., 2008). Entre ellas destaca el papel de la ARNt metiltransferasa-9, que es responsable de la modificación de los ARNt, mediante la regulación de la expresión de los genes implicados en la apoptosis inducida en respuesta al daño en el ADN (Begley et al., 2007) y la peroxiredoxina Tsa1p, relacionada en la supresión de la inestabilidad genómica (Iraqi et al., 2009).

- Envejecimiento

En levaduras, la inestabilidad genómica está relacionada con el estrés por replicación, lo que afecta tanto al envejecimiento replicativo como al cronológico (Carmona-Gutiérrez et al., 2010). El primero se define como el número finito de veces que una célula puede dividirse, mientras que el segundo supone la cantidad de tiempo en el cual una población permanece viable en las fases de crecimiento post-diaúxico y estacionaria, sirviendo a su vez como modelo para el estudio del envejecimiento en tejidos postmitóticos. Las investigaciones llevadas a cabo por Herker et al. (2004) demostraron que el envejecimiento cronológico en levaduras provoca su apoptosis mediante la visualización de marcadores típicos de este proceso de muerte como la acumulación de ROS o la activación de la caspasa. También, se ha descrito que en comunidades multicelulares de microorganismos, la apoptosis se presenta como un proceso beneficioso, ya que elimina

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	53/193



selectivamente aquellos miembros envejecidos y dañados de la población, estimulando de esta forma la supervivencia de los miembros más jóvenes, los cuales usan las sustancias liberadas por las células muertas como fuente de nutrientes (Büttner et al., 2006).

### 1.6.2 Regulación de la apoptosis

La regulación de este proceso requiere una interacción compleja entre ciertas proteínas y vías, que exhiben sus funciones en distintas localizaciones celulares (Carmona-Gutiérrez et al., 2010).

- a) Moléculas pequeñas de señalización: Entre las pequeñas moléculas que sirven de mediadoras del proceso de apoptosis se encuentran las *ROS*, el óxido nítrico (*NO*, *Nitric Oxide*) y el amoníaco. Las *ROS*, generadas a partir del metabolismo aeróbico de la célula, fueron las primeras moléculas en ser descritas como mediadoras de la apoptosis (Perrone et al., 2008). El *NO* sintetizado a partir de la L-arginina por las óxido nítrico sintasas (*NOS*, *Nitric Oxide Synthase*), ha sido asociado tanto con funciones protectoras como perjudiciales. Entre ellas se encuentran la inhibición de la apoptosis en ciertos tipos celulares a través de mecanismos que llevan a la inducción de proteínas de estrés, inhibición de la señal de transducción de la apoptosis y la supresión de la actividad caspasa, como también la liberación del citocromo c (Kim et al., 1999). Este compuesto es capaz de inducir la vía apoptótica de muerte celular mediante la activación de reguladores de la familia BCL-2 como las proteínas Bax y Bak (proteínas pro-apoptóticas) y la liberación del citocromo c de la mitocondria (Snyder et al., 2009). Además, el óxido nítrico es necesario para la fragmentación de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) *TDH3*, durante la apoptosis inducida por  $H_2O_2$ , por parte de la caspasa Yca1p (Silva et al., 2011). Almeida et al. (2007) demostraron que el bloqueo de la síntesis de *NO* provoca la disminución de los niveles de S-nitrosación en *GAPDH* y la acumulación de *ROS*, promoviendo, por lo tanto, la supervivencia celular. Otra molécula reguladora es el amoníaco, sobre todo en colonias multicelulares de levaduras, que resulta en cambios metabólicos que provocan la muerte de las células situadas en el centro de la colonia, proporcionando nutrientes a los miembros restantes de la comunidad (Váchová y Palková, 2005). Posteriormente, Santos et al. (2012) asociaron la adición de  $NH_4^+$  al medio de cultivo con la inducción de la muerte celular,

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	54/193



mediante la activación de vías de señalización de nutrientes como *TOR (Target Of Rapamycin)* y *PKA (Protein Kinase A)*, y la inactivación de la proteína quinasa Sch9.

- b) Proteosoma y la caspasa: el proceso de apoptosis resulta en la activación de una cascada de proteasas que desencadena la fragmentación de ciertas proteínas. Los miembros de la familia caspasa como el sistema proteosoma-ubiquitina han sido implicadas en estos eventos proteolíticos que tienen lugar durante la apoptosis (Drexler, 1998). La primera indicación del papel del proteosoma en la apoptosis proviene de experimentos llevados a cabo por Madeo et al. (1997). Estos autores demostraron que marcadores apoptóticos como fragmentación del ADN o condensación de la cromatina aparecieron en mutantes de levadura para el gen implicado en la división celular *CDC48*. Consecuentemente, su identificación llevó a la caracterización de su ortólogo en mamíferos (p97/VCP), implicado en la degradación proteica asociada al retículo endoplásmico. Además, estudios posteriores realizados por Ligr et al. (2001) indicaron que la proteína Stm1, sustrato proteosomal, participa en la activación de la apoptosis cuando se encuentra sobreexpresada en células una deficiencia en el sistema de degradación proteosomal.

A pesar de que la activación de la caspasa ha sido descrita como un proceso clave durante la inducción de la apoptosis, los análisis genómicos realizados en levadura no confirmaron la presencia de este tipo de proteasas. En este contexto, experimentos llevados a cabo por Madeo et al. (2002) demostraron que la proteína Yor197w (posteriormente nombrada como Yca1p), poseía cierta homología estructural con las caspasas de mamíferos, y además era capaz de regular la apoptosis ante distintos estímulos. Estos autores confirmaron también que su disrupción disminuye la muerte celular y el fenotipo apoptótico en respuesta a estrés oxidativo o envejecimiento.

- c) Factores nucleares: entre los factores nucleares conocidos por regular la apoptosis se encuentran las proteínas Nma111, Bir1 y Ste20. La primera de ellas es una serina proteasa cuya delección origina un aumento de la supervivencia sin la presencia de marcadores apoptóticos, al contrario de lo que ocurre cuando esta proteína se encuentra sobreexpresada (Fahrenkrog et al., 2004). En cuanto a Bir1p, esta proteína es la única descrita en levaduras que forma parte de las proteínas inhibidoras de apoptosis (*IAPs, Inhibitor of Apoptosis Proteins*) (Uren

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	55/193

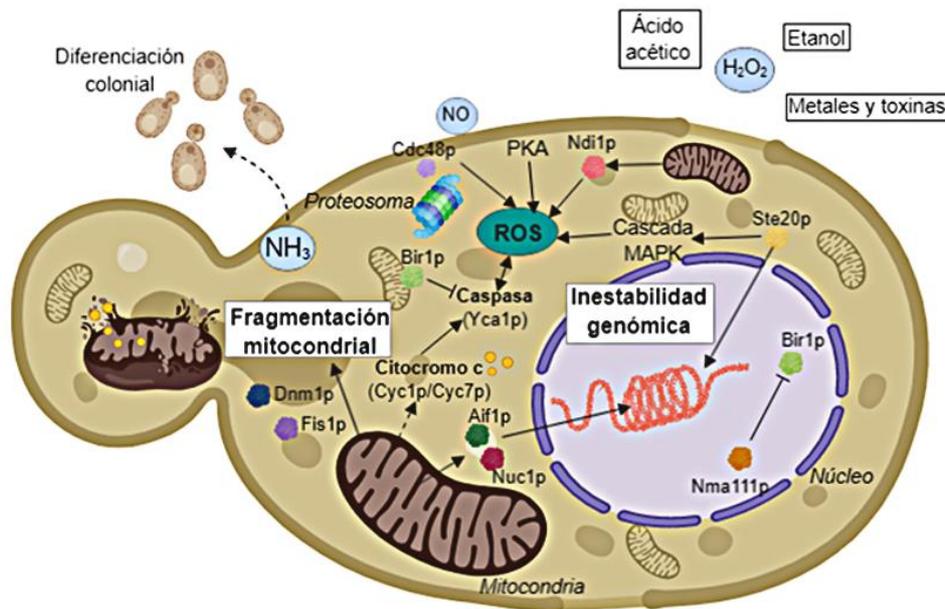


et al., 1999). Algunos estudios han confirmado que, aunque la sobreexpresión de esta proteína ha sido relacionada con la reducción de la apoptosis, esta función protectora puede ser bloqueada por la acción de la proteína Nma111 (Walter et al., 2006). Un proceso nuclear que permite el control de la muerte celular es la fosforilación de la histona H2B, reacción catalizada por la quinasa Ste20p en levadura. Ahn et al. (2005) demostraron que esta proteína, durante la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es dirigida al núcleo de una manera independiente de la caspasa y fosforila la serina 10 de la histona H2B.

- d) Factores mitocondriales: un ortólogo del factor inductor de la apoptosis (*AIF*, *Apoptosis Inducing Factor*) de mamíferos regula la apoptosis en levaduras. Esta proteína Aif1 se encuentra en la mitocondria, y en respuesta a un estímulo apoptótico, se dirige al núcleo donde es capaz de degradar el ADN (Wissing et al., 2004). Estos autores indicaron que su función apoptótica es dependiente de la caspasa Yca1p y de las ciclofilinas (CypA), además de observar también que mutantes deficientes en *AIF1* aumentaban su supervivencia durante el envejecimiento cronológico. A parte de Aif1p, otras proteínas como Ndi1 (*internal NADH dehydrogenase*) están implicadas en la apoptosis. Li et al. (2006) describieron que la sobreexpresión de esta proteína está asociada con un aumento en la producción de ROS en la mitocondria, mientras que su disrupción provoca una disminución de estas moléculas y un aumento de la viabilidad. Posteriormente, Cui et al. (2012) demostraron su papel en la apoptosis inducida por diversos estímulos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Mn y ácido acético. Estudios llevados a cabo por Büttner et al., 2007 confirmaron el papel dual de la proteína Nuc1 en la supervivencia y muerte celular, indicando que su sobreexpresión resulta en la disminución de la supervivencia y un aumento de la sensibilidad a la apoptosis, mientras que su disrupción protege contra la muerte celular de una manera dependiente de la respiración mitocondrial. Las proteínas Dnm1 y Fis1 regulan otro proceso importante que tiene lugar durante la apoptosis, la fragmentación mitocondrial (Bleazard et al., 1999; Fannjiang et al., 2004; Mozdy et al., 2000); y otras como el citocromo c (Cyc1p/Cyc7p), también se han asociado con la apoptosis en levadura (Ludovico et al., 2002; Pereira et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo por el cual el citocromo c activa la caspasa e inicia la vía apoptótica no se conoce todavía. En la Figura 9 se muestra un esquema general del proceso de apoptosis en *S. cerevisiae*.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	56/193





**Figura 9.** Principales proteínas, vías metabólicas y procesos relacionados en el proceso de apoptosis en levadura. MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*); NO (*Nitric Oxide*); NH<sub>3</sub> (amoníaco); PKA (*Protein Kinase A*); ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Carmona-Gutiérrez et al., 2010).

### 1.7 Autólisis

Durante el largo período de envejecimiento en contacto con lías, al que se ven sometidos los vinos espumosos, tiene lugar un proceso lento y asociado a la muerte celular de levaduras, conocido como autólisis, que conlleva la liberación de los componentes celulares, tanto citoplasmáticos (péptidos, lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos) como aquellos pertenecientes a la pared celular de las levaduras (glucanos y manoproteínas). La composición de las lías varía según el tipo de vino. Mientras que en los vinos tranquilos estas lías están normalmente formadas por sales de ácido tartárico y residuos orgánicos procedentes de levaduras y bacterias, las lías propias de vinos espumosos se componen principalmente de levaduras muertas junto con algún agente clarificante que favorezca la floculación (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Kemp et al., 2015). Este proceso en vinos espumosos ocurre bajo condiciones de presión (6 bares) y generalmente

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	57/193



tiene lugar al final de la fase estacionaria de crecimiento. Las bajas temperaturas descritas durante el período de envejecimiento explicarían la lentitud de este proceso de autólisis, ya que ralentizaría el proceso de muerte y las reacciones enzimáticas (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006). La liberación de los compuestos celulares durante el envejecimiento ocasiona cambios tanto a nivel estructural, sobre todo en la pared celular de la levadura, como a nivel bioquímico, los cuales modifican considerablemente las propiedades organolépticas de estos vinos.

### 1.7.1 Cambios morfológicos

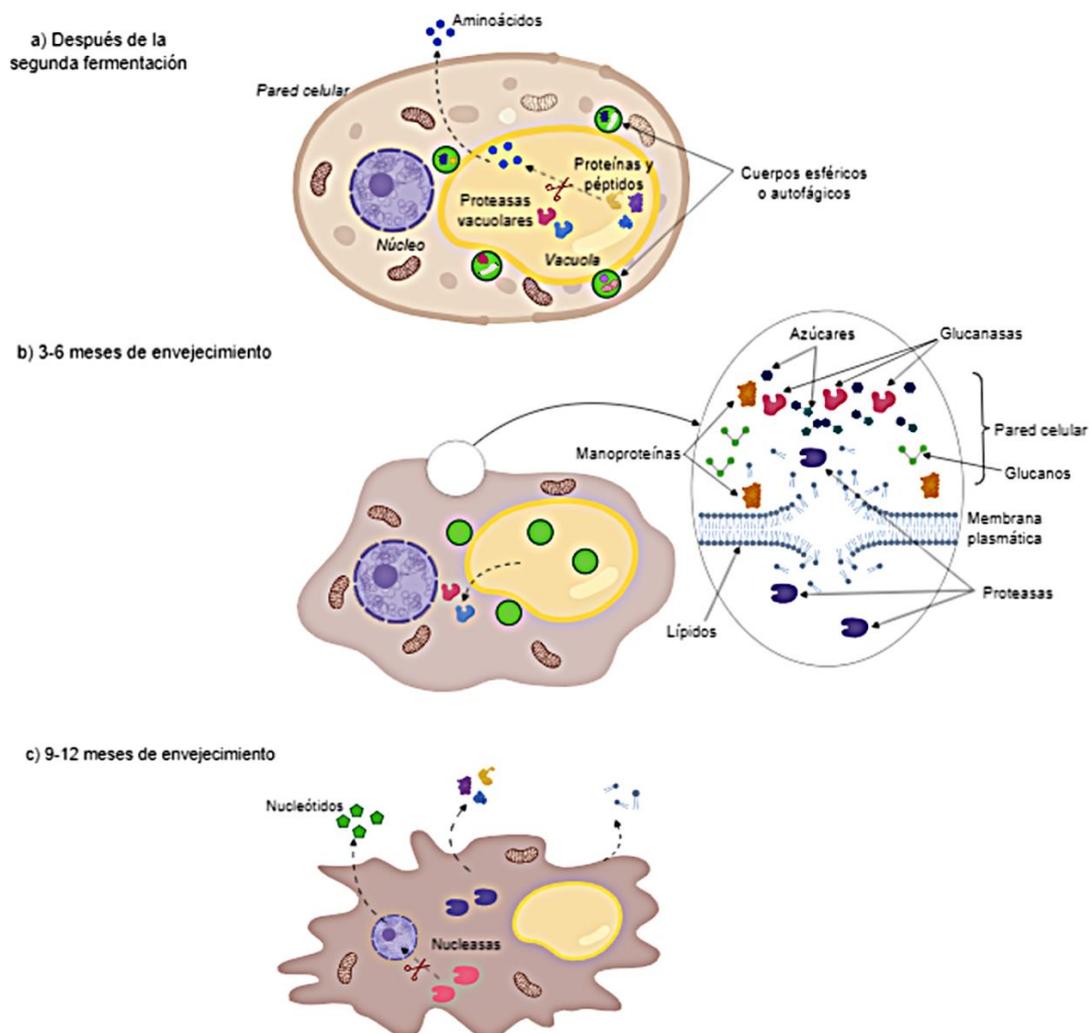
Las principales alteraciones morfológicas tienen lugar en la pared celular, cuyos componentes son degradados por las diferentes enzimas liberadas durante la autólisis (Figura 10). Así, Martínez-Rodríguez et al. (2001) observaron un mayor número de cambios estructurales y ultraestructurales mediante microscopía electrónica (incluyendo pequeño tamaño, pliegues y la presencia de cuerpos esféricos en la vacuola) en células de levadura después de 12 meses de envejecimiento en vino espumoso, que después de 24 horas de autólisis inducida. Más tarde, Tudela et al. (2012) demostraron que, a pesar de estos cambios, especialmente en la pared celular, ésta permanece intacta después de 48 meses de envejecimiento. Según Alexandre y Guilloux-Benatier (2006), se distinguen tres pasos durante la autólisis, aunque sus mecanismos de acción permanecen desconocidos hasta el momento:

- a) Después de la segunda fermentación, las células se elongan y presentan una enorme vacuola. La pared celular se vuelve delgada y muchos cuerpos esféricos o autofágicos empiezan a rodear la vacuola. En esta etapa tiene lugar una excreción de aminoácidos al vino.
- b) Entre 3-6 meses de envejecimiento, el medio continúa enriqueciéndose en aminoácidos debido a la hidrólisis de péptidos. Durante este período, se observa la presencia de pliegues en la pared celular y una pérdida de tamaño de la célula y la vacuola. La liberación de proteasas vacuolares al citoplasma tiene lugar durante la degradación de la pared celular, la cual se vuelve rugosa. Consecuentemente, el contenido en polisacáridos (tanto glucanos como manoproteínas) y lípidos aumenta en el vino.
- c) Finalmente, entre 9-12 meses de envejecimiento, el contenido en aminoácidos disminuye, aumenta la concentración de proteínas, péptidos, lípidos y también de

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	58/193



los nucleótidos debido a la acción de las nucleasas, que son liberados al vino a través de los poros de la pared celular.



**Figura 10.** Cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de autólisis. Figura modificada por el autor de esta Tesis Doctoral a partir de Alexandre y Guilloux-Benatier (2006).

### 1.7.2 Cambios bioquímicos

La segunda fermentación y el envejecimiento se consideran factores importantes para distinguir los vinos espumosos de otros tipos de vinos. El proceso de autólisis tiene lugar 3-4 meses después del final de la segunda fermentación y, desde el punto de vista

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	59/193



enológico, se caracteriza por la hidrólisis de biopolímeros debido a la acción de diferentes enzimas hidrolíticas que provocan tanto la liberación de componentes citoplasmáticos (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) como de la pared celular (glucanos y manoproteínas) en el vino (Pozo-Bayón et al., 2009; Kemp et al., 2015).

### Compuestos nitrogenados

Entre los componentes liberados por las levaduras durante la autólisis, los compuestos nitrogenados (péptidos y aminoácidos) son los más abundantes y han sido considerados como los mejores marcadores de actividad proteolítica (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000). Según estos autores, la cepa de levadura usada influye en los cambios que experimentan los compuestos nitrogenados durante la elaboración de vino espumoso, y estas modificaciones tienen lugar en al menos cuatro fases claramente diferenciadas: una primera etapa (unos 40 días después del tiraje) donde aumenta el nivel de péptidos; una segunda etapa (40-90 días) en la que hay una gran actividad proteasa, causando la degradación de los péptidos en aminoácidos (Moreno-Arribas et al., 1996); una tercera etapa (90-270 días) aumentan las proteínas y péptidos, debido a la muerte celular y la gran actividad enzimática que ocurre en la autólisis; y por última, una cuarta fase (unos 270 días de envejecimiento) en la que se observó un ligero aumento en aminoácidos. Aminoácidos como prolina, ácido glutámico, lisina, leucina, arginina y ácido aspártico son considerados los más abundantes en el vino base, ya que participan como precursores de compuestos aromáticos que mejoran las propiedades organolépticas de los vinos espumosos. Aunque el comportamiento de estos compuestos no ha sido descrito en detalle, un hecho hasta ahora aceptado es que los niveles de la mayoría de los aminoácidos disminuyen durante la segunda fermentación e incrementan durante el envejecimiento, debido a la autólisis (Charpentier y Feuillat, 1993).

### Polisacáridos

La arabinosa es el principal componente azucarado en el vino base (66%), pero a lo largo de la segunda fermentación la composición de polisacáridos varía, produciendo un incremento de los polisacáridos que contienen manosa y glucosa (43 y 31%, respectivamente) (Núñez et al., 2005). Este cambio se debe a la rotura de la pared celular mediante enzimas hidrolíticas durante la autólisis, lo que conlleva a la degradación y liberación de glucanos y manoproteínas. La presencia de estas últimas se ha relacionado con la mejora de diversas características de los vinos espumosos, como la espuma y la

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	60/193



estabilidad tartárica, y del propio vino contra la formación de depósitos cristalinos proteicos (Dupin et al., 2000; Núñez et al., 2006).

### Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles, incluidos alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos volátiles, terpenos y pirazinas, son responsables del aroma de los vinos espumosos. Estos compuestos se dividen en tres grupos según su procedencia: compuestos del aroma primario o varietal (derivados de la uva), aroma secundario o fermentativo (procedentes del metabolismo de la levadura) y aroma terciario o “bouquet” (adquiridos durante el envejecimiento y maduración del vino). Algunos estudios han puesto en evidencia un incremento de los compuestos volátiles durante el envejecimiento, sin embargo, otros observaron una disminución en la concentración de ésteres y acetatos, principalmente, debido a la síntesis y degradación de estos compuestos durante el envejecimiento. Pozo-Bayón et al. (2003) detectaron un gran efecto entre la segunda fermentación y el envejecimiento sobre algunos compuestos volátiles que podrían ser útiles para distinguir los vinos Cava de distintos años. Estudios más recientes han observado cambios en los compuestos responsables del aroma bajo condiciones de presión típicas de la elaboración de vino espumoso (Martínez-García et al., 2017). Se podría pensar que la segunda fermentación y el envejecimiento son los únicos factores que afectan a la composición de los compuestos volátiles, pero hay otros aspectos relacionados con la capacidad de las levaduras para absorber estos compuestos (Caridi, 2006), la interacción con las manoproteínas (Chalier et al., 2007) y también el uso de agentes clarificantes, que se han atribuido a la modificación de los compuestos volátiles en los vinos espumosos, aunque todavía no ha sido observado en vinos Cava.

### Lípidos y ácidos nucleicos

Aunque los lípidos y ácidos nucleicos están presentes a bajas concentraciones en el vino, éstos podrían contribuir a la mejora de las características organolépticas en los vinos espumosos. Según los estudios realizados por Pueyo et al. (2000), los lípidos más abundantes durante la segunda fermentación son los ésteres de esterol (8.6%), esteroides (3.8%) y triglicéridos (2%). Estos autores también sugirieron que este tipo de compuestos podría tener una gran influencia en las propiedades sensoriales de los vinos espumosos, y más concretamente, en la calidad de la espuma. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que no todos los lípidos afectan positivamente a las propiedades del vino. En

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	61/193



este contexto, los ácidos grasos libres C8, C10 y C12 afectan de forma negativa a la espuma del vino, mientras que los ésteres etílicos de ácido hexanoico, octanoico y decanoico afectan positivamente, y según Gallart et al. (2002) esto se debe a la diferente tasa de esterificación durante la segunda fermentación y el envejecimiento. Actualmente, las alteraciones en el contenido lipídico de los vinos espumosos es el objetivo principal de muchos estudios. Se ha observado que los lípidos incrementan durante la segunda fermentación y disminuyen a lo largo del envejecimiento, ya que estos compuestos intervienen en la formación de ésteres o aldehídos (Charpentier y Feuillar, 1993).

Por otra parte, los ácidos nucleicos también se encuentran en bajas concentraciones y son los menos estudiados. Trabajos basados en la autólisis durante el envejecimiento de los vinos Champagne describieron una correlación entre la pérdida de biomasa de los ácidos nucleicos en materia seca y su incremento en el vino (Leroy et al., 1990). Además, confirmaron el aumento de la actividad RNasa intracelular durante la segunda fermentación, lo que podría estar asociado con el alto contenido de ácidos nucleicos observado en el vino, sin embargo, esta actividad disminuye al final de la segunda fermentación. Posteriormente, Hernawan y Fleet, 1995 mostraron una degradación de aproximadamente el 90% del ARN y el 40% del ADN celular durante la autólisis. Aunque algunos nucleótidos como los nucleótidos de monofosfato se usan en la industria alimentaria como saborizantes, se requieren más estudios para clarificar el impacto real de estos compuestos en la calidad del vino.

## 1.8 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos y de origen endosimbiótico que se encuentran en los organismos eucariotas. Debido al papel de estos orgánulos en procesos que derivan en la generación de ATP como la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs, se conocen como las “centrales energéticas” de las células. Las mitocondrias disponen de su propio genoma, el cual representa el 15 % del genoma celular total (Williamson, 2002). Se estima que el tamaño de este genoma podría ser alrededor de unas 75 kb, suficiente para codificar unas 1000 proteínas. A pesar de su gran tamaño, sólo 30-40 genes se han descrito que codifican principalmente proteínas necesarias para la fosforilación oxidativa, ARNr y ARNt. Sólo 8 proteínas son codificadas dentro de la mitocondria de levadura, como son las subunidades de los complejos III (Cytb), IV (Cox1, Cox2, Cox3) y V (Atp6,

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	62/193



Atp8, Atp9), pertenecientes a la cadena de transporte electrónico, y la proteína ribosomal Var1. El resto de las proteínas se codifican en el citoplasma, y posteriormente se dirigen a la mitocondria mediante señales localizadas en sus extremos N-terminal. Aparte de procesos relacionados con la generación de energía o la síntesis de proteínas, las mitocondrias participan también en el transporte e importe de proteínas, metabolitos e iones; metabolismo de ROS, aminoácidos y lípidos; y síntesis del cluster Fe-S y de hemo (Vögtle et al., 2009; Malina et al., 2018). También, se le ha atribuido un papel en la apoptosis (Guaragnella et al., 2012). Estos procesos se explican en detalle a continuación y se esquematizan en la Figura 11.

1.8.1 Ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos: este ciclo, que tiene lugar en la matriz de la mitocondria, se requiere en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, y proporciona energía bajo condiciones aeróbicas. El piruvato obtenido a partir de la glucólisis entra en la mitocondria mediante transportadores y a través del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa es convertido en acetil-coA, que es incorporado al ciclo. En este ciclo tienen lugar diversas reacciones enzimáticas:

- I. Oxalacetato → Citrato: el primer paso es la conversión del oxalacetato a citrato mediante la acción de la enzima citrato sintasa o Cit1, la cual activa el acetil-coA para hacerlo afín al oxalacetato.
- II. Citrato → Isocitrato: la enzima acotinasa o Aco1 cataliza esta isomerización por la formación del cis-aconitato.
- III. Isocitrato →  $\alpha$ -cetoglutarato: esta conversión, es llevada a cabo por la isocitrato deshidrogenasa, formada por las subunidades Idh1 e Idh2. Además, para esta reacción se requiere la reducción del  $\text{NAD}^+$  a NADH.
- IV.  $\alpha$ -cetoglutarato → Succinil-coA: esta segunda reacción de descarboxilación oxidativa necesita nuevamente de la reducción del agente  $\text{NAD}^+$  a NADH, y es realizada por la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa la cual está formada por tres subunidades (Kgd1, Kgd2 y Lpd1).
- V. Succinil-coA → Succinato: la enzima succinil-coA sintetasa (Lsc1 y Lsc2) se sirve de la energía del succinil-coA para fosforilar un nucleósido difosfato purínico como el GDP y formar un intermediario

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	63/193



de alta energía como el succinil fosfato. De manera sucesiva, el fosfato se elimina generándose el producto succinato.

- VI. Succinato → Fumarato: esta conversión se lleva a cabo en tres pasos (oxidación, hidratación y segunda oxidación) que permiten la regeneración del oxalacetato. Estos pasos son catalizados por el complejo succinato deshidrogenasa (Sdh1, Sdh2, Sdh3 y Sdh4). Durante la conversión se genera FADH<sub>2</sub>.
- VII. Fumarato → Malato: esta reacción de hidratación es catalizada por la enzima fumarasa o Fum1.
- VIII. Malato → Oxalacetato: por último, el malato producido en el paso anterior es oxidado generando de nuevo oxalacetato. Esta reacción es realizada por la enzima malato deshidrogenasa o Mdh1 y se libera una molécula de NADH.

Bajo condiciones anaeróbicas, propias de procesos fermentativos, las enzimas del TCA permanecen reprimidas tanto por la ausencia de oxígeno, necesario para la oxidación de cofactores como el FADH<sub>2</sub> o el NADH, como por la concentración de glucosa. A pesar de esto, el ciclo sigue funcionando, aunque de manera parcial, mediante una vía oxidativa generando 2-oxoglutarato o  $\alpha$ -cetoglutarato, y otra vía reductora formando fumarato (Camarasa et al., 2003).

- 1.8.2 Fosforilación oxidativa: Como se mencionó con anterioridad, la función principal de la mitocondria es la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, a través de una vía enzimática que consiste en cinco complejos enzimáticos que están localizados en el interior la membrana mitocondrial interna. Esta vía se subdivide en la cadena de transporte electrónica (ECT), formada por los complejos del I al IV, y la F1F0-ATP sintasa (Complejo V). La ECT está formada por: Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa (el único complejo de la ECT que difiere considerablemente entre mamíferos y levaduras respecto a su estructura), Complejo II o succinato-ubiquinona oxidoreductasa, Complejo III o ubiquinona-citocromo-c oxidorreductasa y Complejo IV o citocromo-c oxidasa (Vedel et al., 1999; Macedo-Márquez, 2012). El Complejo I es el punto de entrada para la transferencia de electrones, aceptando los electrones procedentes del NADH (los del FADH<sub>2</sub> son aceptados por el complejo II), los cuales son donados

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	64/193



al Complejo III a través de la ubiquinona, después se transfieren al Complejo IV a través del citocromo c y finalmente son aceptados por el oxígeno produciendo agua (Vartak et al., 2013). La transferencia de electrones está acoplada con el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, debido al flujo energéticamente favorable de los electrones. Este desplazamiento genera como resultado tanto un gradiente de pH como de voltaje, que conducen a los protones de nuevo hacia el interior de la matriz, lo que origina un gradiente electroquímico de protones que ejerce una fuerza protón-motriz. El Complejo V genera una vía hidrofílica a través de la membrana mitocondrial interna, que permite fluir a los protones a favor de su gradiente electroquímico, que se utilizan para la síntesis de ATP (Alberts et al., 2008). Este gradiente no solo permite la síntesis de ATP, sino que, además, favorece el transporte de metabolitos y proteínas a través de la membrana interna (Stuart, 2008; Bouchez y Devin, 2019). Actualmente, se considera que estos complejos no se organizan como enzimas aisladas distribuidas de forma independiente en la membrana mitocondrial interna (modelo de mosaico fluido), sino que se asocian en diferentes ensamblajes supramoleculares, conocidos como supercomplejos o respirasomas (Barrientos y Ugalde, 2013). En levaduras se han descrito tres supercomplejos: el supercomplejo mitocondrial deshidrogenasa (Ndi1, Nde1 y Nde2 asociadas con otras NADH deshidrogenasas), el supercomplejo citocromo bc1-COX, que presenta dos formas predominantes (III2-IV2 y III2-IV) y el complejo dimérico/oligomérico F1F0-ATP sintasa (Stuart, 2008). La formación de estos supercomplejos se ha propuesto como un mecanismo dinámico que confiere ciertas ventajas a la célula, como la mejora de la transferencia de los electrones a través de la canalización del sustrato, aumenta la prevención de ROS y ayuda en el ensamblaje y estabilización del complejo I (Barrientos y Ugalde, 2013). Sin embargo, la función concreta, el grado de interacción y las proteínas que colaboran en la formación de estos supercomplejos todavía no se conocen.

- 1.8.3 Transporte e importe de proteínas: las proteínas que se sintetizan en el citoplasma necesitan unas señales específicas que se encuentran en sus extremos amino terminales para dirigirse a la mitocondria. Estas secuencias son reconocidas por sistemas proteicos acoplados a la membrana externa (complejos *TOM*, *Translocase of the Outer Membrane*) e interna (complejos *TIM*, *Translocase of*

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	65/193



*the Inner Membrane*) mitocondrial. Una vez dentro, existen diferentes vías de transporte e importe según el tipo de precursor (Dudek et al., 2013):

- $\beta$ -Barriles: la biogénesis de estos precursores proteicos requiere de la participación de complejos de chaperonas localizados en la membrana interna y del complejo *SAM* (*Sorting and Assembly Machinery*) de la membrana externa. La integración de estas proteínas desde la membrana interna a la externa precisa de una señal específica llamada señal  $\beta$ .
- Proteínas con señales ricas en cisteína: estos precursores son importados mediante la vía *MIA* (*Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly*), responsable de la formación de puentes disulfuro. El receptor Mia40 y la proteína Erv1 son componentes esenciales de esta vía (Herrmann y Riemer, 2012). Estas proteínas entran inicialmente a través del complejo *TOM* y son unidas a Mia40, que añade puentes disulfuro a la proteína. Esta acción necesita de la oxidación de Mia40 y su posterior reoxidación a través de Erv1, derivando los electrones a la cadena respiratoria.
- Proteínas con segmentos  $\alpha$ -hélice: los precursores de estas proteínas integrales de membrana externa, al igual que los  $\beta$ -barriles, son sintetizadas en el citoplasma. Los principales componentes responsables del importe de estos precursores son los receptores Tom20, Tom70 y la proteína Mim1, que se encarga de insertar las proteínas en la bicapa lipídica (Dudek et al., 2013).
- Proteínas con pre-secuencia o pre-proteínas: la mayoría de los precursores mitocondriales poseen una secuencia de aminoácidos en su extremo N-terminal para permitir su importe a la membrana interna o matriz. Estas señales son reconocidas por el complejo *TOM* y posteriormente por el receptor Tim23. La translocación a la matriz requiere además de la participación de otro complejo llamado *PAM* (*Presequence-Associated Motor*) (Malina et al., 2018).
- Transportadores de metabolitos: muchas de las proteínas integrales de membrana externa mitocondrial pertenecen a la familia de los transportadores de metabolitos. Estos precursores son importados

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	66/193



dentro de la mitocondria a través del complejo *TOM* y después se unen a pequeñas chaperonas Tim9 y Tim10. Tras ello, estos precursores se dirigen al complejo *TIM22*, mediante la interacción con las chaperonas, que permite su integración en la membrana interna mitocondrial.

- 1.8.4 Metabolismo de especies reactivas de oxígeno: las especies reactivas de oxígeno (*ROS*) se producen por la pérdida o liberación de electrones durante el metabolismo aeróbico, e incluyen al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Estos *ROS* han sido implicados en procesos como el envejecimiento (Pan et al., 2011), biogénesis mitocondrial (Chevtzoff et al., 2010) y apoptosis (Perrone et al., 2008). La acción de las enzimas superóxido dismutasas Sod1 y Sod2 resulta esencial para regular la concentración interna de superóxido, ya que lo convierte en  $H_2O_2$ . Este compuesto a su vez puede ser transformado en agua y oxígeno molecular gracias al papel que desempeñan las catalasas Cta1 y Ctt1, y las tiol peroxidadas, que se dividen en peroxiredoxinas (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Dot5 y Prx1) y glutatión peroxidadas (Gpx1, Gpx2 y Gpx3). Además, la mitocondria dispone también de vías reguladoras que actúan como sensores de *ROS*, inducidas a través de la oxidación de proteínas que a su vez son activadas por la oxidación de los residuos de cisteína de las tiol peroxidadas (Moradas-Ferreira y Costa, 2000; Malina et al., 2018).
- 1.8.5 Metabolismo de aminoácidos: la mitocondria tiene un papel importante en el metabolismo de intermediarios en vías biosintéticas como de algunos aminoácidos, en concreto aquéllos que provienen del piruvato (leucina, isoleucina, valina y alanina), los aminoácidos ramificados, y el  $\alpha$ -cetoglutarato (glutamato, glicina, serina, arginina, lisina, metionina, prolina, treonina, aspartato o glutamina). En *S. cerevisiae*, la síntesis de isoleucina y valina tiene lugar en la mitocondria, aunque el último paso de este proceso puede tener lugar en el citoplasma. Las enzimas que participan en el proceso biosintético de ambos aminoácidos son Ilv2/6, Ilv5, Ilv3, y Bat1/2 que catalizan el último paso, ya sea en la mitocondria o en el citoplasma, respectivamente (Malina et al., 2018; Takpho et al., 2018). En cambio, para la síntesis de leucina, las enzimas Leu4/9 son requeridas para convertir el 2-oxoisovalerato en 2-isopropil-malato y posteriormente en L-leucina. Aparte de estos aminoácidos ramificados, hay otros

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	67/193



que también se sintetizan parcialmente en la mitocondria como el precursor de la arginina, la ornitina, gracias a la acción de las enzimas Arg2, Arg5,6, Arg8 y Arg7. Además de la síntesis de aminoácidos, en la mitocondria también tiene lugar su catabolismo. Debido a que estas moléculas representan la mayor fuente de nitrógeno en el vino, estos son metabolizados de manera secuencial por parte de las levaduras durante el proceso fermentativo. Aminoácidos ramificados como isoleucina, leucina, valina; aromáticos como fenilalanina, triptófano, tirosina; y otros como metionina, son asimilados por un proceso conocido como vía Ehrlich. Esta vía consiste en diferentes reacciones de transaminación y descarboxilación de los distintos aminoácidos hasta la formación de un ácido o alcohol de fusel, dependiendo de si el último paso de la vía es una reducción o una oxidación (Hazelwood et al., 2008). Numerosos estudios han demostrado el impacto de esta vía y de los compuestos volátiles generados a partir del metabolismo de aminoácidos en el aroma de los vinos (Hirst y Richter, 2016; Fairbairn et al., 2017; González y Morales, 2017). El resto de los aminoácidos no asimilados por esta vía, entran al ciclo de Krebs mediante intermediarios (Reeds et al., 1997).

- 1.8.6 Metabolismo de lípidos: Aunque el orgánulo encargado de la síntesis de lípidos es el retículo endoplásmico, la mitocondria también contribuye al metabolismo de lípidos incluyendo la síntesis de fosfolípidos y la síntesis y oxidación de ácidos grasos. Tanto la membrana interna como la externa están formadas por de fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina (*PC*, *Phosphatidylcholine*) y fosfatidiletanolamina (*PE*). Aparte de estos también existen otros como fosfatidilserina (*PS*, *Phosphatidylserine*), fosfatidilinositol (*PI*), ácido fosfatídico (*PA*, *Phosphatidic acid*), y cardiolipina (*CL*, *Cardiolipin*) (Horvath y Daum, 2013). En *S. cerevisiae*, la *PE* puede ser sintetizada mediante la descarboxilación de *PS* llevada a cabo por la enzima Psd1 o fosfatidilserina descarboxilasa 1, o a partir de la CDP-etanolamina (Horvath et al., 2012). Por otro lado, la síntesis de cardiolipina, un lípido específico de mitocondria, comienza con la formación de CDP-diacilglicerol por la enzima Cds1. A su vez este intermediario es transformado en fosfatidilglicerol-fosfato (*PGP*, *PhosphatidylGlycerol Phosphate*) mediante la acción enzimática de Pgs1, y Gep4 lo desfosforila formando fosfatidilglicerol (*PG*, *PhosphatidylGlycerol*). Por último, Crd1 convierte este producto en cardiolipina. El último paso requiere de la presencia de las enzimas Cld1 y Taz1 que catalizan el procesamiento de la *CL*. La síntesis de

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	68/193



fosfatidilcolina, puede ser sintetizada a través de un proceso de metilación a partir de la PE o mediante la vía de la CDP-colina catalizada por la quinasa Cki1. En cuanto al resto, la fosfatidilserina se obtiene de la conversión del CDP-diacilglicerol y serina a través de la enzima Pss1; el fosfatidilinositol, esencial para la formación de proteínas con anclaje *GPI*, es sintetizado por la proteínas Pis1 usando el CDP-diacilglicerol y el inositol como sustratos; y por último, el ácido fosfatídico, importante sustrato para muchas enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, requiere de dos vías distintas de acilación (las vías glicerol 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) para su síntesis (Beopoulos et al., 2011; Horvath y Daum, 2013; Mayr, 2015). Aparte de la síntesis de estos lípidos, en la mitocondria también tiene lugar la síntesis y oxidación de ácidos grasos (Hiltunen et al., 2009). La síntesis de ácidos grasos (*FAS*, *Fatty Acid Synthesis*) se puede realizar tanto en el citoplasma (*FASI*) como en la propia mitocondria (*FASII*). Esta *FAS* depende de la acción de una proteína transportadora de acilo (*ACP*, *Acyl Carrier Protein*) y la mayoría de las enzimas implicadas en levadura han sido identificadas (Hiltunen et al., 2010; Beopoulos et al., 2011). Por el contrario, la beta-oxidación de ácidos grasos es un proceso importante para el metabolismo de energía ya que libera acetil-CoA, necesario para el ciclo de Krebs y respiración. Este proceso se lleva a cabo tanto por la mitocondria como por el peroxisoma, que se encarga de procesar aquellos ácidos grasos que no son degradados por la mitocondria.

- 1.8.7 Biosíntesis del cluster Fe/S y de hemo: la síntesis del cluster Fe/S es una de las funciones esenciales de la mitocondria. Las proteínas con cofactores Fe/S participan en un amplio número de procesos importantes como la respiración o el metabolismo de aminoácidos. El  $Fe^{2+}$  necesario para su síntesis se incorpora a la mitocondria a través de transportadores de membrana Mrs3/4. La formación del cluster [2Fe-2S] puede ser dividida en tres pasos: la síntesis en la proteína Isu1, la cual requiere del complejo cisteína desulfurasa formado por las subunidades Nfs1-Isd11-Acp1, NAD(P)H, frataxina, la ferredoxina Yah1 y la reductasa Arh1; su liberación de la monotiol glutaredoxina Grx5, por la acción de chaperonas (Ssq1, Jac1 y Mge1); y su inserción en apoproteínas (Lill et al., 2012; Webert et al., 2014; Malina et al., 2018). En cuanto a la síntesis de hemo, ésta tiene lugar tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol. Este proceso comienza con la formación de 5-aminolevulinato a partir de succinil-CoaA y glicina, debido a la acción de la

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	69/193

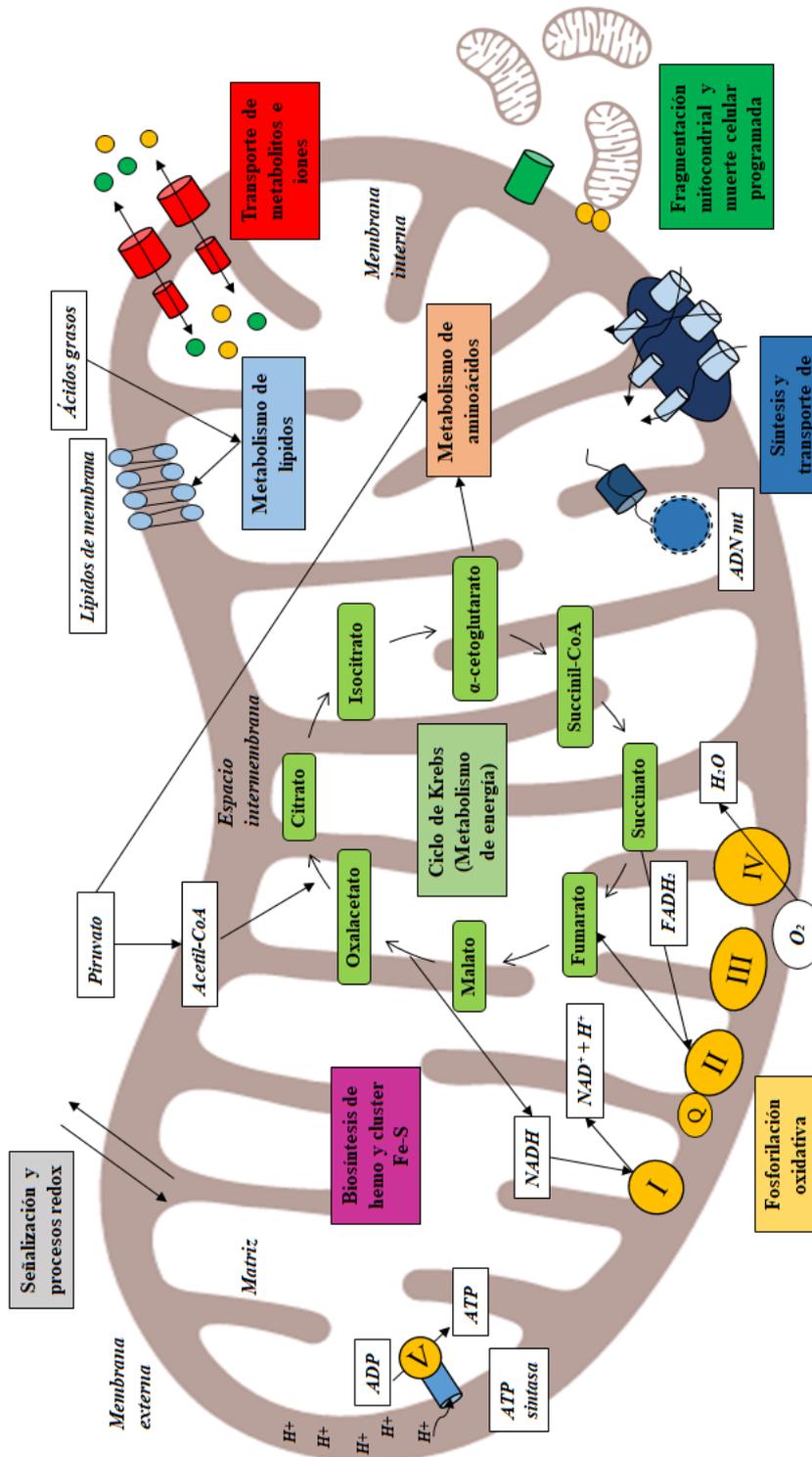


enzima Hem1. Los siguientes pasos conducentes a la generación de coproporfirinogeno III tienen lugar en el citosol y son catalizados por Hem2, Hem3, Hem4 y Hem12. Los últimos pasos hasta la formación de hemo tienen lugar de nuevo en la matriz mitocondrial y actúan las enzimas Hem13, Hem14 y Hem15 (Malina et al., 2018). Además, se ha demostrado que esta molécula se requiere para la señalización de los niveles de oxígeno y su respuesta a través del activador Hap1 (Zhang y Hach, 1999; Hon et al., 2003).

- 1.8.8 Fragmentación mitocondrial y muerte celular programada: como se sabe, la mitocondria tanto en mamíferos como en levadura participa de manera importante en las decisiones relativas a la supervivencia y la muerte celular. Este orgánulo a su vez es dinámico y continuamente cambia de tamaño y morfología (Shaw y Nunnari, 2002). Numerosos estudios han asociado a la mitocondria como regulador clave de la *PCD* (*Programmed Cell Death*) (Guaragnella et al., 2012). Estudios llevados a cabo por Ludovico et al. 2002 observaron la liberación del citocromo c al citoplasma, hecho característico de la apoptosis en mamíferos, durante la muerte celular inducida por ácido acético en levadura. Además, durante la apoptosis también se han descrito cambios morfológicos como fragmentación mitocondrial (Fannjiang et al., 2004). Frank et al., 2001 demostraron que la inhibición de genes involucrados en la fisión mitocondrial bloquea el proceso de muerte, indicando que la fisión es un paso relevante en la apoptosis.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	70/193





**Figura 11.** Esquema resumen de los procesos biológicos más relevantes que tienen lugar en la mitocondria de levadura. La ruta respiratoria incluye los complejos I-IV de la cadena de transporte electrónica y el complejo V, una ATP sintasa. Realizado por el autor de la Tesis Doctoral.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	71/193



## 1.9 Respuesta a estrés

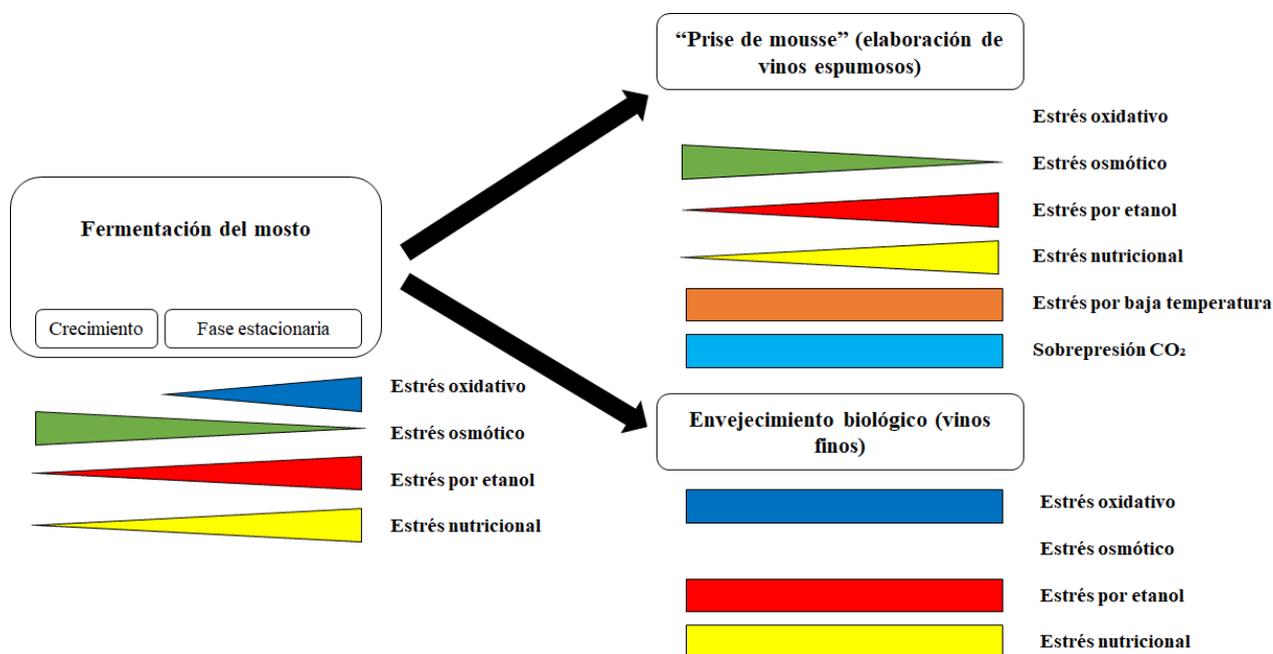
Las levaduras deben tolerar una serie de condiciones de estrés, durante la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en la uva, que comprometen su crecimiento y supervivencia, como son alto contenido en etanol, bajo pH (3-3,5) o baja disponibilidad de nutrientes. Aparte de éstos, hay otros que son más típicos de la segunda fermentación de los vinos espumosos como son baja temperatura (12-16 °C) o sobrepresión de CO<sub>2</sub> endógeno (6-7 bares) (Penacho et al., 2012; Borrull et al., 2016). En este sentido, para garantizar el éxito de este proceso fermentativo, se ha propuesto como criterio de selección de cepas la capacidad de resistir a estas condiciones adversas (Cardona et al., 2007; Borrull et al., 2015; Martí-Raga et al., 2016; Matallana y Aranda, 2017).

Entre los estreses típicos de una fermentación vínica destacan estrés osmótico, estrés oxidativo, estrés por etanol y estrés por deficiencia nutricional, generalmente azúcares y nitrógeno. Mientras que el estrés osmótico es más relevante al comienzo de la fermentación, cuando las levaduras se encuentran en fase de crecimiento exponencial, los demás aumentan a medida que la fermentación avanza, durante la fase estacionaria y hasta la muerte de las células de levadura. Esto supondría el final del proceso para la mayoría de los vinos, sin embargo, hay ciertos procesos de elaboración vínica que someten a las levaduras a condiciones aún más extremas (Matallana y Aranda, 2017). Es el caso, por ejemplo, de los vinos finos, cuyo proceso de elaboración comprende un período de crianza biológica, donde levaduras específicas (levaduras de flor) forman un biofilm o velo en la superficie del vino. Esta característica les permite metabolizar el etanol del medio, que puede llegar incluso a 15 % v/v, por medio del oxígeno de la superficie del vino, llevando a la formación de acetaldehído (Alexandre, 2013). Otro ejemplo, sería la elaboración de vinos espumosos que implica una segunda fermentación en botella, donde el vino es pobre en nutrientes, con una alta concentración de etanol, baja temperatura y, además, con sobrepresión de CO<sub>2</sub> originado por la propia fermentación. Ante tales condiciones, se ha demostrado que las levaduras, en primera instancia, reciclan su propio contenido intracelular mediante la autofagia, con el objetivo de resistir las condiciones tan extremas y prolongar su supervivencia. Sin embargo, a los 2-3 meses de acabada la segunda fermentación, las levaduras comienzan a lisarse, liberando su contenido celular al vino durante un proceso conocido como autólisis, que contribuye de manera importante a la

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	72/193



calidad y características organolépticas del producto final (Kemp et al., 2015; Cebollero and Gonzalez, 2007; Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006).



**Figura 12.** Estreses típicos durante la fermentación del mosto y las etapas post-fermentativas de la elaboración de vinos espumosos y finos. Figura modificada por el autor de la Tesis Doctoral a partir de Matallana y Aranda (2017).

### 1.9.1 Estrés osmótico

Una vez las levaduras se inoculan en el mosto, éstas necesitan adaptarse a las altas concentraciones de azúcares y así poder iniciar la fermentación. Como respuesta a estas condiciones hiperosmóticas, se ha observado que las células de levadura acumulan glicerol como osmolito o soluto compatible para recuperar el volumen celular y la turgencia. El glicerol se forma por la reducción de la dihidroxiacetona fosfato (*DHAP*, *DiHydroxyAcetone Phosphate*) a glicerol 3-fosfato por las isoenzimas glicerol 3-fosfato deshidrogenasas Gpd1/2, y este glicerol 3-fosfato es desfosforilado a glicerol por las glicerol 3-fosfatasa Gpp1/2. Estudios realizados por Jiménez-Martí et al. (2011) demostraron que la preadaptación de las cepas vínicas en medios con concentraciones crecientes de glucosa podría evitar problemas de crecimiento al principio de la fermentación y además aumentar la viabilidad celular.

Las vías señalizadoras *MAPK* son importantes para la adaptación de las células a las condiciones del medio. Entre ellas, la vía *MAPK HOG (High-Osmolarity Glycerol)*, que a la vez está comunicada con otras vías *MAPK* que controlan la morfogénesis celular, regula la síntesis de glicerol y su acumulación dentro de la célula (Cronwright et al., 2002; Hohmann, 2015). La vía comienza con la activación del sensor Sho1, mientras que el otro sensor de la vía Sln1 permanece inactivo cuando la osmolaridad externa es alta. Tras esta activación, la cual requiere de los componentes Msb2 y Hkr1, se produce una cascada donde ciertos componentes de la vía van a ser activados mediante fosforilación. El primero de ellos es Ste20, que a su vez fosforila a Ste11, y éste último a Psb2. Finalmente, Psb2 fosforila al último componente de la vía, Hog1. Éste también puede ser activado mediante fosforilación por la vía de Sln1, implicando la acción de los componentes Ypd1 y Ssk1. Tras la activación de Hog1, éste regula varios procesos celulares: primero incrementando el flujo glucolítico para la producción de glicerol; segundo, regulando la degradación de los canales de glicerol (Fps1); y tercero, activando la transcripción de genes relacionados con la síntesis de glicerol como *GPD1* y *GPPI* (Heinisch y Rodicio, 2017).

### 1.9.2 Estrés oxidativo

La producción de *ROS* ha sido tradicionalmente asociada al metabolismo aeróbico en levaduras, siendo la cadena respiratoria mitocondrial la principal fuente de estos subproductos. Sin embargo, estudios realizados por Trabalzini et al. (2003) para conocer la respuesta proteómica a los estreses típicos de una fermentación reveló que una vez se agota la glucosa en el medio, la adaptación de las levaduras parece estar enfocada a disminuir los efectos del etanol, causando estrés oxidativo entre otros. Se han puesto en evidencia genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo utilizando enfoques tanto proteómicos como transcriptómicos, principalmente debido a un metabolismo de *ROS* más activo (Zuzuarregui et al., 2006). La presencia de *ROS* también ha sido demostrada bajo condiciones enológicas, así como daño oxidativo a las estructuras celulares durante la fermentación en medios con alto contenido en azúcar (Landolfo et al., 2008). Además, Treu et al., 2014 observaron la sobreexpresión de genes asociados con la respiración y estrés oxidativo en cepas con distinto rendimiento fermentativo.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	74/193



La respuesta de las levaduras al estrés oxidativo se lleva a cabo principalmente por el factor de transcripción Yap1, el cual es activado por los sensores Ybp1 y Gpx3 que regulan su oxidación. Bajo estrés oxidativo, especialmente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la proteína Yap1 sufre un cambio conformacional mediante la formación de uniones disulfuro entre cisteínas, evitando así su unión con Crm1 (proteína nuclear), y promoviendo la transcripción de genes de respuesta a estrés oxidativo como tiorredoxinas (*TRX2*), catalasas (*CTTI*) y superóxido dismutasas (*SOD2*). Por otro lado, en ausencia de estrés oxidativo, Yap1 es reducida y transportada al citoplasma gracias a la acción de Crm1 (Heinisch y Rodicio, 2017). Aparte de Yap1, existe otro factor de transcripción que funciona en concordancia, como es Skn7 y que es capaz de desarrollar también una respuesta al estrés oxidativo, aunque de manera independiente de fosforilación (Mulford y Fassler, 2011). Este factor de transcripción puede ser activado por ROS con la consecuente migración al núcleo donde activa otros genes en respuesta a este estrés. Además, Skn7 también puede ser regulado por la vía HOG bajo estrés osmótico.

### 1.9.3 Estrés por etanol

Quizás el factor más relevante causante de estrés en levadura durante la fermentación de los vinos sea el etanol. El contenido de este metabolito en el vino puede llegar al 10 % v/v o incluso al 15-18 % v/v, dependiendo del tipo de vino a elaborar. El etanol afecta a un gran número de procesos a nivel celular, inhibiendo el crecimiento y viabilidad celular, modificando el metabolismo, induciendo la producción de proteínas de choque térmico, e incluso alterando la membrana plasmática, incrementando su fluidez y la síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol (You et al., 2003; Aguilera et al., 2006; Hu et al., 2007; Stanley et al., 2010; García-Ríos y Guillamón, 2019). Por tanto, la respuesta de las levaduras ante el estrés por etanol no es mediada por un solo grupo de genes sino por una red compleja que provoca la expresión de genes de una gran variedad de procesos. De hecho, Penacho et al. (2012) en sus estudios durante la segunda fermentación de los vinos espumosos, señalaron al etanol como el principal responsable de la adaptación de las levaduras y los cambios a nivel de expresión génica. Otros estudios a nivel genómico han revelado que se incrementa la expresión de genes asociados a la generación de energía, glucolisis, transporte, citoesqueleto, actividad mitocondrial y vacuolar, para combatir los efectos tóxicos del etanol en la célula (Teixeira et al., 2009; Stanley et al., 2010). Por otro

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	75/193



lado, genes relacionados con la síntesis proteica, procesamiento y síntesis de ARN, metabolismo de nucleótidos y aminoácidos muestran una expresión más baja durante el estrés por etanol (Alexandre et al., 2001; Chandler et al., 2004). También hay otros factores entre los que se encuentran la trehalosa y las proteínas de choque térmico (*HSPs*, *Heat Shock Proteins*) como los más estudiados, que ayudan a las células a combatir el estrés por etanol. La trehalosa se conoce por su papel como reserva de carbohidratos en levadura, y estudios llevados a cabo por Bandara et al. (2009) demostraron que también promueve la supervivencia celular durante el estrés por etanol. Estos autores usaron cepas de levadura con deleciones en genes involucrados en la síntesis (*TSL1*) y degradación (*NTH1*) de trehalosa y observaron que su efecto en la supervivencia era mayor a concentraciones letales de etanol (10-18% v/v) mientras que este fue menor a concentraciones subletales (0-9% v/v). Además, la trehalosa también tiene un papel importante en la tolerancia al etanol en células crecidas bajo estrés osmótico (Sharma, 1997; Hounsa et al., 1998). Aparte de la trehalosa, la presencia de proteínas de choque térmico (*HSP12*, *HSP26*, *HSP30*, *HSP78*, *HSP82*, *HSP104*, *SSA3* y *SSA4*), esenciales para el correcto ensamblaje proteico y prevención de daños celulares, también se han observado durante la resistencia al etanol, al igual que aquellas relacionadas con la síntesis de glucógeno (*GSY1* y *GSY2*) (Alexandre et al., 2001; Kubota et al., 2004).

#### 1.9.4 Estrés por falta de nutrientes

A lo largo de la fermentación vínica las levaduras se encuentran con concentraciones limitantes de ciertos nutrientes esenciales para su crecimiento, en especial las fuentes de nitrógeno y carbono, ante lo cual las células inhiben su crecimiento y activan ciertas vías de señalización, permitiendo la expresión de genes que responden a estos cambios en el medio.

El nitrógeno es la principal fuente de nutrientes limitante durante la fermentación vínica, ya que es esencial para el crecimiento celular y la formación de ciertos metabolitos que afectan de manera positiva a la calidad del vino, como alcoholes superiores y ésteres (Carrau et al., 2008; Barbosa et al., 2009), y cuya deficiencia ha sido asociada a la cinética de fermentación (Cramer et al., 2002; Bell y Henschke, 2005; Martí-Raga et al., 2015). Las células de levadura usan el nitrógeno principalmente durante las primeras horas de fermentación, aunque no todas las fuentes de nitrógeno favorecen de igual manera el

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	76/193



crecimiento celular. Por tanto, durante la fermentación hay un consumo selectivo de estas fuentes de nitrógeno, desarrollado por un mecanismo denominado *NCR* (*Nitrogen Catabolic Repression*) (Beltran et al., 2004). En este contexto, según estudios realizados por Crépin et al. (2012) los compuestos nitrogenados pueden ser clasificados en tres grupos de acuerdo al orden de preferencia, siendo el primero de ellos la Lys, seguida del Asp, Thr, Glu, Leu, His, Met, Ile, Ser, Gln, y Phe, y por último el amonio, Val, Arg, Ala, Trp y Tyr. Valero et al. (2003) observaron diferencias en el uso y liberación de nitrógeno asimilable en levadura bajo diferentes condiciones de oxígeno. Según estos autores, el consumo o producción de ciertos aminoácidos se podría asociar al mantenimiento del potencial redox de la célula.

La deficiencia en nitrógeno y la entrada a la fase estacionaria de crecimiento suponen un cambio importante a nivel fisiológico, que provoca la activación de vías señalizadoras y la expresión de ciertos genes. Entre las vías más relevantes en la señalización de los niveles de nitrógeno se encuentra la vía *TOR* (*Target Of Rapamycin*). Esta vía se encarga principalmente del control del crecimiento y del metabolismo bajo limitación nutricional, y está regulada por dos complejos (*TORC1* y *TORC2*) formados por sus respectivas proteínas quinasas Tor1 y Tor2. La fosforilación de *TORC1* se requiere para su actividad y para la activación de otras proteínas quinasa como Sch9 o el complejo *PP2A* formado por las subunidades Pph21/22 que regulan la actividad del complejo. Bajo limitación de nitrógeno, la actividad de *TORC1* se inhibe activándose una serie de vías requeridas para adaptarse a estas condiciones de deficiencia nutricional. Entre ellas se encuentra la expresión de genes de respuesta a estrés asociados a la reserva de carbohidratos, activación de la vía *NCR* y también de la autofagia, por la formación del complejo *ATG1* (Conrad et al., 2014; Tesnière et al., 2015). Aunque se ha visto que la deficiencia de nitrógeno conlleva cambios importantes en las células, se ha observado que la adición de este nutriente a células deficientes es suficiente para reprogramar la respuesta que estas células llevaron a cabo previamente, y volver a comenzar la fermentación (Mendes-Ferreira et al., 2007).

Además del nitrógeno, las levaduras usan la glucosa como fuente de carbono y energía. En presencia de dos fuentes de carbono en el medio, las células poseen un tipo de crecimiento llamado diaúxico que les permite seleccionar y agotar antes aquella fuente

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	77/193



de carbono que más les interese para su crecimiento. Una vez la glucosa se agota en el medio, a través de este tipo de crecimiento, las células son capaces de metabolizar otras fuentes de carbono no fermentables como el etanol. Durante esta fase las células deben activar ciertas vías y permitir la expresión de genes que intervienen en la respiración y el transporte y el metabolismo de otras fuentes de carbono (Gasch et al., 2002). Estas adaptaciones ocasionadas por la limitación de glucosa están principalmente reguladas por la quinasa Snf1 en levadura. La activación del complejo quinasa formado por la subunidad catalítica Snf1, la reguladora Snf4 y una de las tres subunidades  $\beta$  (Gal83, Sip1 o Sip2), requiere de su fosforilación mediante a la acción de las quinasas Tos1, Sak1 y Elm1. Una vez fosforilado, el complejo Snf1 se dirige al núcleo permitiendo la transcripción de genes de respuesta a fuentes de carbono alternativas, gluconeogénesis, etanol y metabolismo de ácidos grasos (Conrad et al., 2014). Además de estos procesos biológicos, la falta de glucosa en el medio causa también crecimiento invasivo dependiente de la acción de la quinasa Snf1 (Cullen y Sprague, 2000). Estudios realizados por Jona et al. (2000) demostraron que la deficiencia en glucosa reducía drásticamente la fosforilación de la ARN polimerasa II, la transcripción de la ARN polimerasa I y II, y la degradación de ARNm. Sin embargo, se ha observado que bajo condiciones limitantes de glucosa el inicio de la traducción se inhibe rápidamente en levaduras, mientras que no se afecta la transcripción (Ashe et al., 2000).

#### 1.9.5 Estrés por temperatura

La temperatura es un factor importante a tener en cuenta durante la fermentación del vino. En la industria, la temperatura se controla (sobre los 30 °C) para evitar paradas indeseables en la fermentación. Se conoce que temperaturas bajas cercanas a los 10-15 °C, como es el caso de los vinos espumosos, favorecen el mantenimiento de aromas primarios y aumentan la producción de aromas secundarios, afectando positivamente a la calidad del producto final. Sin embargo, debido a las bajas temperaturas las fermentaciones son más duraderas, requiriendo amplios períodos de envejecimiento y un mayor riesgo de paradas durante la fermentación (Beltran et al., 2008; Chiva et al., 2012). La exposición a los cambios bruscos de temperatura supondría una respuesta de adaptación rápida y coordinada. Numerosos estudios a nivel transcripcional se han centrado en la respuesta de las levaduras a las bajas temperaturas identificando varios

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	78/193



genes expresados bajo estas condiciones como aquéllos requeridos para la síntesis de trehalosa (*TPS1*, *TPS2* y *TSL1*); metabolismo del glucógeno (*GLC3*, *PGM2*, *GPH1*, *GDB1*, *GYS1* y *GYS2*); glucólisis (*GLK1*, *HXK1*, *PYK2* y *GPD1*); otros genes asociados con el estrés por frío (*HSP12*, *HSP26*, *HSP42*, *HSP104*, *YRO2* y *SSE2*); genes que codifican proteínas de pared celular (*TIP1*, *TIR1* y *TIR2*); y otros que participan en la síntesis de ácidos grasos (*OLE1*) (Kowalski et al., 1995; Nakagawa et al., 2002; Rodríguez-Vargas et al., 2002; Sahara et al., 2002; Schade et al., 2004; Murata et al., 2006; Tai et al., 2007). Estudios llevados a cabo por Beltran et al. (2006) en células fermentando a 13 °C demostraron que las bajas temperaturas favorecen la expresión de genes asociados a la respuesta a las bajas temperaturas, ciclo celular, mantenimiento y síntesis de ácidos grasos mitocondriales. Estos resultados fueron correlacionados con una mayor supervivencia celular, una mejor resistencia al etanol y un aumento en la producción de esteres y ácidos grasos. Además, Penacho et al. (2012) sugirieron como principales factores que influyen en los cambios observados en el transcriptoma de las levaduras durante la segunda fermentación de los vinos espumosos al etanol y al efecto de la baja temperatura.

#### 1.9.6 Estrés por sobrepresión de CO<sub>2</sub>

Este factor es típico del proceso de elaboración de los vinos espumosos, donde la segunda fermentación tiene lugar en la misma botella que llega posteriormente al consumidor. Durante esta etapa las células de levadura deben soportar presiones de hasta 6-7 bares que junto con los demás estreses típicos de estos vinos comprometen la supervivencia celular. Hasta ahora no hay muchos estudios enfocados en el estudio de este factor durante la segunda fermentación y en cómo afecta a las células de levadura, sin embargo, se ha observado que la presión sí juega un papel importante en el metabolismo y en la composición aromática del vino (Martínez-García et al., 2017). Aparte del aroma, la sobrepresión de CO<sub>2</sub> parece también inducir la expresión de genes relacionados con la respiración aeróbica, vacuola y peroxisoma (Penacho et al., 2012). Según estos autores, el efecto del etanol y la baja temperatura podrían estar enmascarando el posible efecto de la presión en los cambios observados en el transcriptoma.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	79/193



Ante la falta de conocimiento existente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar la respuesta de las levaduras ante la sobrepresión de CO<sub>2</sub> durante la segunda fermentación a nivel proteómico. Esto se ha llevado a cabo mediante el estudio de las proteínas asociadas a estructuras celulares (pared celular), procesos biológicos (autofagia, apoptosis, autólisis y estrés), y orgánulos (mitocondria), ya sea por su relevancia descrita en bibliografía o por su potencial papel durante la segunda fermentación en la producción de Cava. Por tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral suponen una nueva inyección de conocimiento sobre el efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en el comportamiento celular y en la futura mejora de las cepas vínicas, además de proporcionar información importante con respecto a la selección de las cepas de levaduras más adecuadas para la segunda fermentación.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	80/193



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis de partida

Las cepas de levaduras vínicas están sometidas durante el proceso fermentativo a numerosos estreses que pueden afectar a su morfología, fisiología, crecimiento y viabilidad. Algunos de estos estreses se deben a la elevada presión osmótica, agotamiento de la fuente principal de carbono (glucosa) y de nitrógeno, estrés oxidativo, pH y a la aparición de compuestos tóxicos como acetaldehído y etanol. Debido al método tradicional de producción del cava, que consiste en una segunda fermentación en botella cerrada herméticamente, las células de levadura están sometidas, además, a otros tipos de estreses como son la presión de CO<sub>2</sub> y la baja temperatura.

La plasticidad en la composición del proteoma contribuye de manera muy importante a la adaptación de las células de levadura a condiciones y agentes adversos. La hipótesis de partida en este estudio pretende comparar el perfil proteómico de cepas de levaduras vínicas bajo presión de CO<sub>2</sub> con las mismas levaduras en el mismo medio sin presión de CO<sub>2</sub> con el objeto de conocer los cambios que puedan tener lugar en las células frente a este estrés y diseñar estrategias para la mejora de estas levaduras y del proceso de producción del cava. Además, el conocimiento del comportamiento proteómico de las levaduras fermentativas es de vital importancia, ya que una buena cepa vínica debe ser capaz de superar los estreses a los que está sometida durante el proceso industrial.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto que tiene la sobrepresión de CO<sub>2</sub> sobre proteínas de levaduras durante la segunda fermentación en botella en la producción de cava.

#### 2.2.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar y comparar las proteínas relacionadas con la pared celular, floculación, adhesión celular y formación de biofilm durante la segunda fermentación en botella en dos cepas vínicas.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	81/193



- 2) Describir y estudiar las proteínas relacionadas con la autofagia, apoptosis y autólisis de levaduras vínicas que podrían mejorar la calidad del cava.  
Este objetivo se ha abordado mediante tres aspectos:
  - 2.1. Proteínas relacionadas con la autofagia durante la segunda fermentación en botella.
  - 2.2. Proteínas relacionadas con los procesos de apoptosis y autólisis durante la segunda fermentación en botella.
  - 2.3. Aceleración de la autólisis de levaduras durante la segunda fermentación en botella.
- 3) Estudiar la importancia de orgánulos celulares como la mitocondria en la segunda fermentación en botella.
- 4) Comparar las proteínas de estrés de levaduras bajo presión de CO<sub>2</sub> con proteínas de estrés sin presión.

*Artículos correspondientes a cada objetivo:*

-Objetivo 1:

“A Differential Proteomic Approach to Characterize the Cell Wall Adaptive Response to CO<sub>2</sub> Overpressure During Sparkling Wine Making Process”. Enviado a la revista *LWT-Food Science and Technology*.

-Objetivo 2:

(2.1.) “Autophagic Proteome in Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains During Second Fermentation for Sparkling Wine Elaboration”. Publicado en la revista *Microorganisms*. 8, 523. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040523>.

(2.2.) “First Proteomic Approach to Identify Cell Death Biomarkers in Wine Yeasts During Sparkling Wine Production”. Publicado en la revista *Microorganisms*. 7, 542. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110542>.

-Objetivo 3:

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	82/193



“Impact of CO<sub>2</sub> Overpressure on Yeast Mitochondrial Proteome and its Evolution During the “Prise de Mousse” of Sparkling Wine Production”. Enviado a la revista *International Journal of Food Microbiology*.

-Objetivo 4:

“Effect of Endogenous CO<sub>2</sub> Overpressure on the Yeast “Stressome” During the “Prise de Mousse” of Sparkling Wine”. Publicado en la revista *Food Microbiology*. 89, 103431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103431>.

Para conseguir estos objetivos se han utilizado los Materiales y Métodos que se describen a continuación.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	83/193



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos y condiciones experimentales

##### 3.1.1 Cepas de levadura

Las diferentes cepas de levaduras usadas en esta Tesis Doctoral proceden de instituciones como el Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba (UCO), el Instituto Catalán de la Viña y el Vino (INCAVI) de Vilafranca del Penedès, el Departamento de Agricultura de la Università degli Studi di Sassari (UNISS), y el Australian Wine Research Institute (AWRI). Las cepas  $\Sigma 1278b$  wt,  $\Delta\Sigma YGR282c$  y  $\Delta\Sigma YGL085w$  fueron suministradas por la Università degli Studi di Sassari (UNISS), sin embargo, pertenecen a una colección de mutantes cuyo origen es la Universidad de Toronto, Canadá

([http://sites.utoronto.ca/boonelab/research\\_projects/sigma\\_deletion/index.shtml](http://sites.utoronto.ca/boonelab/research_projects/sigma_deletion/index.shtml)).

Todas las cepas se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cepas de levadura usadas en los experimentos.

Cepa de levadura	Detalles	Colección
<i>P29 CECT-11770</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa industrial de vino espumoso, España)	INCAVI
<i>G1 ATCC: MYA-2451</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa industrial de vino fino, España)	UCO- Microbiología
<i>N96 ATCC: ARWI-1631</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa haploide, vino espumoso, Australia)	AWRI
<i><math>\Sigma 1278b</math> wt</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa silvestre, Italia)	UNISS
<i><math>\Delta\Sigma YGR282c</math></i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa mutante, Italia)	UNISS
<i><math>\Delta\Sigma YGL085w</math></i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa mutante, Italia)	UNISS
<i>CBS 4417</i>	<i>Tetrapispora phaffii</i> (cepa killer, Italia)	UNISS
<i>Mutante 38</i>	<i>Pichia pastoris</i> (cepa mutante, Italia)	UNISS

##### 3.1.2 Medios de cultivo y condiciones de fermentación

Se usaron diversos medios de cultivo cuyo nombre y composición se indican en la Tabla 3. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y el material se esterilizó previamente a 120 °C durante 20 min en autoclave (Selecta Presoclave 75),



excepto aquellos medios que contenían etanol, que se esterilizó por filtración, mediante un filtro de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore).

Las fermentaciones en botella para el estudio proteómico de la segunda fermentación (Figura 13), se monitorizaron siguiendo el correspondiente protocolo del INCAVI. Las cepas *S. cerevisiae* P29 y G1 crecieron previamente en medio YPD a 21 °C durante 48 h. Estos medios se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min a 4 °C en una centrifuga Rotina 38R Hettich y se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, cada cepa se inoculó (1.5 x 10<sup>6</sup> células/mL) por triplicado, en un mosto pasteurizado (Tabla 3) como medio de aclimatación, usando una ligera agitación (100 rpm) durante 5 días a 22 °C.

Una vez se alcanzaron valores altos, tanto de concentración celular (1.5 x 10<sup>8</sup> células/mL en el caso de P29 y 1 x 10<sup>8</sup> para G1), como de viabilidad (97 % en el caso de P29 y 90% para G1) y un contenido en etanol similar al del vino base (10.39 % v/v), se procedió al filtrado del mosto, usando un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro, y posterior llenado de botellas de 750 mL en la etapa de tiraje. Para ello, una concentración celular de 1.5 x 10<sup>6</sup> células de levadura/mL de cada cepa se inocularon en botellas con una mezcla de fermentación, consistente en un vino base comercial estandarizado (Tabla 3) adicionado con 22 g/L de sacarosa. Se usaron en total 24 botellas (12 por cepa). Las botellas correspondientes a la condición con presión o CP se cerraron con un tapón de plástico y un obturador metálico, mientras que las botellas representando la condición control sin presión o CNP, se cerraron con un tapón perforado para evitar la acumulación de CO<sub>2</sub> dentro de la botella. Ambos grupos de botellas se incubaron en cámara a una temperatura controlada de 14 °C. La cinética a lo largo de la segunda fermentación se llevó a cabo midiendo los valores de presión con un afrómetro interno (Oenotilus, Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France).

**Tabla 3.** Nombre y composición de los medios de cultivo usados en esta Tesis.

Medios de cultivo	Composición
<i>YPD líquido/ YPD-agar</i>	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % dextrosa, 2 % agar (cuando sea requerido)
<i>YPD-Etanol</i>	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % dextrosa, 4-8 % v/v etanol
<i>Extracto de malta líquido/ agar</i>	1.5 % (líquido) ó 3.36 % (agar) tamponado a pH 4.6 con 0.1 M de tampón citrato-fosfato



<b>Medio de esporulación (ME)</b>	- <u>pre-ME</u> : 1 % extracto de levadura, 0.25 % acetato de potasio, 0.1 % glucosa, 2 % agar - <u>ME1</u> : 0.01 % extracto de levadura, 1 % acetato de potasio, 0.5 % glucosa, 2 % agar - <u>ME2 (medio mínimo)</u> : 0.5 % acetato de potasio, 2 % agar
<b>Vino sintético (pH 3.3)</b>	- <u>solución 1 (300 mL)</u> : 0.1 % glucosa, 0.1 % fructosa, 0.2 % ácido tartárico, 0.05 % ácido málico, 0.46 % glicerol - <u>solución 2 (60 mL)</u> : 1 % v/v etanol, 0.05 % ácido acético, 0.067 % YNB, 0.0094 % metabisulfito de potasio (después del inóculo) - <u>solución 3 (40 mL)</u> : 2.2 % glucosa (después del inóculo) - <u>Suplemento nutricional</u> : 0.41 % adenina HCl, 0.1 % L-histidina HCl monohidrato, 0.63 % L-leucina, 0.44 % L-lisina HCl, 0.96 % L-metionina, 0.25 % L-triptófano, 0.16 % uracilo
<b>Mosto pasteurizado</b>	Macabeo: 174.9 g/L glucosa, 3.6 g/L acidez total, 18.5 °Brix, pH 3.4
<b>Vino base comercial</b>	Macabeo y Chardonnay (6:4): 10.21 % v/v etanol, 0.3 g/L glucosa, 5.4 g/L acidez total, 0.21 g/L acidez volátil, pH 3.29
<b>BMGY</b>	0.1 % extracto de levadura, 0.2 % peptona, 10 % YNB, 0.2 % biotina, 10 % glicerol, 0.2 % EDTA 0.3 M (tamponado a pH 4.6 con 0.1 M tampón citrato-fosfato)
<b>BMMY</b>	0.1 % extracto de levadura, 0.2 % peptona, 10 % YNB, 0.2 % biotina, 5 % metanol, 0.2 % EDTA 0.3 M, 1 % PMSF 100 mM (tamponado a pH 4.6 con 0.1 M tampón citrato-fosfato)
<b>Agar Sabouraud (pH 5.6)</b>	4 % glucosa, 1 % pluripeptona, 1.5 % agar

### 3.2 Análisis proteómico

#### 3.2.1 Muestreo

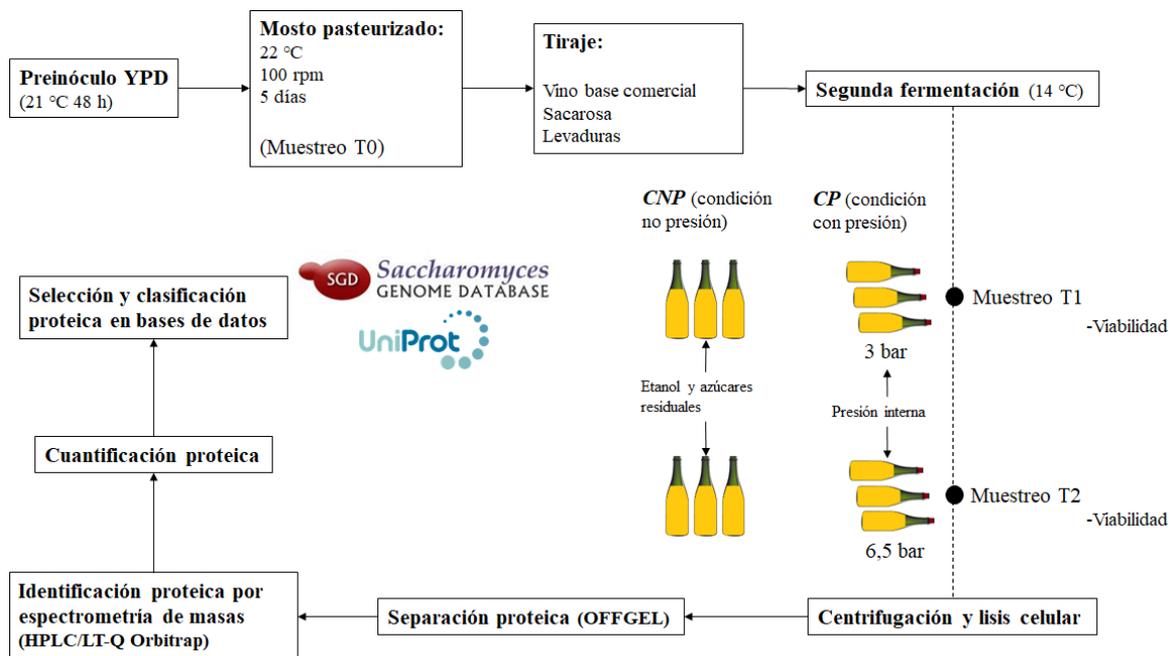
Las muestras se obtuvieron a partir de 3 botellas al azar, a diferentes tiempos según el valor de presión alcanzada: a mitad de la segunda fermentación o tiempo 1 (T1), cuando se obtuvo una presión de 3 bares; y un mes después de alcanzada el máximo de presión de 6.5 bares o tiempo 2 (T2). El mismo procedimiento se llevó a cabo en las botellas control, aunque en este caso se tuvo en cuenta el contenido similar de etanol y azúcares residuales en ambas condiciones. También, como referencia se recogieron muestras del mosto fermentado a los 5 días (Tabla 3) para cada cepa, representando el tiempo 0 (T0). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

#### 3.2.2 Extracción de proteínas

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	86/193



Las células se centrifugaron (5000 x g, 5 min a 4 °C) y lavaron 2 veces con abundante agua destilada estéril. Después, estas se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción (100 mM de Tris-HCl a pH 8, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT y 1 mM PMSF) suplementado con un inhibidor de proteasas (Roche), según las instrucciones del fabricante. Las células se lisaron mediante un Vibrogen Cell Mill V6 (Edmund Bühler) con un volumen de bolas de vidrio (425-600 µm, Sigma-Aldrich) equivalente al del tampón de extracción que contiene la pella (15 pulsos de 1 min seguidos de 30 s en hielo). Las bolas de vidrio y restos celulares se eliminaron por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4 °C. Las proteínas precipitaron mediante incubación durante la noche a -20 °C tras la adición de 10 % m/v de ácido tricloroacético (*TCA*, *Trichloroacetic acid*) y 4 volúmenes de acetona fría al sobrenadante. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 30 min a 4 °C, y las pellas resultantes se secaron al vacío usando un Speedvac (Eppendorf concentrator 5301) y se resuspendieron en tampón de solubilización (8 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS y 1 % DTT). La concentración de las proteínas se estimó siguiendo el método de Bradford (1976) y todas las muestras se almacenaron a -80 °C antes del análisis.



Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Página	87/193



**Figura 13.** Flujo de trabajo desarrollado para el análisis proteómico. Se ilustran las diferentes etapas: diseño experimental y muestreo, lisis celular, extracción de proteínas, separación de proteínas mediante *OFFGEL*, digestión de las proteínas con tripsina, análisis de los péptidos resultantes mediante espectrometría de masas, identificación y cuantificación de proteínas, mediante el empleo de algoritmos y bases de datos.

### 3.2.3 Identificación y cuantificación de proteínas

El fraccionador de alta resolución *OFFGEL* pH 3-10 de Agilent Technologies (Palo Alto, California) se usó para separar las proteínas mediante su punto isoeléctrico en solución. El fraccionamiento previo de proteínas y péptidos antes del análisis *LC/MS*, puede aumentar drásticamente el número de proteínas identificadas. El equipo *OFFGEL* Agilent 3100 de Agilent Technologies, utiliza una nueva técnica de isoelectroenfoque donde las fracciones resultantes están en solución, haciendo la recuperación para el análisis *LC/MS* mucho más fácil que con los geles clásicos.

Las muestras proteicas totales (450 µg) se solubilizaron en tampón de fraccionamiento para *OFFGEL* (urea, tiourea, ditiotreitól, glicerol y tampón con anfólitos según Agilent Technologies, No. 5188-6444), y distribuidas en alícuotas en la bandeja de 12 pocillos del fraccionador *OFFGEL* 3100 (Agilent Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los límites de separación del programa OG12PR00 fueron: 4500 V, 200 mW y 50 µA; voltaje inicial de 200-1500 V; voltaje final de 5000-8000 V; tras la aplicación de 20 kVh (de acuerdo con el fabricante). Para la separación de proteínas se mantuvo un voltaje constante.

En cuanto a la digestión de las proteínas de cada pocillo, se añadió a las muestras ditiotreitól 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio (*AB*, *Ammonium Bicarbonate*), las cuales se incubaron durante 20 min a 55 °C para trabajar en condiciones reductoras. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la alquilación de tioles libres añadiendo 40 mM iodoacetamida en 25 mM *AB* durante 20 min (en oscuridad). La digestión proteolítica se llevó a cabo añadiendo 12.5 ng/µl de tripsina (Promega) en *AB* 25 mM e incubando la muestra a 37 °C durante toda la noche. La digestión con tripsina se detuvo añadiendo ácido trifluoroacético al 1 % de concentración final y las muestras digeridas se secaron finalmente al vacío en un Speedvac (Eppendorf concentrator 5301).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	88/193



Los péptidos se escanearon en el SCAI (Servicio Central de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Córdoba, mediante un sistema *HPLC*, nano *LC UltiMate 3000* fabricado por Dionex (Sunnyvale, CA, USA), acoplado a un espectrómetro de masas *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA).

El voltaje del electrospray se fijó a 1300 V y el voltaje capilar fue de 50 V a 190 °C. El sistema *LTQ Orbitrap* se operó en modo paralelo, lo que permitió una medida más precisa de escaneo del ion precursor (400-1500 m/z) y ofreció una resolución de *FWHM* (*Full Width at Half Maximum*) de 60000 a 400 m/z, concurrente con la adquisición dato-dependiente de tres escaneos *MS/MS* en el analizador de trampa de iones lineal (*LIT*, *Linear Ion Trap*) para la secuencia de péptidos, seguida por tres escaneos *MS/MS* dato-dependientes mediante *HCD* (*Higher-energy Collisional Dissociation*) operados a 100-2000 m/z con una resolución *FWHM* de 7500 a 400 m/z para la secuenciación y cuantificación de los péptidos. Las energías de colisión normalizadas fueron del 40 % para *HCD* y 35 % para *CID* (*Collision-Induced Dissociation*). Los tiempos máximos de inyección para *MS* y *MS/MS* se establecieron a 50 y 500 ms, respectivamente. La anchura para el aislamiento del ion precursor fue de 3 Da y la anchura de la masa de exclusión se determinó a 5 ppm. La selección del precursor monoisotópico fue permitida y se eliminaron las especies con carga individual. Los límites de intensidad mínima para el *MS/MS* y la trampa de iones lineal fueron 500 y 8000 conteos, respectivamente.

Se desarrolló una búsqueda en la base de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) considerando la modificación de carbamidometilación en residuos de cisteína. Consecuentemente, los resultados del proteoma se analizaron estadísticamente mediante el *software Proteome Discoverer 1.0* de Thermo Fisher Scientific (San José, California, USA). Se estableció un valor de *score* de 0.5 para la detección de proteínas. Una vez identificadas, estas proteínas se compararon a través del índice de abundancia proteica exponencialmente modificado (*emPAI*, *exponentially modified Protein Abundance Index*) (Ishihama et al., 2005), obtenido de la siguiente forma:

$$\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$$

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	89/193



El valor de índice de abundancia proteica (*PAI, Protein Abundance Index*) para cada proteína se calculó dividiendo el número de péptidos observados por proteína entre el número de péptidos observables por proteína, usando para ello el *software MS Digest*. A su vez, el contenido proteico se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Protein content (mol \%)} = \frac{\text{emPAI}}{\Sigma (\text{emPAI})} \times 100$$

Las proteínas identificadas se clasificaron usando la sección “*Gene Ontology*” (GO) de la base de datos *SGD (Saccharomyces Genome Database, <https://www.yeastgenome.org/>)* y *Uniprot*. Diferentes ontologías (*process* y *component*) se utilizaron según el estudio proteómico a realizar:

- Apoptosis, autofagia y autólisis: “*process*” (para el caso de la apoptosis y autofagia se usaron términos como “*apoptosis*”, “*apoptotic cell death*” y “*autophagy*”; mientras que para la autólisis las proteínas fueron seleccionadas en base al tipo de actividad enzimática: “*glucanases*”, “*proteases*”, “*peptidases*”, “*mannosidases*”, “*nucleases*”).
- Pared celular y floculación: “*component*” y “*process*” (para llevar a cabo una selección más específica de sólo aquellas proteínas localizadas en la pared celular se usó la herramienta “*Subcellular location*” de *Uniprot*. Los términos usados en *SGD* fueron: “*cell wall*” y “*fungus type cell wall*”; “*flocculation*”, “*cell adhesion*” y “*biofilm formation*”).
- Respuesta a estrés: “*process*” (“*response to stress*”).
- Mitocondria: “*component*” “*mitochondrion*” (para llevar a cabo una selección más específica de sólo aquellas proteínas localizadas en este orgánulo se usó la herramienta “*Subcellular location*” de *Uniprot*).

### 3.3 Viabilidad celular

La concentración total de células se calculó usando un contador de partículas Beckman Coulter Z2. Para ello, un volumen de 0.1 mL de cada muestra (previamente diluida) se mezcló con 39.9 mL de solución isotónica, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	90/193



Para el conteo de células viables durante la segunda fermentación, tres botellas se escogieron al azar en cada punto de muestreo en ambas condiciones y, tras homogenizar el contenido, se realizaron diluciones seriadas en solución Ringer. Éstas se sembraron en cajas de Petri con medio Agar Sabouraud que, posteriormente, se incubaron a 28 °C durante 48 h.

### 3.4 Análisis de parámetros generales del vino

La recogida de muestras para el análisis de parámetros químicos generales se realizó de la misma manera que para el análisis proteómico y a los mismos tiempos. Los parámetros generales del vino como el etanol, azúcares residuales, acidez total y volátil, y pH se determinaron mediante los procedimientos descritos por la OIV (2019).

- Grado alcohólico (% v/v): La determinación del grado alcohólico volumétrico del vino se realizó mediante la previa obtención de 150 mL de destilado, que posteriormente, se midió con ayuda de un alcoholómetro a 20 °C.
- Azúcares residuales: La medida de los azúcares residuales se llevó a cabo mediante la defecación previa de la muestra de vino usando ferrocianuro potásico y sulfato de cinc como reactivos, y su posterior reacción con 25 mL de reactivo cupro-alcálico de Luff-Schoorl. El contenido en azúcares residuales en la muestra original se calculó a través de la concentración de azúcar equivalente al volumen de tiosulfato gastado durante la valoración, y el factor de dilución usado para la muestra de vino, con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Concentración azúcar residual (g/L)} \\ & = \text{Concentración azúcar (equivalencia)} \times F \end{aligned}$$

F = Factor de dilución

$$F = \frac{1}{V_{\text{reacción}}} \times \text{Dilución total}$$

- Acidez total: Para la determinación de la acidez total, el CO<sub>2</sub> se retiró previamente de la muestra de vino mediante vacío. Posteriormente, se realizó

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	91/193



la valoración del ácido de la muestra adicionando una disolución de NaOH 0.1 N en una bureta hasta que el pH sea igual a 7. La acidez total se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$Acidez\ total\ (g/L) = \frac{v \times 0.1 \times F \times P(H2T)}{Vm}$$

v = volumen de NaOH 0.1 N utilizados (mL) en la valoración

F = factor de estandarización del NaOH

P(H2T) = peso equivalente del ácido tartárico (g/L)

Vm = volumen de la muestra (mL)

- Acidez volátil: Para la medida de acidez volátil, el CO<sub>2</sub> se retiró previamente y se añadieron 20 mL de muestra y 0.5 g de ácido tartárico en un borboteador para llevar a cabo el arrastre por vapor y así recoger 200 mL de destilado. Para el cálculo de la acidez volátil se realizaron tres valoraciones: acidez volátil total usando NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador de pH hasta el viraje a color rosa; dióxido de azufre libre usando una disolución de yodo 0.01 N y ácido clorhídrico hasta el viraje a azul-violeta; y dióxido de azufre combinado usando una disolución de borato sódico hasta que aparezca el color rosa anterior y valorar con yodo 0.01 N hasta el viraje a violeta. Tras anotar el volumen utilizado en cada valoración se procedió al cálculo de la acidez volátil con la siguiente fórmula:

$$Acidez\ volátil\ (g/L) = 0.3 [(v \times F) - (0.1 \times v' \times F') - (0.05 \times v'' \times F'')]$$

v = volumen de NaOH 0.1 N utilizado (mL)

F = factor de estandarización de la disolución de NaOH

v' = volumen de yodo 0.01 N utilizado (mL)

F' = factor de estandarización de la disolución de yodo

v'' = volumen de yodo 0.01 N utilizado (mL)

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	92/193



- **pH:** La determinación del pH del vino se llevó a cabo en un peachímetro, previamente calibrado.
- **Glicerol:** es el tercer compuesto mayoritario, y se cuantificó por cromatografía de gases siguiendo el método descrito en Peinado et al. (2004). Para ello se usó un cromatógrafo de gases (modelo 6890 de Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con una columna capilar CP-WAX 57-CB (60 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno y 0.4 mm de espesor; Palo Alto, CA) y un detector de ionización de llama (*FID, Flame Ionization Detector*) usando inyecciones directas de alícuotas con 0.5 mL de muestra líquida. El glicerol se identificó y cuantificó mediante una tabla de calibración realizada con soluciones estándar y analizada usando las mismas condiciones que las muestras.
- Otros compuestos como los ácidos L-málico y L-láctico se cuantificaron por método enzimático mediante un analizador multi-paramétrico LISA-200 (Hycel Diagnostics, Technology Diffusion Iberica, Barcelona, España).

Todos los compuestos se analizaron por triplicado.

### 3.5 Parámetros de confianza y estadística

En cuanto al total de proteínas detectadas en cada estudio, se usaron los siguientes criterios de selección proteica para proporcionar una muestra más representativa: score > 2 y péptidos observados  $\geq 2$  (Dasari et al., 2010; Turetschek et al., 2016). Las proteínas obtenidas específicamente en una cepa de levadura, como también aquellas identificadas con el contenido proteico más elevado, se destacaron y discutieron en detalle en cada estudio proteómico. Además, entre las proteínas comunes más abundantes de ambas cepas, se resaltaron aquellas cuyo ratio CP/CNP fue  $> 2$  ó  $< 0.5$ .

En cuanto a los *GO Terms* obtenidos, se utilizó la herramienta “*GO Term Finder*” de la base de datos *SGD* para calcular el *p-value* y el *FDR (False Discovery Rate)* de cada uno. El total de *ORFs (Open Reading Frame)* identificados en *S. cerevisiae* se emplearon como grupo de genes de referencia para considerar sólo aquéllos que son traducidos a proteínas. El *p-value* se define como la probabilidad de obtener al menos un número “x” de genes u *ORFs* respecto al total de genes “n” en la lista, asociados a un término en

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	93/193



particular, dada la proporción de genes en el genoma que son anotados en ese *GO Term*. Para destacar los procesos biológicos se tuvo en cuenta un *p-value* < 0.01. Este valor se calculó usando la distribución hipergeométrica donde cuatro números son utilizados para calcular cada *p-value*: n, número de elementos en la muestra; N, número de elementos en la población referencia (6604 *ORFs*); M, número de elementos en la población que pertenecen a la categoría deseada; y k, número de elementos en la muestra que pertenecen a dicha categoría:

$$p = \frac{\binom{M}{k} \binom{N-M}{n-k}}{\binom{N}{n}}$$

El programa *Statgraphics Centurion XVI* (Manugistics, Inc., Rockville, MD. USA), el *software PAST* versión 3.26, la base de datos *STRING* v.11.0 y el *software MetaboAnalyst* se usaron para llevar a cabo los distintos análisis estadísticos recogidos en la Tabla 4. Los datos fueron previamente normalizados, mediante la raíz cuadrada, y autoescalados. Para la realización de algunas figuras se usó también el *software GraphPad Prism* versión 5.0.

**Tabla 4.** Programas y análisis estadísticos realizados en los estudios correspondientes.

Software/ Base de datos	Análisis estadístico	Objetivo de Tesis
Programas <i>Statgraphics Centurion</i> v.XVI y <i>PAST</i> v.3.26	-Análisis de varianza ( <i>ANOVA</i> , <i>ANalysis Of VAriance</i> )	2.2
	-Comparaciones de muestras múltiples ( <i>MSC</i> , <i>Multiple-Sample Comparison</i> ) 95 % confianza	1, 2.1, 2.2, 3 y 4
	-Análisis multivariado ( <i>MVA</i> , <i>Multiple Variable Analysis</i> ) “ <i>Sunray plots</i> ”	2.1
	-Análisis de componentes principales ( <i>PCA</i> , <i>Principal Component Analysis</i> )	3 y 4
Base de datos <i>STRING</i> v.11.0	-Mapa interacción proteica	1, 2.1 y 2.2
<i>Software MetaboAnalyst</i> v.4.0	-Análisis de correlación	2.2

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	94/193



### 3.6 Estudio de la actividad killer de la toxina *Kpkt*

#### 3.6.1 Extracción de la toxina nativa en *Tetrapisispora phaffii*

La cepa de levadura *T. phaffii* CBS 4417 se usó para obtener la toxina *killer* *Kpkt*, que posee alta homología con la glucanasa de pared *Bgl2*. Como pre-inóculo se usaron cultivos en matraces con 50 mL de medio YPD tamponado a pH 4.6, y se incubaron durante la noche a 20 °C con una ligera agitación de 180 rpm. Estos cultivos se centrifugaron a 5000 x g durante 7 min y se usó la pella resultante resuspendida en el mismo medio para inocular matraces con medio YPD pH 4.6 con una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL (previa medición en un espectrofotómetro). Tras su incubación durante la noche, los cultivos se centrifugaron nuevamente a 5000 x g durante 5 min. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de jeringa (Sartorius) de 0.22 µm de tamaño de poro y se conservó posteriormente a -80 °C.

La precipitación con etanol se llevó a cabo para concentrar la toxina. Un volumen de 500 µL de sobrenadante se mezcló con el mismo volumen de etanol 70 % v/v e incubado a -20 °C durante 3 h aproximadamente hasta la formación de un precipitado. Una vez precipitado, la mezcla se centrifugó a 14000 x g durante 15 min y el sobrenadante se desechó. Además, el precipitado se resuspendió en 20 µL de tampón citrato-fosfato pH 4.6, tras la evaporación del etanol restante.

#### 3.6.2 Extracción de la toxina recombinante en *Pichia pastoris*

Un volumen de 25 mL de medio BMGY se preparó usando los componentes mostrados en la Tabla 3, para obtener una adecuada población celular del mutante 38 de *P. pastoris*, debido a su alta eficiencia en términos de producción de la toxina. Tras 24 h de incubación (30 °C, 180 rpm) se inóculo una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en matraces con 25 mL de medio BMMY (previa centrifugación del medio BMGY a 4600 rpm durante 7 min) para inducir la producción de la toxina. Después, se procedió a la inducción del promotor mediante la adición de 250 µL de metanol y una disminución de 2-3 °C de la temperatura durante 5 días. Una vez acabó el período de inducción, el medio se centrifugó a 5000 x g durante 7 min y el sobrenadante que contenía la toxina *killer* se almacenó a -80 °C.

#### 3.6.3 Ensayos *killer*: efectividad de la toxina nativa y recombinante

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	95/193



Se realizaron ensayos *killer* con las dos toxinas para determinar y comparar su efecto en las cepas a estudiar. Primero, se realizó un test *killer* sólo para la toxina recombinante, donde se usó la misma toxina, pero procedente de clones distintos de *P. pastoris* (el clon 38, del cual se obtuvo la toxina; el clon 26, control positivo; y el clon 17, control negativo) para determinar su eficacia contra las cepas de *S. cerevisiae*: AWRI-1631, P29, y las dos cepas mutantes  $\Sigma\Delta YGR282c$  y  $\Sigma\Delta YGL085w$ . Para el siguiente ensayo se usó la toxina recombinante (control positivo), la misma toxina recombinante pero esta vez del clon 24 de *P. pastoris* (control negativo) y, por último, la toxina nativa (precipitada y sin precipitar). Las cepas usadas fueron:  $\Sigma 1278b$  (control) y los dos mutantes  $\Sigma\Delta YGR282c$  y  $\Sigma\Delta YGL085w$ .

Estos ensayos se realizaron por duplicado en cajas de Petri con medio extracto de malta (*ME, Malt Extract*) tamponados a pH 4.6 añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de muestra en la caja de Petri (mediante extensión con un asa de Digralsky) y 1 mL para la técnica de siembra en masa. Previamente, las muestras se diluyeron correctamente. En el caso del método de extensión en placa, para un contacto adecuado entre la cepa y ambas toxinas, se añadió un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de cada toxina en orificios realizados en el medio con la punta estéril de una pipeta. Posteriormente, las placas se incubaron durante la noche a 25 °C.

### 3.6.4 Eficiencia de la toxina *killer* en la autólisis

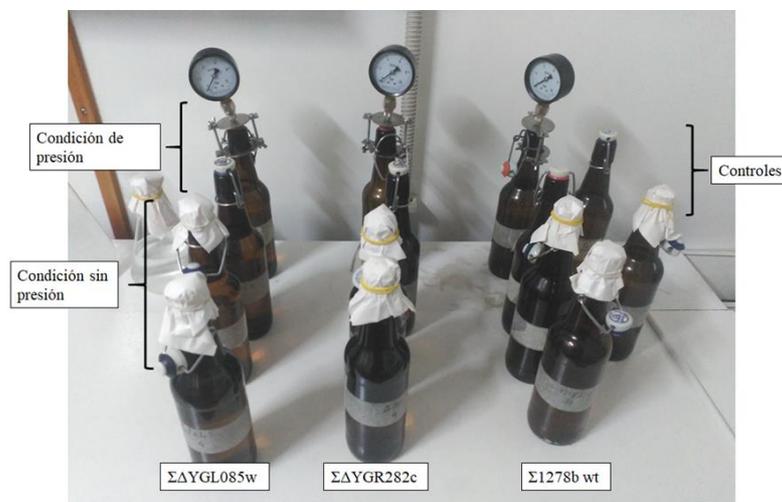
Para estudiar el papel de las mutaciones en genes involucrados en la autólisis del vino, se usaron diferentes cepas de *S. cerevisiae*:  $\Sigma 1278b$  *wt* usada como control, y dos cepas mutantes para los genes *BGL2* y *LCL3*,  $\Sigma\Delta YGR282c$  y  $\Sigma\Delta YGL085w$ .

En cuanto al método, cada cepa a estudiar se inoculó en medio YPD con etanol a distinta concentración (4-8 %) para su adaptación al medio vínico (10 %) durante 3 días. Los medios se incubaron durante la noche a 25 °C con una agitación de 180 rpm y el medio vínico sintético se preparó siguiendo la composición mostrada en la Tabla 3. Una vez el medio se esterilizó en autoclave (excepto aquellas soluciones que contienen etanol), el experimento se desarrolló por duplicado para cada cepa y condición (Figura 14). Un total de 14 botellas de 750 mL (contando las botellas control sin levaduras) se rellenaron con 400 mL de medio vínico usando distintas concentraciones para cada solución (Tabla 3). Las soluciones 2 y 3 se añadieron tras la inoculación de las botellas con una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL, procedentes de cada pre-inóculo con etanol

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	96/193



previamente centrifugado (4500 x g, 4 min) y resuspendido en el medio preparado. Se añadió al medio un suplemento nutricional para levaduras con el fin de favorecer un crecimiento celular eficiente durante la fermentación en botella. Las botellas sometidas a sobrepresión por CO<sub>2</sub> se cerraron con tapones a presión para evitar la liberación de CO<sub>2</sub>, y las botellas control sin presión se cerraron con un tapón de algodón estéril. La presión se controló y midió con un afrómetro. La segunda fermentación se llevó a cabo durante 28 días y las botellas se incubaron a 20 °C. La viabilidad tras la fermentación se realizó por duplicado mediante la técnica de las diluciones seriadas y su posterior conteo en cajas de Petri con YPD (100 µL) para cada cepa.



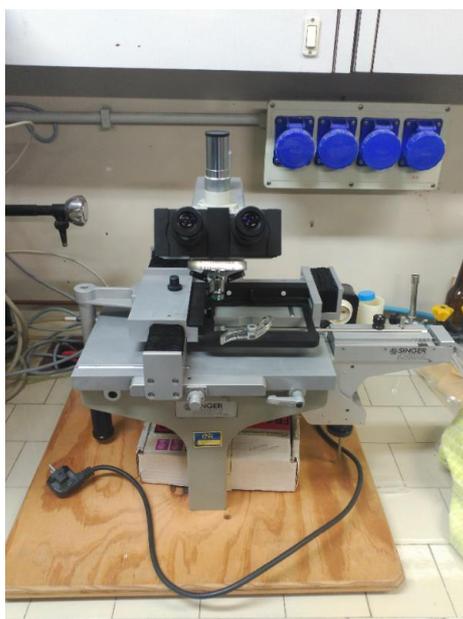
**Figura 14.** Condiciones de estudio y cepas usadas para determinar el papel de los genes *BGL2* y *LCL3* durante la segunda fermentación y autólisis.

### 3.7 Análisis de esporas y tétradas

La cepa diploide *S. cerevisiae* P29 se usó para obtener la generación haploide mediante el estudio de sus esporas y tétradas. Esta cepa creció en medio de esporulación y se observó la presencia de esporas al microscopio óptico. Los medios de esporulación se esterilizaron previamente en autoclave y se incubaron a 25 °C durante 3-4 días (pre-ME) y 6-7 días (ME1 y ME2). Durante este período, la observación de los cultivos al microscopio óptico se realizó a diario para obtener una correcta esporulación.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	97/193





**Figura 15.** Micromanipulador Singer MSM System.

Se calculó la eficiencia de esporulación dividiendo el número de ascas entre el número total de células, contadas en cámara de Thoma, y una vez superado el 50 %, la pared de las células se lisó mediante una solución de zimoliasa. Esta se separó disolviendo 0.25-2.5 mg de enzima zimoliasa en agua destilada estéril, y posteriormente, se añadieron 20 mL de sorbitol 1 M. Se resuspendió una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en la solución y se incubó a 37 °C durante 10-20 min (dependiendo de la rapidez de la digestión). La efectividad de la rotura de la pared se observó mediante su visualización al microscopio óptico. Una vez la pared estaba parcialmente lisada, se añadieron 20  $\mu$ L de esta solución a cajas de Petri con medio YPD y se extendieron sólo en una parte de la caja con ayuda del asa de Digralsky, para permitir la disección de las ascas mediante el uso de un micromanipulador. Las esporas de cada asca se separaron e incubaron en cajas de Petri a 28 °C durante 2-3 días. Tras ésto se determinó la viabilidad de las esporas, observando el número de esporas viables que se obtuvieron a partir de las ascas. Una vez formada la colonia correspondiente a cada espora, todas las colonias se transfirieron a cajas con medio YPD fresco.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	98/193



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se van a presentar en distintos capítulos según los objetivos propuestos.

##### 4.1 Identificación y comparación de las proteínas relacionadas con la pared celular, floculación, adhesión celular y formación de biofilm durante la segunda fermentación en botella en dos cepas vínicas.

La segunda fermentación, que se lleva a cabo durante la elaboración de los vinos espumosos siguiendo el método tradicional, convierte el medio en un ambiente extremo que las cepas de levadura deben tolerar. El alto contenido en etanol, la falta de nutrientes o la sobrepresión de CO<sub>2</sub> durante esta etapa afectan negativamente a las células de levadura y en especial a la pared celular. Diversos estudios han observado la aparición de pliegues y deformaciones de la pared celular de las levaduras durante el envejecimiento de estos vinos. Sin embargo, la rotura de la pared y la consecuente liberación de sus componentes intracelulares al vino ocurren como consecuencia del proceso de autólisis, donde se ha demostrado que las manoproteínas mejoran la calidad y afectan positivamente a las propiedades organolépticas del vino. Además de responder ante las condiciones externas, la pared celular también ejerce un papel importante en el crecimiento, reproducción y adhesión de las células de levaduras. De hecho, la capacidad de floculación es una característica esencial que se propone como una alternativa natural y de bajo coste para eliminar las células durante el proceso de removido. En esta Tesis Doctoral, un estudio proteómico se ha llevado a cabo en dos cepas vínicas, responsables de distintos procesos industriales (*S. cerevisiae* P29, elaboración de vino espumoso y *S. cerevisiae* G1, producción de vino fino), para caracterizar y comparar la respuesta de sus respectivas proteínas de pared a la presión por CO<sub>2</sub> durante la segunda fermentación.

Cada cepa se aclimató previamente en un mosto pasteurizado y la segunda fermentación se llevó a cabo una vez se alcanzaron altos valores de concentración y viabilidad. Para ello, las cepas se inocularon en botellas con un vino base comercial al que se le adicionó azúcar. La mitad de las botellas se cerraron con un tapón metálico, representando la condición con presión (CP), y el resto cerradas con un tapón perforado, representando la condición sin presión (CNP). Las muestras para cada cepa se recogieron

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	99/193



a distintos tiempos a lo largo de la segunda fermentación (mitad, T1 y un mes después de finalizada, T2) según el nivel de presión alcanzada y los niveles de etanol y azúcares. Una vez recogidas, se procedió con la extracción proteica, la separación en un fraccionador *OFFGEL*, la identificación mediante espectrometría de masas, y por último la cuantificación y la posterior selección de aquellas proteínas relacionadas con la pared celular y floculación.

Los resultados obtenidos se muestran en el manuscrito del Apéndice 1, el cual se ha enviado para su publicación en la revista *LWT-Food Science and Technology*.

En este trabajo se observó un mayor requerimiento de proteínas de pared celular en general para la cepa G1 bajo condiciones de presión, sobre todo, el primer mes de envejecimiento. En la cepa P29, la respuesta proteómica a la presión estuvo asociada con un mayor contenido de proteínas responsables del ensamblaje de glucanos y el metabolismo de lípidos. Por otro lado, en la cepa G1 se distinguieron proteínas implicadas en el procesamiento de glucanos y un mayor contenido de glucanasas y manoproteínas. Entre las proteínas más relevantes bajo condiciones de presión destacaron aquellas asociadas a la integridad de la pared, plegamiento proteico y procesamiento de glucanos. En cuanto a las proteínas relacionadas con la floculación, no fueron relevantes y éstas sólo fueron encontradas en la condición sin presión.

**Apéndice 1.** “A differential proteomic approach to characterize the cell wall adaptive response to CO<sub>2</sub> overpressure during sparkling wine making process”.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	100/193



## 4.2 Descripción y estudio de las proteínas relacionadas con la autofagia, apoptosis y autólisis de levaduras vínicas que podrían mejorar la calidad del cava.

Este objetivo se ha abordado mediante tres aspectos diferentes:

- 1) Proteínas relacionadas con la autofagia durante la segunda fermentación en botella.
- 2) Proteínas relacionadas con los procesos de apoptosis y autólisis durante la segunda fermentación en botella.
- 3) Aceleración de la autólisis de levaduras durante la segunda fermentación en botella.

### 4.2.1 Proteínas relacionadas con la autofagia durante la segunda fermentación en botella.

Durante la elaboración de vino tranquilo, las levaduras se encuentran sometidas a condiciones extremas, siendo unas de las más relevantes la falta de nutrientes, lo que provoca la inducción de mecanismos para intentar mantener la viabilidad como la autofagia. Diversos estudios han demostrado que este proceso tiene lugar también durante la segunda fermentación de los vinos espumosos. Este proceso macroautofágico consiste en la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales transportan componentes intracelulares o porciones de citoplasma, de manera no selectiva, a la vacuola para su degradación enzimática. Bajo condiciones favorables las levaduras activan otra vía macroautofágica, esta vez selectiva, llamada transporte del citoplasma a la vacuola o vía cvt, que permite el transporte de enzimas a la vacuola y así provocar la degradación del contenido de las vesículas. Estudios previos han indicado una correlación entre la autofagia y otro proceso que ocurre durante el envejecimiento de estos vinos como la autólisis. Este proceso produce la liberación de componentes intracelulares al vino, una vez la célula muere, lo que resulta en una mayor calidad del producto final. La correlación existente entre estos dos procesos permitiría obtener cepas vínicas con una autólisis acelerada mediante la manipulación de los genes autofágicos. En este contexto, nuestro trabajo supone un primer enfoque centrado en el estudio comparativo de las proteínas relacionadas con la autofagia bajo condiciones de presión por CO<sub>2</sub> en dos cepas industriales responsables de procesos vínicos distintos, como la producción de vino espumoso (*S. cerevisiae* P29) y vino fino (*S. cerevisiae* G1).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	101/193



Estas cepas se crecieron en YPD y después se inocularon en un mosto pasteurizado como medio de aclimatación según el protocolo del INCAVI. Tras ello, una vez las cepas alcanzaron altos niveles de concentración celular y viabilidad, así como un cierto contenido en etanol en el medio, se procedió con el llenado de las botellas para la segunda fermentación. Para ello, se usó una mezcla fermentativa formada por un vino base comercial al que se le adicionó previamente con azúcar. La segunda fermentación se llevó a cabo en botellas cerradas, representando la condición bajo presión (CP) y botellas con tapón perforado, representando la condición sin presión (CNP). Las muestras se recogieron a diferentes puntos a lo largo de la segunda fermentación teniendo en cuenta la presión alcanzada en la botella, el contenido en etanol y azúcares residuales. Una vez obtenidas las muestras, se extrajo la fracción proteica y estas proteínas se separaron en un fraccionador *OFFGEL* Agilent 3100 que resuelve proteínas de péptidos según su punto isoeléctrico (pI), consiguiendo una separación de alta resolución. Posteriormente, las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas, se cuantificaron mediante el cálculo del contenido proteico (%mol) y por último, se seleccionaron aquellas relacionadas con la autofagia usando bases de datos de levaduras.

Los resultados correspondientes a este estudio se muestran en el Apéndice 2, que han sido publicados en la revista *Microorganisms*.

En los resultados de este trabajo se mostró un efecto negativo más pronunciado en G1 con respecto a la sobrepresión por CO<sub>2</sub> en el proteoma relacionado con la autofagia a nivel de contenido y número de proteínas. Aparte de la presión, el tiempo de muestreo también parece afectar al contenido de las proteínas relacionado con la autofagia, siendo éstas menos abundantes un mes después de finalizada la segunda fermentación. En cuanto a las proteínas, mostraron diferencias en el contenido, siendo los reguladores y aquellas proteínas involucradas en la formación del autofagosoma más relevantes en G1, y las que participan en la expansión y nucleación de la vesícula destacaron en P29. Contenidos de proteínas como Sec2 y Sec18 se cuantificaron tres veces más en condiciones de presión en P29 y G1, respectivamente.

**Apéndice 2.** Porras-Agüera, J.A.; Moreno-García, J.; González-Jiménez, M.d.C.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. 2020. Autophagic Proteome in Two

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	102/193



*Saccharomyces cerevisiae* Strains during Second Fermentation for Sparkling Wine  
Elaboration. Microorganisms. 8:523. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040523>

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	103/193



Article

# Autophagic Proteome in Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Second Fermentation for Sparkling Wine Elaboration

Juan Antonio Porras-Agüera <sup>1</sup>, Jaime Moreno-García <sup>1</sup>, María del Carmen González-Jiménez <sup>1</sup>, Juan Carlos Mauricio <sup>1,\*</sup>, Juan Moreno <sup>2</sup> and Teresa García-Martínez <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, C6 building, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14014 Córdoba, Spain; b02poagj@uco.es (J.A.P.-A.); b62mogaj@uco.es (J.M.-G.); b02gojim@uco.es (M.d.C.G.-J.); mi2gamam@uco.es (T.G.-M.)

<sup>2</sup> Department of Agricultural Chemistry, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, C3 building, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14014 Córdoba, Spain; qe1movij@uco.es

\* Correspondence: mi1gamaj@uco.es; Tel.: +34-(957)-218640; Fax: +34-(957)-218650

Received: 24 February 2020; Accepted: 4 April 2020; Published: 6 April 2020



**Abstract:** A correlation between autophagy and autolysis has been proposed in order to accelerate the acquisition of wine organoleptic properties during sparkling wine elaboration. In this context, a proteomic analysis was carried out in two industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains (P29, conventional sparkling wine strain and G1, implicated in sherry wine elaboration) with the aim of studying the autophagy-related proteome and comparing the effect of CO<sub>2</sub> overpressure during sparkling wine elaboration. In general, a detrimental effect of pressure and second fermentation development on autophagy-related proteome was observed in both strains, although it was more pronounced in flor yeast strain G1. Proteins mainly involved in autophagy regulation and autophagosome formation in flor yeast G1, and those required for vesicle nucleation and expansion in P29 strain, highlighted in sealed bottle. Proteins Sec2 and Sec18 were detected 3-fold under pressure conditions in P29 and G1 strains, respectively. Moreover, ‘fingerprinting’ obtained from multivariate data analysis established differences in autophagy-related proteome between strains and conditions. Further research is needed to achieve more solid conclusions and design strategies to promote autophagy for an accelerated autolysis, thus reducing cost and time production, as well as acquisition of good organoleptic properties.

**Keywords:** sparkling wine; yeast; CO<sub>2</sub> overpressure; protein; autophagy

## 1. Introduction

Sparkling wines elaboration process (traditional method or ‘Champenoise’) involves a secondary fermentation in sealed bottle, followed by an aging period, at least 9 months for cava (a Spanish sparkling wine), where yeast cells must face several stress factors such as high ethanol concentrations (9.5–11.5 % *v/v*) and, above all, the endogenous CO<sub>2</sub> overpressure, which reach values of 6–7 bar inside the bottle. The whole process including the fermentative process and aging is known as “prise de mousse” [1,2]. Along aging, the contact of wine with dying yeast cells leads to the release of their cellular content during a self-degradative process known as autolysis [3,4]. This event is fundamental for the quality of sparkling wines and improvement of the organoleptic properties.

Nevertheless, autolysis is a slow process and the development of strategies to accelerate this event has become an object of study for the enological industry [5,6]. These authors reported that autophagy takes place during secondary fermentation of sparkling wines and proposed the use of yeast strains with deregulated autophagy in order to accelerate the autolysis process. Autophagy is induced mainly

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	104/193



under starvation conditions and involves the transport and degradation of cytoplasmic compounds in the vacuole [7,8]. It can be classified into two main types: macroautophagy and microautophagy, which are both selective and non-selective processes. Among selective autophagy, the Cvt pathway appears to be a biosynthetic process where hydrolytic enzymes are transported by double-membrane vesicles, smaller than autophagosomes, and delivered to the vacuole [9]. Both selective and non-selective autophagy share the molecular machinery, encoded by 33 autophagy-related (ATG) genes [10], of which 17 are required for both. Although autophagy has been commonly associated with a degradative process, its cytoprotective effect on the survival under starvation conditions are widely known, i.e., mitochondrial and cell compounds recycle [11]. Furthermore, studies by Valero et al. (2019) [12] observed that autophagy is required for survival to sulfur dioxide tolerance in yeast. Because autophagy precedes autolysis during aging, and it is essential for cell maintenance and survival under stress conditions [6], the genetic engineering of autophagy-related genes has been proposed by numerous authors [5,13–15] in order to accelerate the autolysis and thus, the acquisition of aging-like properties such as foaming properties [16].

Yeast strains compared in this work, *Saccharomyces cerevisiae* P29 and G1 are commonly used in post-fermentative processes, sparkling and sherry-wines elaboration respectively, both involving large aging periods. The nutrient-limited environment to which yeast cells are subjected under these wine making processes, makes it suitable to study the autophagy. During biological aging in sherry-wines, ethanol increases in the medium leading flor yeasts to change their metabolism in order to use this compound as a carbon source. For it, this type of yeast forms a biofilm or velum on wine surface to reach the oxygen and then metabolize the ethanol [17]. While this process has been reported under secondary fermentation conditions in sparkling wine elaboration, no evidence has been reported in flor yeast so far.

This work represents a continuation of a previous research based on studying the apoptosis and autolysis-related proteins and the proteomic response of wine yeasts to CO<sub>2</sub> overpressure during sparkling wine elaboration [18]. The current study is a first approach focused on the observed changes of the autophagy-related proteins under second fermentation conditions. This was performed in two wine yeast strains, *S. cerevisiae* P29 and G1, in order to analyze their response to CO<sub>2</sub> overpressure conditions through a proteomic analysis using protein fractionation (OFFGEL) and detection (spectrometer LTQ Orbitrap/HPLC and databases). Proteomic changes observed in autophagy-related proteins as well as those proteins found with high content under typical sparkling wine production conditions, will enlarge the knowledge about this process in yeasts. Furthermore, the study of the genes that codify these proteins may lead to the development of future strategies for the selection of yeast strains with accelerated autolysis through yeast breeding or genetic engineering of second fermentation strains, in this way reducing cost and time of production, as well as acquisition of organoleptic properties.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Yeast Strains and Second Fermentation Conditions

Yeast wine strains, *S. cerevisiae* P29 and G1, used in this work were acclimated during 5 days using a pasteurized must and once high levels of cell concentration ( $1.5 \times 10^8$  cells/mL for P29 and  $1 \times 10^8$  for G1) and viability (97% for P29 and 90% for G1) were obtained, these were inoculated in bottles with a commercial base wine and 22 g/L of sugar. ‘Tirage’ was carried out and samples by triplicate were collected at different points along the second fermentation: middle of the second fermentation (T1) when pressure reached 3 bar, and one month after it (T2), once 6.5 bar were obtained. Each yeast strain was fermented in two study conditions: sealed bottle (pressure condition or PC) and open bottle (non-pressure condition or NPC). Similar values of ethanol content and sugar consumption were taken into consideration at the time of collecting the samples of control condition. Cultures composition, study conditions and sampling points are described more in detail in Porras-Agüera et al. (2019) [18].

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	105/193



## 2.2. Protein Extraction, Identification, and Quantification

Methods explained in Porras-Agüera et al. (2019) [18] and Moreno-García et al. (2015) [19] were used for protein extraction and identification through LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) coupled to a nanoflow LC/MS UltiMate 3000 HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). As for the protein quantification, protein content (mol%) was calculated following the method explained in Ishihama et al. (2005) [20].

Once identified, those proteins related to autophagy were selected by using the ontology tools provided by SGD (*Saccharomyces* genome database, <https://www.yeastgenome.org/>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) databases and literature.

## 2.3. Confidence Criteria and Statistical Analysis

From the total of proteins detected, only those which were obtained with a score > 2 and observed peptides  $\geq 2$ , were selected to proceed with the analysis, in order to provide significant proteins [21,22]. Proteins detected to be over-represented under PC (ratio PC/NPC  $\geq 2$ ) were highlighted and discussed in detail. In addition, proteins found specifically in each yeast strain, along with those which reached high protein contents and down-represented under PC (ratio PC/NPC  $\leq 0.5$ ) were also considered.

For proteome data, the software Statgraphics Centurion version XVI (StatPoint Technologies, Warrenton, Virginia VA, USA) was used to perform a multiple-sample comparison procedure (MSC), considering a confidence level of 95.0% according to Fisher's least significant difference (LSD) method, and a multiple variable analysis (MVA), with the aim to distinguish the proteomic response of each strain. The software STRING version 11.0 (available online, <https://string-db.org/>) was used to create the interaction network map, forming specific protein groups through a MCL (Markov Cluster Algorithm) clustering method. This algorithm accepts a parameter called 'inflation' that it is indirectly related with the precision of the clustering. Data were previously normalized through the root square and auto scaling.

## 3. Results and Discussion

In this study, a proteomic analysis was carried out to identify specific proteins involved in the autophagy process and characterize the CO<sub>2</sub> overpressure effect in two industrial wine yeast strains subjected to second fermentation conditions. To provide a better understanding of the molecular process that involves autophagy, we classified the proteins into different steps: regulation of induction, autophagosome-generating machinery, cargo packaging, vesicle nucleation, vesicle expansion and completion, retrieval, docking and fusion, vesicle breakdown, permease efflux, and mitophagy. A total of 33 autophagy-related proteins were detected in both yeast strains (P29 and G1) and although frequency values remained constant in each condition, CO<sub>2</sub> overpressure resulted in a considerable decrease of both number of total proteins and protein content from T1 to T2, especially in G1 (Table 1 and Supplementary Table S1). The highest values of abundance were obtained in both yeast strains growing under NPCT1. The highest contents were observed in open bottle (NPC), including the regulators at T1 and those proteins involved in cargo packaging at T2 (Supplementary Table S1). However, protein contents under PCT1 also highlighted in both strains. Proteins required for vesicle nucleation, expansion, retrieval, docking and fusion, vesicle breakdown, and permease efflux, were not identified at PCT2, and NPCT2 in the case of vesicle nucleation. It could be explained since the number of proteins and content detected at this sampling time in both strains were low (Table 1), which may indicate that autophagy is not relevant once secondary fermentation is over. On the other hand, mitophagy-related proteins were found only under NPC and especially in P29 (Table 1). Results clearly show a detrimental effect of pressure on autophagy-related proteome, particularly in flor yeast. In fact, in recent studies published by our research group [18], a significant decrease was observed in cell viability in both yeast strains under pressure conditions, although it was more remarkable in G1. In addition, the kinetic of second fermentation carried out in both strains through the pressure values,

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	106/193



data published also in Porras-Agüera et al. (2019) [18], revealed that P29 is more adapted to pressure conditions and G1 showed a slightly slower kinetic, reaching the maximum pressure (6.5 bar) at 23 and 28 days, respectively.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	107/193



**Table 1.** Frequency of the autophagy-related proteins identified in both yeast strains (*S. cerevisiae* P29 and G1) under PC (pressure condition) and NPC (non-pressure condition), at the middle of the secondary fermentation (T1) and one month after it (T2)

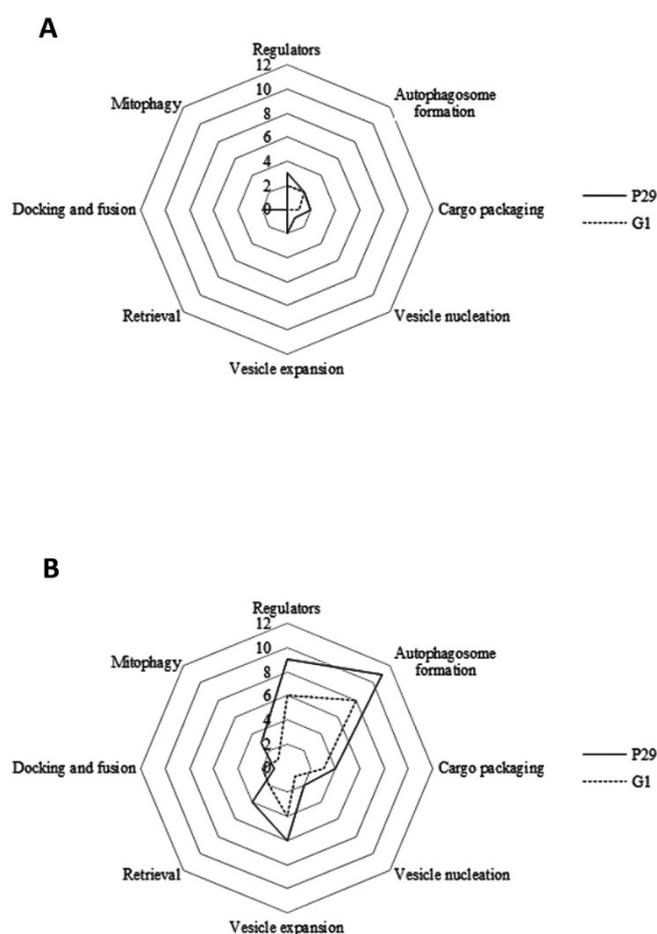
	<sup>a</sup> Protein Frequency in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				PC T1		NPC T1		PC T2		NPC T2	
		Protein Frequency	G1	P29	Protein Frequency	G1	P29	Protein Frequency	G1	P29	Protein Frequency	G1
Total proteins	94 out of 6721, 1.4%	11 out of 594, 1.85%	7 out of 568, 1.23%	29 out of 1517, 1.91%	19 out of 1000, 1.90%	4 out of 419, 1.33%	4 out of 392, 1.86%	2 out of 218, 0.91%				
Regulation of induction	26 out of 6721, 0.39%	3 out of 594, 0.51%	2 out of 568, 0.35%	9 out of 1517, 0.59%	6 out of 1000, 0.60%	1 out of 419, 0.24%	-	-				
Autophagosome-generating machinery	24 out of 6721, 0.36%	2 out of 594, 0.34%	2 out of 568, 0.35%	10 out of 1517, 0.66%	8 out of 1000, 0.80%	1 out of 419, 0.24%	2 out of 392, 0.51%	-				
Cargo packaging	8 out of 6721, 0.12%	1 out of 594, 0.17%	1 out of 568, 0.18%	4 out of 1517, 0.26%	3 out of 1000, 0.30%	2 out of 419, 0.48%	2 out of 392, 0.51%	2 out of 218, 0.92%				
Vesicle nucleation	5 out of 6721, 0.07%	1 out of 594, 0.17%	-	2 out of 1517, 0.13%	1 out of 1000, 0.10%	-	-	-				
Vesicle expansion	26 out of 6721, 0.39%	2 out of 594, 0.34%	1 out of 568, 0.18%	6 out of 1517, 0.40%	4 out of 1000, 0.40%	-	-	-				
Retrieval	7 out of 6721, 0.10%	-	-	4 out of 1517, 0.26%	2 out of 1000, 0.20%	-	-	-				
Docking and fusion	14 out of 6721, 0.21%	2 out of 594, 0.34%	1 out of 568, 0.18%	1 out of 1517, 0.07%	1 out of 1000, 0.10%	-	-	-				
Vesicle breakdown	1 out of 6721, 0.01%	-	-	-	-	-	-	-				
Permease efflux	1 out of 6721, 0.01%	-	-	-	-	-	-	-				
Mitophagy	10 out of 6721, 0.15%	-	-	3 out of 1517, 0.20%	1 out of 1000, 0.10%	-	1 out of 392, 0.26%	-				

<sup>a</sup> The total number of autophagy-related proteins identified until date in *S. cerevisiae* have been included in the first column.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	108/193



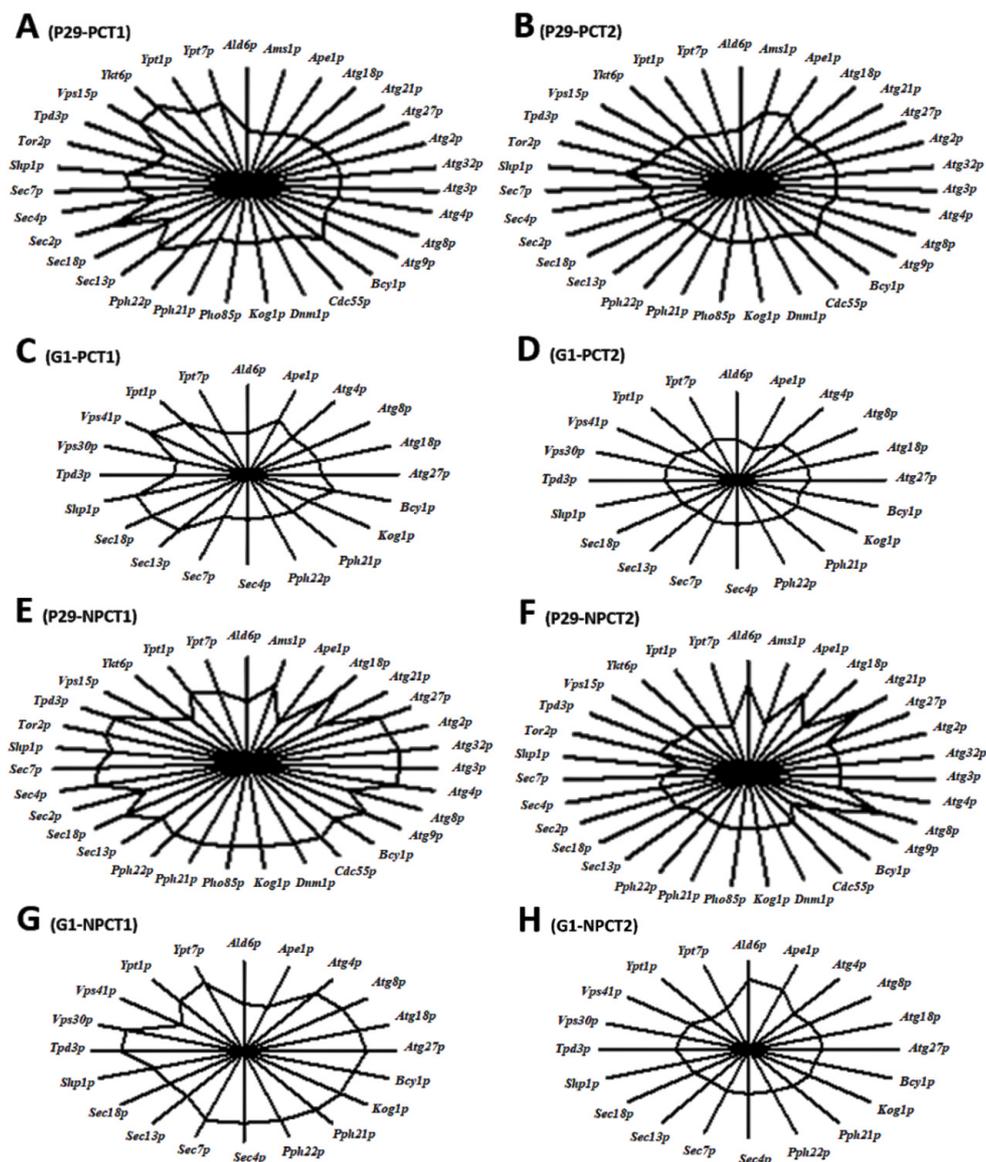
The effect of pressure on autophagy-related proteins can be better appreciated in Figure 1. According to Figure 1A, CO<sub>2</sub> overpressure affected more to protein number in flor yeast and especially, to those proteins involved in vesicle nucleation and retrieval. On the contrary, the highest protein number was observed in open bottle (NPC, Figure 1B), mainly in those proteins responsible for regulation, autophagosome formation, and vesicle expansion. Sunray plots based on multivariate data analysis of autophagy proteins detected in both strains, shown in Figure 2, provided differences in protein content means when they were growth under both PC and NPC. According to this analysis, samples taken at T1 differ from those collected at T2, under both conditions. The smallest polygons were found at T2 in both yeast strains, indicating that—apart from the pressure—the second fermentative development also seems to affect negatively to autophagy-related proteome. On the other hand, those samples not subjected to CO<sub>2</sub> overpressure (NPC) had the most regular polygons and particularly at T1, mainly due to the high amount and content of proteins required for autophagosome and vesicle formation detected in both strains (Figure 1 and Supplementary Table S1). In this context, sunray plots obtained from multivariate analysis establish a ‘fingerprinting’ of the autophagy proteome response under each study condition, providing relevant information about the behavior of each wine yeast strain along the prise de mousse.



**Figure 1.** Total number of autophagy-related proteins required for each process step identified in *S. cerevisiae* P29 and G1 under (A) PC (endogenous CO<sub>2</sub> overpressure condition) and (B) NPC (non-pressure condition).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	109/193





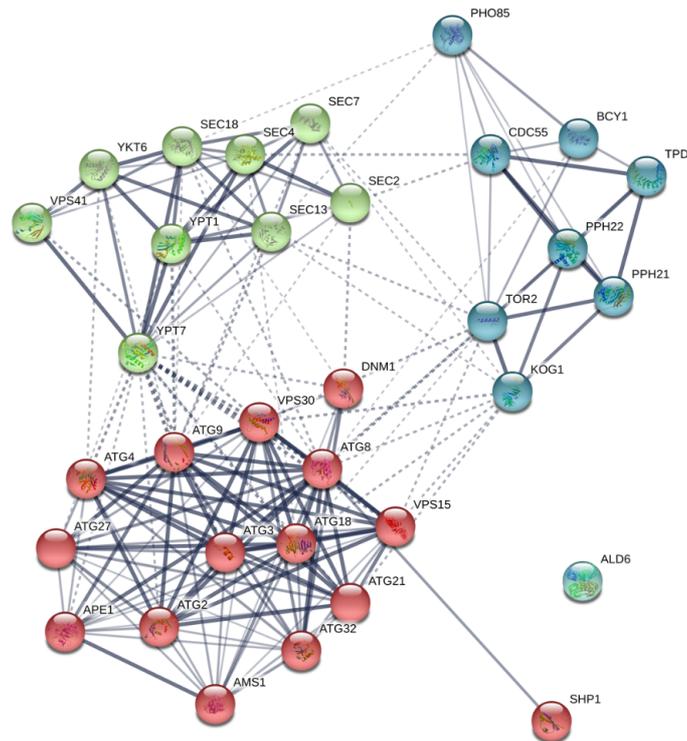
**Figure 2.** Sunray plots obtained by multivariate data analysis of autophagy proteins detected in *S. cerevisiae* P29 and G1. Each ray represents a protein to each vertex. The end of the ray corresponds to the mean value plus three standard deviations and the center the mean minus three standard deviations. (A) P29-PCT1; (B) P29-PCT1; (C) G1-PCT1; (D) G1-PCT2; (E) P29-NPCT1; (F) P29-NPCT2; (G) G1-NPCT1; (H) G1-NPCT1. PC (endogenous CO<sub>2</sub> overpressure condition), NPC (non-pressure condition), T1 (middle of the second fermentation), T2 (one month after the second fermentation).

In order to know the possible interactions between autophagy proteins, a protein–protein interaction network map was built using STRING v11.0 and it is provided in Figure 3. The interaction map showed a high amount of connections between the total autophagy-related proteins (33), represented as nodes, identified in both strains. A total of 177 interactions (number of edges) were observed, with a PPI enrichment  $p$ -value  $< 1 \times 10^{-16}$ . Such an enrichment indicates that the proteins are

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	110/193



at least partially biologically connected as a group. MCL clustering clearly grouped those autophagy proteins involved mainly in regulation and induction (blue nodes), autophagosome formation and vesicle transport (red nodes), and vesicle and vacuole fusion (green nodes). The strongest interactions were observed in those proteins clustered in red color. Only the protein Ald6p showed no interaction with the rest of the proteins, pointing to the fact that this protein is just a cargo and not an active player of the process.



**Figure 3.** Interaction network map built using STRING v11.0 and based on the 33 autophagy-related proteins in total detected in *S. cerevisiae* P29 and G1. Proteins are showed as nodes and the existence of interactions between them are represented by lines (connection between nodes). Line thickness indicates the strength of the different interactions. Nodes with the same color represent specific clusters: autophagy regulation and induction (blue nodes), autophagosome formation and vesicle transport (red nodes), and vesicle and vacuole fusion (green nodes). PPI enrichment  $p$ -value  $< 1 \times 10^{-16}$ .

From now on, the autophagy steps as well as the over-represented proteins under PC, specific and those detected with high protein contents in both strains are discussed in depth below.

### 3.1. Regulation of Induction

The most noticeable event among regulators was the detection of the proteins Bcy1p and Sec13p (Figure 4). Sec13p was detected 3.2-fold under PCT1 in G1 (Table 2) and, although it is part of COPII vesicles, required for the proper transport of proteins from endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi [23], studies by Panchaud and Péli-Gulli (2013) [24] demonstrated that it is involved also in the regulation of TORC1 complex through the interaction with a GTPase activator. Besides this regulator, the regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) Bcy1p, known for negatively regulating autophagy [25], was found specifically in P29 under PCT2 (Table 2).



in which COPII vesicles fuse with Atg9p vesicles to provide membrane source and regulate the autophagosome abundance.

### 3.2. Autophagosome-Generating Machinery

Proteins involved in autophagosome formation were detected in both yeast strains and most of them were found down-represented in P29 strain (Figure 4A). Among the over-represented proteins under PC we can stand out: Shp1p (3-fold under PC in G1) and Sec18p (Table 2). The first one showed the highest content increase value in the case of flor yeast G1 at T1 and in P29 at T2 where it was specific (Figure 4). Studies by Krick et al. (2010) [28] demonstrated that Shp1p is also essential for autophagosome biogenesis, via interacting with Atg8p (Figure 3) through a system that allows to detect protein interaction in medium without uracil. In fact, ubiquitin-like protein Atg8p, was down-represented at NPCT1 (both in P29 and G1) and T2 (only in P29) (Figure 4). Since this protein is required to form autophagosomes during starvation conditions [29], it is acceptable to think that Atg8p also participates in vesicle formation during Cvt pathway. Huang et al. (2000) [30] used an atg8 mutant strain and confirmed its role in both pathway during starvation conditions due to the inhibition of prApe1p import. Apart from Shp1p, the chaperone Sec18p was found highly represented under PCT1 only in the flor yeast G1 (Table 2). Its presence could be explained due to its role in autophagosome formation and the fusion with the vacuole [31]. Moreover, these results agree with those obtained by Penacho et al. (2012) [32], where genes involved in vacuolar functions were reported to be overexpressed under second fermentation conditions.

As for the rest of autophagosome formation proteins, most of the Atg proteins appeared to be down-represented under PC: Atg2p, Atg3p, Atg4p, Atg9p, Atg18p (autophagy core machinery), Atg21p and Atg27p (specific of Cvt pathway). All decreased their content in P29 under PC and all, except Atg21p and Atg27p (T2), were observed at T1 (Figure 4 and Supplementary Table S1). The interaction between Atg proteins, such as Atg2p, Atg18p, or Atg9p shown in Figure 3, has been reported by several authors and is essential for correct autophagy process [33,34]. These results seem to indicate that autophagy takes place at T1 in both strains and under both conditions, once nutrient levels drop in the wine, due to the higher amount of autophagy-related proteins detected in respect to T2. However, since Atg-related proteins were found with low content and even most of them were not identified under pressure, it suggests a possible negative effect of pressure on autophagy-related proteome.

### 3.3. Cargo Packaging

Yeast autophagy (and Cvt pathway) involves the transport of hydrolases enzymes, Ape1p (aminopeptidase I) and Ams1p ( $\alpha$ -mannosidase) into vesicles and delivery to the vacuole. In this context, both the vacuolar aminopeptidase Ape1p, often used as a marker protein in studies of autophagy and Cvt pathway [35], and the mannosidase Ams1p, were identified as over-represented under PCT1 in G1 and specific under PCT2 in P29, respectively (Table 2). Ams1p is delivered to the vacuole in a novel pathway separate from the secretory pathway and requires the Cvt and autophagy components [36]. The presence of both enzymes overrepresented under PC suggests that they are being delivered to the vacuole for degradation of organelles and cell compounds in both strains.

As for the rest of the proteins involved in cargo packaging, the protein content of Ald6p or aldehyde dehydrogenase was highlighted under both conditions. This was only detected under NPC, showing a considerable decrease under PC in both strains (Figure 4). Studies by Onodera and Oshumi (2004) [37] demonstrated that in addition to Ams1p and Ape1p, the protein Ald6 is also specifically targeted to the vacuole by autophagosomes under nutrient starvation conditions, and it was quickly depleted in cells as a result of a preferential degradation of this protein during autophagy. Consequently, this depletion has been used as a marker for the autophagy process [6]. According to the protein content obtained under both conditions, it might be suggested that the autophagy process occurs when yeast cells are subjected to pressure conditions, representing the first evidence of this process in flor yeast, as it has not been reported yet. However, since this protein is a key player in the

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	113/193



conversion of acetaldehyde to acetyl-CoA during growth on non-fermentable carbon sources such as acetaldehyde or ethanol [38] it might indicate a possible role in gluconeogenesis, especially at T2.

### 3.4. Vesicle Nucleation

Autophagic vesicles are constructed at the PAS from newly generated membranes, and the formation of the core and the new membrane require the participation of Atg9p and the phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) complex I, which includes the PtdIns 3-kinase Vps15p, Vps30p, Vps34p, and Atg14p [39]. Protein content in this category was reported with the lowest levels in both yeast strains and most of the proteins were detected especially at T1 under both conditions (Figure 4). Under PC, only Vps15p was found over-represented at T1 in P29 (Table 2). This protein, together with Vps30p (down-represented under PCT1 in G1), have been associated with both autophagy and carboxypeptidase Y sorting [40]. On the other hand, Atg9p, transmembrane protein involved in forming Cvt and autophagic vesicles, was detected only under NPCT1 in P29 (Supplementary Table S1).

### 3.5. Vesicle Expansion and Completion

Proteins involved in this autophagy step are two ubiquitin-like conjugation system (Atg12 and Atg8 systems), Sec2/4p, Ypt1p, and complexes COG and TRAPP3. Most of these proteins were down-represented at PCT1 in both strains (Figure 4). The guanine nucleotide exchange factor Sec2p was the only over-represented protein under PC (3.4-fold) at T1 in P29 (Table 2). Studies by Geng et al. (2010) [41] demonstrated that this protein, after autophagy induction, participates in autophagosome formation. Apart from the detection of Sec2p, the RabGTPase Ypt1p was identified with the highest content at PCT1 in flor yeast; however, it was not detected at T2 (Supplementary Table S1). This protein is required for vesicle docking and targeting during ER to Golgi trafficking, and also is involved in autophagy regulation participating in PAS formation and assembly [42].

### 3.6. Retrieval

The proteins that participate in retrieval of PAS were reported with low protein contents and most of them decreased their content under PC (Figure 4). Among them, Atg27p, involved in membrane delivery to the PAS and required for both autophagy (autophagosome assembly) and Cvt pathway [43], decreased the content under PCT1 (Figure 4). Atg27p shuttles between the mitochondria, PAS, and the Golgi complex. In addition, it participates in anterograde transport of Atg9p from the mitochondria to the PAS [44]. The anterograde cycling to the PAS requires Atg9p, detected in both strains and down-represented only under PCT1 in P29, Atg11p (found at T1 in both conditions but more under PC) and Atg23p (not detected), while retrograde cycling from the PAS to the mitochondria or Golgi complex involves the Atg1p-Atg13p complex, Atg2p and Atg18p (all of them detected except Atg13p). Atg18p (down-represented only at T1 in both strains) has been reported as essential for vesicle formation in both autophagy and Cvt pathway [45].

### 3.7. Docking and Fusion

Once the autophagosome is formed, it releases the content by fusion with the vacuole. SNARE proteins (Vam3p, Vam7p, Vit1p, and Ykt6p), Rab GTPases such as Ypt7p, the chaperone Sec18p and Vps proteins participate in this process [46]. In general, protein content values were low in both conditions and strains, although it was more pronounced in G1 (Supplementary Table S1). In P29 two proteins, Ypt7p and Ykt6p, required for fusion events, not autophagic in the case of Ykt6p [47,48], were found to be specific under PCT1 (Table 2). The association of Ypt7p with Vps complex is required for vacuolar fusion. Seals et al. (2000) [49] observed that interaction between Ypt7p and Vps proteins (Figure 3) is required for an efficient vacuolar fusion in yeasts, something that—considering our results—may take place at T1 in both strains. Among the components of this Vps complex (Vps8p, Vps16p, and Vps41p), only the last one was found specifically in G1 (Figure 4B).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	114/193



### 3.8. Vesicle Breakdown and Permease Efflux

After fusion to the vacuole, two conserved components are involved in breakdown of the autophagosome and permease efflux in yeasts, Atg15p and Atg22; however, none were detected in this study.

### 3.9. Mitophagy

Mitophagy in yeast can be induced under starvation conditions, oxidative stress, and in nonfermentable mediums, representing a selective autophagy process in which a mitochondrion is degraded by macroautophagy [50]. In fact, most of Atg proteins are required for this process [51]. Proteins involved in mitophagy such as Atg32p and Dnm1p were identified only in P29 under NPCT1 (Supplementary Table S1). During mitophagy, Atg32p is essential to initiate the process recruiting the adaptor Atg11p and the ubiquitin-like protein Atg8p [52]. The presence of these proteins suggests that P29 might be performing a mitophagy process, probably as an adaptive mechanism to survive under starvation conditions or even to protect against oxidative stress, thus removing the ROS [53], under non-pressure conditions.

## 4. Conclusions

This work represents a first approach based on the identification and comparison of autophagy-related proteome in two industrial wine yeast strains commonly used in post-fermentative processes, under pressure conditions. According to proteomic results, autophagy seems to take place during the fermentative stage in the both yeast strains. Furthermore, CO<sub>2</sub> overpressure affects negatively to autophagy proteome in terms of protein number and content in both strains, although this effect was more remarkable in the flor yeast. Under pressure conditions, regulators, and proteins related to autophagosome formation highlighted in flor yeast, while those involved in vesicle nucleation and expansion were more relevant in sparkling wine yeast strain. Apart from contributing to the knowledge about yeast autophagy, those specific and highly represented proteins under second fermentation conditions—such as Bcy1p, Sec2p, Sec13p, Sec18p, Shp1p and Vps15p—could be used as biomarkers for accelerating the autolysis during aging period in sparkling wine elaboration. The study of the genes that codify these proteins would allow promote autolysis in wine yeasts through genetic engineering, thus reducing cost and time production, as well as the acquisition of good organoleptic properties. Moreover, this work opens the door to the use of flor yeasts for sparkling wine elaboration. However, further research, including different approaches and disciplines such as genomics and metabolomics, along with studies focused on protein activity and electron microscopy imaging, is needed to achieve more solid conclusions.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/4/523/s1>. Supplementary Table S1. List of the most relevant autophagy-related proteins identified in *S. cerevisiae* P29 and G1 under each study condition (PC: pressure condition, NPC: non-pressure condition) and sampling time (T1: middle of the second fermentation, T2: one month after it). Gene name, accession number (Uniprot), molecular function, score, peptides and protein content (mol%) are provided for each protein. Different letters (a–f) indicate significant differences in each condition at 0.05 level according to Fisher's least significant difference procedure. The autophagy step in which each protein is involved is shown in brackets. 1: regulation of induction; 2: autophagosome-generating machinery; 3: cargo packaging; 4: vesicle nucleation; 5: vesicle expansion; 6: retrieval; 7: docking and fusion; 8: vesicle breakdown; 9: permease efflux; 10: mitophagy. n.f.; not found, ns; not significant.

**Author Contributions:** J.A.P.-A.: Investigation, Methodology, Writing—original draft. J.M.-G.: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing—original draft. M.d.C.G.-J.: Data curation, Formal analysis. J.C.M.: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing—review and editing. J.M.: Supervision, Validation, Visualization. T.G.-M.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work has been supported by the "XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación 2018" (MOD 4.2. SINERGIAS, Ref XXIII. PP Mod 4.2, JC Mauricio) from University of Córdoba (Spain).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	115/193



**Acknowledgments:** Kind help of the staff at the Central Research Support Service (SCAI) of the University of Córdoba with the protein analyses is gratefully acknowledged. The authors thank the Department of Enological Research, Institute of Agrifood Research and Technology-Catalan Institute of Vine and wine (IRTA-INCAVI), Barcelona (Spain) for the supply of the *S. cerevisiae* P29. Special mention to Minami Ogawa for the translation of the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Torresi, S.; Frangipane, M.T.; Anelli, G. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1232–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Martínez-García, R.; García-Martínez, T.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; Moreno, J. Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO<sub>2</sub> pressure in sealed bottle. *Food Chem.* **2017**, *237*, 1030–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127. [[CrossRef](#)]
4. Kemp, B.; Alexandre, H.; Robillard, B.; Marchal, R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agr. Food Chem.* **2015**, *63*, 19–38. [[CrossRef](#)]
5. Cebollero, E.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R. Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: A reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 614–616. [[CrossRef](#)]
6. Cebollero, E.; Gonzalez, R. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4121–4127. [[CrossRef](#)]
7. Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 458–467. [[CrossRef](#)]
8. Torggler, R.; Papinski, D.; Kraft, C. Assays to monitor autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* **2017**, *6*, 23. [[CrossRef](#)]
9. Reggiori, F.; Klionsky, D.J. Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **2013**, *194*, 341–361. [[CrossRef](#)]
10. Lynch-Day, M.A.; Klionsky, D.J. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1359–1366. [[CrossRef](#)]
11. Moreau, K.; Luo, S.; Rubinsztein, D.C. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 206–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Valero, E.; Tronchoni, J.; Morales, P.; Gonzalez, R. Autophagy is required for sulfur dioxide tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gonzalez, R.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *84*, 21–26. [[CrossRef](#)]
14. Cebollero, E.; Martínez-Rodríguez, A.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R. Overexpression of *csc1-1*. A plausible strategy to obtain wine yeast strains undergoing accelerated autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246*, 1–9. [[CrossRef](#)]
15. Tabera, L.; Muñoz, R.; Gonzalez, R. Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 2351–2358. [[CrossRef](#)]
16. Nuñez, Y.P.; Carrascosa, A.V.; González, R.; Polo, M.C.; Martínez-Rodríguez, A.J. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 7232–7237. [[CrossRef](#)]
17. Legras, J.L.; Moreno-García, J.; Zara, S.; Zara, G.; García-Martínez, T.; Mauricio, J.C.; Mannazzu, I.; Coi, A.L.; Zeidan, M.B.; Dequin, S.; et al. Flor yeast: New perspectives beyond wine aging. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 503. [[CrossRef](#)]
18. Porrás-Agüera, J.A.; Moreno-García, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. First Proteomic Approach to Identify Cell Death Biomarkers in Wine Yeasts during Sparkling Wine Production. *Microorganisms* **2019**, *7*, 542. [[CrossRef](#)]
19. Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Mauricio, J.C. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 25–33. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Página	116/193



20. Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell Proteom.* **2005**, *4*, 1265–1272. [\[CrossRef\]](#)
21. Dasari, S.; Chambers, M.C.; Slebos, R.J.; Zimmerman, L.J.; Ham, A.J.L.; Tabb, D.L. TagRecon: High-throughput mutation identification through sequence tagging. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 1716–1726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Turetschek, R.; Lyon, D.; Desalegn, G.; Kaul, H.P.; Wienkoop, S. A proteomic workflow using high-throughput de novo sequencing towards complementation of genome information for improved comparative crop science. In *Proteomics in Systems Biology*; Humana Press: New York, NY, USA, 2016; pp. 233–243.
23. Hughes, H.; Stephens, D.J. Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *129*, 129–151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Panchaud, N.; Péli-Gulli, M.P. SEACing the GAP that nEGOCiates TORC1 activation: Evolutionary conservation of Rag GTPase regulation. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 2948–2952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Yorimitsu, T.; Zaman, S.; Broach, J.R.; Klionsky, D.J. Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 4180–4189. [\[CrossRef\]](#)
26. Yeasmin, A.M.; Waliullah, T.M.; Kondo, A.; Kaneko, A.; Koike, N.; Ushimaru, T. Orchestrated Action of PP2A Antagonizes Atg13 Phosphorylation and Promotes Autophagy after the Inactivation of TORC1. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166636. [\[CrossRef\]](#)
27. Farhan, H.; Kundu, M.; Ferro-Novick, S. The link between autophagy and secretion: A story of multitasking proteins. *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 1161–1164. [\[CrossRef\]](#)
28. Krick, R.; Bremer, S.; Welter, E.; Schlotterhose, P.; Muehe, Y.; Eskelinen, E.; Thumm, M. Cdc48/p97 and Shp1/p47 regulate autophagosome biogenesis in concert with ubiquitin-like Atg8. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 965–973. [\[CrossRef\]](#)
29. Xie, Z.; Nair, U.; Klionsky, D.J. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 3290–3298. [\[CrossRef\]](#)
30. Huang, W.P.; Scott, S.V.; Kim, J.; Klionsky, D.J. The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5845–5851. [\[CrossRef\]](#)
31. Ishihara, N.; Hamasaki, M.; Yokota, S.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Kihara, A.; Yoshimori, T.; Noda, T.; Ohsumi, Y. Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3690–3702. [\[CrossRef\]](#)
32. Penacho, V.; Valero, E.; Gonzalez, R. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 176–182. [\[CrossRef\]](#)
33. Suzuki, K.; Kubota, Y.; Sekito, T.; Ohsumi, Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **2007**, *12*, 209–218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Suzuki, K.; Akioka, M.; Kondo-Kakuta, C.; Yamamoto, H.; Ohsumi, Y. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 2534–2544. [\[CrossRef\]](#)
35. Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 815–824. [\[CrossRef\]](#)
36. Hutchins, M.U.; Klionsky, D.J. Vacuolar Localization of Oligomeric  $\alpha$ -Mannosidase Requires the Cytoplasm to Vacuole Targeting and Autophagy Pathway Components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20491–20498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Onodera, J.; Ohsumi, Y. Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16071–16076. [\[CrossRef\]](#)
38. Aranda, A.; del Olmo, M. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several *ALD* genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* **2003**, *20*, 747–759. [\[CrossRef\]](#)
39. Khalfan, W.A.; Klionsky, D.J. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 468–475. [\[CrossRef\]](#)
40. Kihara, A.; Noda, T.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 519–530. [\[CrossRef\]](#)
41. Geng, J.; Nair, U.; Yasumura-Yorimitsu, K.; Klionsky, D.J. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 2257–2269. [\[CrossRef\]](#)

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Página	117/193



42. Lipatova, Z.; Belogortseva, N.; Zhang, X.Q.; Kim, J.; Taussig, D.; Segev, N. Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6981–6986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yen, W.L.; Legakis, J.E.; Nair, U.; Klionsky, D.J. Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 581–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yen, W.L.; Klionsky, D.J. Atg27 is a second transmembrane cycling protein. *Autophagy* **2007**, *3*, 254–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Barth, H.; Meiling-Wesse, K.; Epple, U.D.; Thumm, M. Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 23–28. [[CrossRef](#)]
46. Levine, B.; Klionsky, D.J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 463–477. [[CrossRef](#)]
47. McNew, J.A.; Sogaard, M.; Lampen, N.M.; Machida, S.; Ye, R.R.; Lacomis, L.; Tempst, P.; Rothman, J.E.; Söllner, T.H. Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17776–17783. [[CrossRef](#)]
48. Liu, T.T.; Gomez, T.S.; Sackey, B.K.; Billadeau, D.D.; Burd, C.G. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2505–2515. [[CrossRef](#)]
49. Seals, D.F.; Eitzen, G.; Margolis, N.; Wickner, W.T.; Price, A. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9402–9407. [[CrossRef](#)]
50. Fukuda, T.; Kanki, T. Mechanisms and physiological roles of mitophagy in yeast. *Mol. Cells* **2018**, *41*, 35. [[CrossRef](#)]
51. Kanki, T.; Klionsky, D.J. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32386–32393. [[CrossRef](#)]
52. Kanki, T.; Wang, K.; Cao, Y.; Baba, M.; Klionsky, D.J. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 98–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lemasters, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* **2005**, *8*, 3–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	118/193



#### 4.2.2 Proteínas relacionadas con los procesos de apoptosis y autólisis durante la segunda fermentación en botella.

La segunda fermentación en botella que tiene lugar durante la elaboración de vino espumoso, de considerable importancia para la calidad y propiedades organolépticas de estos vinos, supone un desafío importante para las capacidades de adaptación y supervivencia de las cepas de levadura. Durante esta etapa, diferentes condiciones de estrés como el contenido en etanol, la falta de nutrientes o la presión de CO<sub>2</sub>, repercuten de manera negativa en la viabilidad celular, provocando la muerte de las levaduras y su lisis posterior. La muerte celular se define como un tipo de muerte regulada que tiene lugar con características apoptóticas incluyendo producción de ROS y liberación del citocromo c. Por otro lado, la autólisis posterior provoca la liberación de los componentes intracelulares al medio, favoreciendo de manera importante a la calidad y las propiedades organolépticas de los vinos espumosos. Por tanto, el estudio de estos procesos en levaduras industriales nos proporcionará información relevante acerca de su respuesta ante las condiciones típicas de la elaboración de vino espumoso, lo que servirá para mejorar el proceso industrial. En este estudio, se ha llevado a cabo un análisis proteómico comparativo de aquellas proteínas asociadas con los procesos de apoptosis y autólisis en dos cepas vínicas usadas en procesos post-fermentativos (*S. cerevisiae* P29 en la elaboración de vino espumoso, y *S. cerevisiae* G1 en la producción de vino fino), con el fin de caracterizar su respuesta ante las condiciones de presión y detectar posibles biomarcadores.

Para ello las cepas fueron previamente aclimatadas en un mosto pasteurizado a 22 °C durante 5 días. Una vez se alcanzaron valores altos de concentración celular y viabilidad en ambas cepas, así como un valor de etanol similar al del vino base, se procedió al llenado de un total de 24 botellas (12 para cada cepa) con una mezcla fermentativa formada por un vino base comercial, 22 g/L de sacarosa y levaduras (1.5 x 10<sup>6</sup> células/mL). Las botellas que representan la condición con presión (CP) se cerraron con un tapón metálico, mientras que las botellas control sin presión (CNP) se cerraron con un tapón perforado. La segunda fermentación se realizó a 14 °C y la cinética se obtuvo midiendo la presión interna con un afrómetro. Las muestras por triplicado de las botellas con presión se recogieron a dos tiempos durante la segunda fermentación para ambas

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	119/193



cepas: a mitad cuando la presión alcanzó los 3 bares y un mes después de finalizada la segunda fermentación, una vez se alcanzó la máxima presión de 6.5 bares. Al mismo tiempo, también, se recogieron las muestras de las botellas control, pero teniendo en cuenta los valores similares de etanol y azúcares residuales obtenidos bajo ambas condiciones. Las proteínas de cada cepa se separaron previamente usando el fraccionador *OFFGEL* y posteriormente se digirieron con tripsina y se identificaron mediante sus péptidos a través de espectrometría de masas acoplada a un *HPLC*. Una vez identificadas, éstas se cuantificaron y clasificaron mediante bases de datos (*SGD* y *Uniprot*). Además del análisis proteómico, también se obtuvieron datos de viabilidad celular y se midieron ciertos parámetros generales como etanol, azúcares residuales, acidez, pH, y compuestos como ácido láctico y málico.

Los resultados se muestran en el Apéndice 3, correspondiente al artículo Porras-Agüera et al. (2019) publicado en la revista *Microorganisms*.

En este artículo se muestra que la viabilidad celular disminuyó bajo condiciones de presión de CO<sub>2</sub> endógeno, especialmente en la cepa G1, menos adaptada a estas condiciones, mientras que la cepa P29 soportó mejor esta condición de presión, por lo que estos resultados se ajustaron a los esperados. La cepa G1 además, experimentó un aumento en el contenido de las proteínas relacionadas con la apoptosis y de ciertas enzimas que actúan en la autólisis como las glucanasas y proteasas vacuolares un mes después de terminada la segunda fermentación. Aquellas proteínas correlacionadas con la viabilidad bajo presión como Cpr3p, Espr1p, Oye2p y Nma111p, como también aquellas sobre-representadas (Bgl2p, Exg1p y Pep4p) podrían representar posibles biomarcadores bajo presión. Además, el análisis de componentes principales permitió agrupar y diferenciar las muestras de cada cepa según los efectos del tiempo y la presión. Los resultados obtenidos sugieren que la presión afecta al proteoma asociado con la apoptosis y autólisis, y en especial al de la cepa G1.

**Apéndice 3.** Porras-Agüera, J.A.; Moreno-García, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. 2019. First proteomic approach to identify cell death biomarkers in wine yeasts during sparkling wine production. *Microorganisms*. 7:542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110542>

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	120/193





Article

# First Proteomic Approach to Identify Cell Death Biomarkers in Wine Yeasts during Sparkling Wine Production

Juan Antonio Porras-Agüera <sup>1</sup>, Jaime Moreno-García <sup>1</sup>, Juan Carlos Mauricio <sup>1,\*</sup>, Juan Moreno <sup>2</sup> and Teresa García-Martínez <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; b02poagj@uco.es (J.A.P.-A.); b62mogaj@uco.es (J.M.-G.); mi2gamam@uco.es (T.C.-M.)

<sup>2</sup> Department of Agricultural Chemistry, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; qe1movij@uco.es

\* Correspondence: mi1gamaj@uco.es; Tel.: +34 957 218640; Fax: +34 957 218650

Received: 19 September 2019; Accepted: 7 November 2019; Published: 8 November 2019

**Abstract:** Apoptosis and later autolysis are biological processes which take place in *Saccharomyces cerevisiae* during industrial fermentation processes, which involve costly and time-consuming aging periods. Therefore, the identification of potential cell death biomarkers can contribute to the creation of a long-term strategy in order to improve and accelerate the winemaking process. Here, we performed a proteomic analysis based on the detection of possible apoptosis and autolysis protein biomarkers in two industrial yeast strains commonly used in post-fermentative processes (sparkling wine secondary fermentation and biological aging) under typical sparkling wine elaboration conditions. Pressure had a negatively effect on viability for flor yeast, whereas the sparkling wine strain seems to be more adapted to these conditions. Flor yeast strain experienced an increase in content of apoptosis-related proteins, glucanases and vacuolar proteases at the first month of aging. Significant correlations between viability and apoptosis proteins were established in both yeast strains. Multivariate analysis based on the proteome of each process allowed to distinguish among samples and strains. The proteomic profile obtained in this study could provide useful information on the selection of wine strains and yeast behavior during sparkling wine elaboration. Additionally, the use of flor yeasts for sparkling wine improvement and elaboration is proposed.

**Keywords:** apoptosis; autolysis; proteome; yeast; sparkling wine; CO<sub>2</sub> overpressure

## 1. Introduction

Sparkling wines' production involves a secondary fermentation of a base wine followed by a prolonged aging period in contact with lees. Along this stage, known as "prise de mousse", yeast cells must endure hard stress conditions such as high ethanol concentration, nutrient starvation, low pH and temperature, and CO<sub>2</sub> overpressure (6 bars) [1]. Such stress conditions compromise and test the yeast survival, which is ideal to analyze cell death-related processes. Among different yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, due to its easy handling and tractability, has been widely used to study cell death [2–4].

Programmed cell death (PCD) represents a specific type of regulated cell death (RCD), which occurs in strictly physiological scenarios such as development or aging. PCD has been reported to occur with apoptotic features [3,5]. According to Fröhlich and Madeo, 2000 [6], yeast cells undergoing apoptosis display characteristic markers as DNA and mitochondria fragmentation, reactive oxygen species (ROS) accumulation or cytochrome *c* release. The discovery of apoptosis in yeasts has suggested that other forms of RCD might occur, such as programmed necrosis, an active regulatory

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Página	121/193



mechanism taking place along yeast chronological aging [2,5]. Studies by Orozco et al. (2013) [7] observed that factors associated to apoptosis, such as the caspase Mca1p and the apoptosis-inducing factor Aif1p, play a positive role in yeast longevity during winemaking. More recently, results obtained by Duc et al. (2017) [8] indicated that yeast cell death results from its inability to trigger an appropriate stress response under some conditions of nutrient limitations.

Once yeast cells die, the yeast intracellular content is released into the wine due to the action of hydrolytic enzymes during autolysis, an irreversible lytic event associated with cell death [9,10]. This process has been reported to take place during the aging period in sparkling wines elaboration, which is essential for wines to obtain its characteristic properties [11,12]. In order to provide the expected results, yeast cells are subjected to long aging periods and low temperatures that lead to eventual autolysis [13]. While this step is crucial in the process of sparkling wine elaboration, the time restraints make it a bottleneck and consequently, choosing strains with accelerated autolysis is a desirable feature and it has become an object of study of numerous researchers [14–16].

One such strain that could be a candidate for this process are flor yeasts. These yeasts tend to form biofilms on the wine surface under nutrient limitation conditions (among other stresses) during biological aging in sherry wines production [17–20]. Therefore, the benefit of a cellular suicide program seems logical, since apoptosis might increase the nutrients availability for younger cells through the cell death of the older and unhealthy members from the yeast population [6]. However, while autolysis process has been evidenced under enological conditions [21], apoptosis remains unreported in flor yeast so far, although it should be noted that apoptotic factors have been observed during biofilm formation [22].

In this study, the apoptosis and autolysis-related proteome of two industrial yeast strains used commonly in post-fermentative processes (sparkling wine secondary fermentation and biological aging), was analyzed and compared in order to detect potential biomarkers under CO<sub>2</sub> overpressure conditions (typical of sparkling wine elaboration process).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Yeast Strains

Two industrial *S. cerevisiae* yeast strains, which are used after a primary fermentation, were compared in this study: a yeast strain typically used in sparkling wines' fermentation process (P29 CECT 11770), isolated from INCAVI (Catalan Institute of Vines and Wines); and a flor yeast strain (G1 ATCC MYA-2451) isolated from a wine velum from PDO Montilla-Moriles (Spain) with 14.5 % *v/v* ethanol content, an unconventional yeast strain for sparkling wine elaboration responsible for biological aging of sherry-wines.

### 2.2. Second Fermentation Conditions and Sampling Times

Yeast cells were previously grown in YPD medium at 21 °C for 48 h. Later, each strain was inoculated ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) separately in a pasteurized grape juice (Macabeo white grape variety with 174.9 g/L of sugar, 3.6 g/L total acidity and pH 3.4) as acclimation medium and maintained with gentle stirring (100 rpm) at 22 °C for 5 days. Once yeast cells reached high values of cell concentration ( $1.5 \times 10^8$ ), viability (97 %) and ethanol (10.39 % *v/v*), the must was properly filtered (using a sterilized pore filter of 0.45 µm) and "tirage" was carried out using standard sparkling wine bottles of 750 mL, according to INCAVI protocol.

A total of 12 bottles were used for each strain (24 in total) and filled with the fermenting mixture: a standardized commercial base wine (Macabeo and Chardonnay 6:4, 10.21 % *v/v*, 0.3 g/L of sugar, pH 3.29, 5.4 g/L of total acidity and 0.21 g/L of volatile acidity), 22 g/L of sucrose and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL. Half of the bottles (six) were closed with a bidule (plastic lid) and a metal overcap, representing the endogenous CO<sub>2</sub> overpressure condition (PC); and the rest of the bottles (six) were closed with a perforated bidule to allow the output of CO<sub>2</sub>, representing the non-pressure condition (NPC). Bottles under both conditions were incubated at 14 °C. Kinetics of second fermentation by both strains was performed measuring the pressure values with an internal aphrometer (Oenotilus, Station

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	122/193



Oenotechnique de Champagne, Epernay, France). Samples of each strain were taken from three random bottles at two times during the second fermentation: At the middle, when pressure reached 3 bars; and 1 month after it, once the maximum pressure value was measured (6.5 bars). At the same time, samples from the control bottles without pressure were collected considering similar values under both conditions of sugar consumption (T1:  $9.07 \pm 0.26$  g/L and T2:  $0.3 \pm 0.0$  g/L) and ethanol content (T1:  $10.74 \pm 0.03$  % *v/v* and T2:  $11.56 \pm 0.04$  % *v/v*).

### 2.3. Viability

Viable yeast cells counting was carried out using appropriate dilutions with Ringer solution. These were then plated in Sabouraud agar medium for 48 h at 28 °C and all samples were analyzed by triplicate.

### 2.4. General Wine Parameters

Ethanol content (% *v/v*), reducing sugars, volatile and total acidity, and pH were quantified according to methods described by OIV (2018) [23]. Malic and lactic acid were analyzed using enzymatic method through a multi-parametric analyzer Lisa 200 (Hycel Diagnostics, Technology Diffusion Iberica, Barcelona, Spain).

### 2.5. Protein Extraction, Identification and Quantification

Methods described in Moreno-García et al. (2015) [24] and Ishihama et al. (2005) [25] for protein extraction and identification, and quantification were used, respectively. Yeast cells from each strain were collected separately by centrifugation and lysed using a Vibrogen Cell Mill. Proteins were extracted and separated according to their isoelectric point using the OFFGEL High Resolution kit pH 3–10 (Agilent Technologies Palo Alto, CA). These proteins were digested into peptides with trypsin and identified through mass spectrometry using a LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) coupled to a nano LC Ultimate 3000 system (Dionex, Germany).

Once proteins were identified, apoptosis and autolysis-related proteins were selected through the Gene Ontology section from the *Saccharomyces* genome database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) and Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) databases.

### 2.6. Confidence Parameters and Statistics

Proteins detected with score > 2 and observed peptides  $\geq 2$  were selected to proceed with the analysis. These parameters are provided in Table S1 for each process. Regarding the most abundant common proteins, those whose content ratio PC/NPC reached values  $\geq 2$  (over-represented) and  $\leq 0.5$  (down-represented), as well as the specific proteins of each strain, were highlighted and discussed in detail. Moreover, proteins found with the highest contents were considered as well. Among the protein group annotation, *p*-values as well as the FDR or False Discovery Rate for each one, were calculated by the tool “GO Term finder” from SGD database. The total of ORFs identified in *S. cerevisiae* (according to the SGD database) was used as a background set of genes and it was taken into account only by those genes which are translated into proteins. GO terms with *p*-values lower than 0.01 were highlighted. The software Statgraphics Centurion v.XVI was used to perform a multiple-sample comparison (MSC) with a confidence level of 95.0 %, according to Fisher’s least significant difference (LSD) method, One-way ANOVA and Principal Component Analysis (PCA). The software STRING (version 11.0) was used to create the interaction network map. Correlation analysis was performed using the version 4.0 of the software MetaboAnalyst. Data were properly normalized (square root) and auto scaled, prior to analysis.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	123/193



### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Second Fermentation Kinetics and Cell Viability

Figure 1 shows the evolution of endogenous CO<sub>2</sub> released by *S. cerevisiae* P29 and G1 along the second fermentation. The sparkling wine yeast strain P29, commonly used in the elaboration of these wines, reached 3.3 bars at 8 days and 6.5 bars at 23 days, representing the middle and the end of second fermentation, respectively. On the other hand, flor yeast G1 showed a slightly slower kinetics, obtaining 3.6 bars at 10 days, while the maximum value of 6.4 bars was measured at 28 days. The wine composition at this final point in both strains was as follows: 11.56 ± 0.04 % *v/v* ethanol, 0.3 ± 0.0 g/L reducing sugars, 0.23 ± 0.02 g/L volatile acidity, 5.25 ± 0.02 g/L total acidity, 3.3 ± 0.02 pH, 1.89 ± 0.06 g/L malic acid, 0.1 ± 0.0 g/L lactic acid in *S. cerevisiae* P29; and 11.4 ± 0.2 % *v/v* ethanol, 0.3 ± 0.0 g/L reducing sugars, 0.28 ± 0.01 g/L volatile acidity, 4.3 ± 0.3 g/L total acidity, 3.37 ± 0.01 pH, 0.2 ± 0.1 g/L malic acid, 1.2 ± 0.1 g/L lactic acid in *S. cerevisiae* G1.

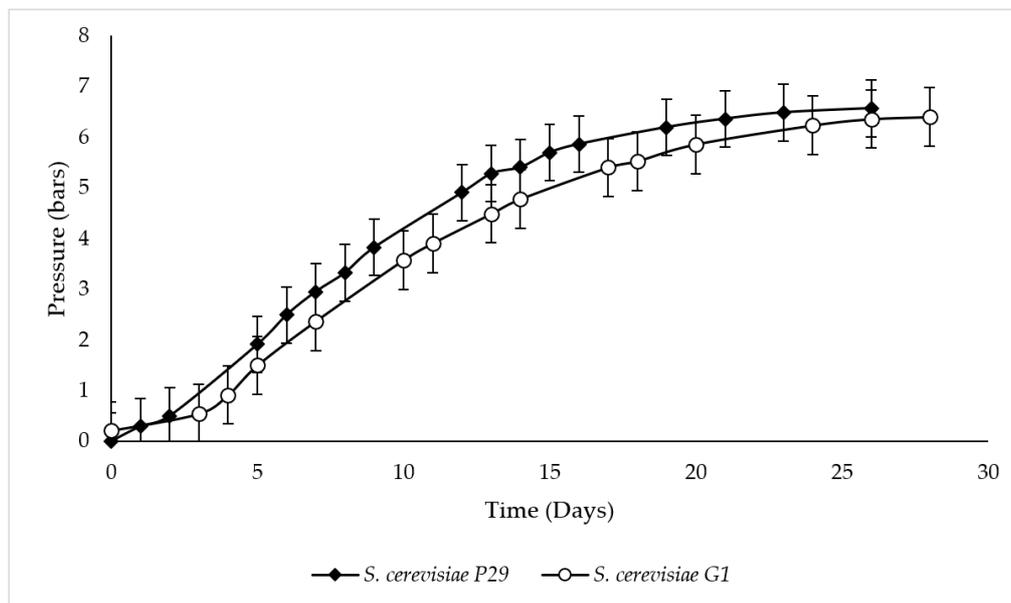


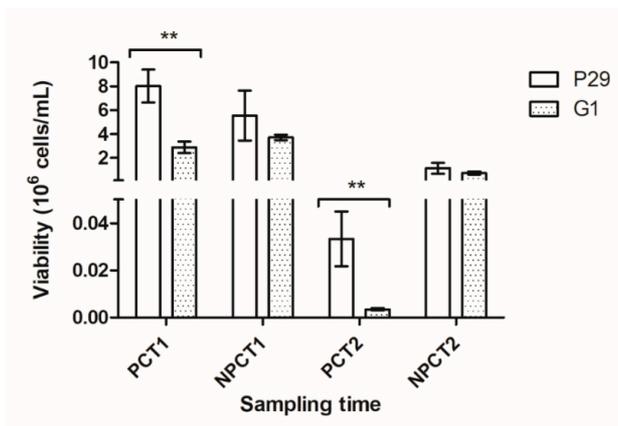
Figure 1. Kinetics of second fermentation performed by *S. cerevisiae* P29 and G1.

As it is observed in Figure 2, cell viability decreased considerably over time and it was more pronounced and significant under PC. Focusing on each strain separately, remarkable differences can be noticed in samples subjected to CO<sub>2</sub> pressure (PCT1 and PCT2), where the yeast strain P29 outperformed G1, reaching more than double in both sampling times. In addition, P29 also obtained high viability values under NPC, especially at T1.

Second fermentation kinetics and viability results reveal that apart from enduring better pressure, *S. cerevisiae* P29 is also more adapted to the medium conditions, which may be logical since it is typically used during sparkling wine elaboration. Nevertheless, it is not the case of G1, whose kinetics and viability seem to be affected negatively by these factors. These differences observed in both yeast strains could be explained due to the different environmental conditions, in terms of ethanol content, pressure or nutrients availability, in which yeast cells have to cope along with the *prise de mousse*. According to the results, the study of cell death-related proteome in these yeast strains would be of great interest to try to characterize their response under pressure conditions.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Página	124/193





**Figure 2.** Cell viability (cells/mL) observed in both *S. cerevisiae* yeast strains P29 and G1 under PC (CO<sub>2</sub> pressure condition) and NPC (non-CO<sub>2</sub> pressure condition), in each sampling time: at the middle of the secondary fermentation (T1) and 1 month after the secondary fermentation (T2). Error bars represent the standard deviation of the three independent experiments. Significant differences from One-way ANOVA analysis are indicated by \*, depending on the significance level (\* < 0.05; \*\* < 0.01).

### 3.2. Study of the Proteome

In this work, the total of proteins identified after analysis, in both *S. cerevisiae* P29 and G1, was: 594 and 568, respectively, under PCT1; 1517 and 1000 under NPCT1; 419 and 94 under PCT2; 392 and 218 under NPCT2. In *S. cerevisiae*, a total of 24 and 184 proteins related to apoptosis and autolysis, respectively, have been reported so far, representing 0.36 and 2.79% of the total proteome (6604 ORFs, according to SGD database). From the proteomes associated with these processes, 13 (54.17 %) and 84 (45.65 %) apoptosis and autolysis proteins, respectively, were found in this study. The frequency values were calculated considering the total proteome identified under each condition, as mentioned above. It highlighted the high frequency values obtained in both strains for apoptosis proteins (2.30 % in P29 and 2.29 % in G1) under NPCT2. As for the total autolysis-related proteins frequencies, the value observed in G1 under NPCT2 (6.88 %) stood out among the rest. Hydrolytic enzymes, mainly glucanases and vacuolar proteases, were relevant in terms of frequency in flor yeast G1 under PCT2. On the contrary, non-vacuolar proteases were more abundant at T1 under both conditions and especially in G1 (3.70% under PCT1 and 3.30% under NPCT1).

Regarding the total number of proteins, P29 showed a greater abundance of both apoptosis and autolysis in all sampling times, except under PCT1 for apoptosis, and PCT1 and NPCT2 for autolysis. Nevertheless, this increase is not reflected in terms of content. Total values of protein content (mol%), provided in Table 1, were higher in flor yeast G1 than in P29, considering the two processes, except in the case of apoptosis under NPCT2 and autolysis under NPCT1. Differences in content of apoptosis proteins between strains were established under each condition, except under NPCT2 (Table 1). On the contrary, pressure only boosted the content of autolysis proteins in flor yeast, even though the highest protein content was reported under NPCT2 (Table 1). As it is observed, differences between yeast strains, considering the autolysis proteome, only appeared once the maximum value of pressure (6.5 bars) was reached at T2. These results suggest that both CO<sub>2</sub> overpressure and fermentation stage affect flor yeast, especially in the apoptosis-related proteome, which may be related to the decrease in viability experimented in sealed bottle at the first month of aging (Figure 2). Focusing on the autolysis enzymes, a similar pattern was observed. Along the second fermentation, the content of glucanases and vacuolar proteases increased more under PC in flor yeast (Table 1), whereas nucleases in general were more abundant in P29. The presence of glucanases and vacuolar proteases with high content in flor yeast at T2 may be explained due to the structural and morphological changes during autolysis [26]. Since this yeast strain is not adapted to pressure

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Página	125/193



conditions, the requirement of proteins involved in cell wall remodeling could be more relevant in flor yeast than in P29. This result, along with the high content of apoptosis proteins reported, could make flor yeast interesting from an industrial and enological point of view, thus favoring a faster cell death and later compounds release during aging. Apart from vacuolar proteases, those not located in this organelle were the most remarkable in terms of protein number at T1, although this value dropped at T2 and it was more noticeable in the case of flor yeast. Moreover, the content of these enzymes seems to be affected by fermentation stage, decreasing from T1 to T2 (Table 1), rather than pressure. On the other hand, mannosidases were not observed under PC in flor yeast, only in P29 at T2, indicating a negative effect of pressure.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	126/193



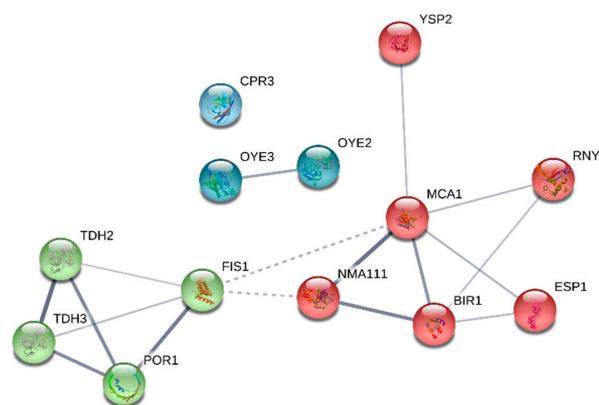
**Table 1.** Total average value of protein content (mol%) of the proteins related to apoptosis and autolysis identified in *S. cerevisiae* P29 and G1 under pressure (PC) and non-pressure (NPC) conditions, and in each sampling time: at the middle of the secondary fermentation (T1) and 1 month after it (T2). Total proteome identified so far in *S. cerevisiae* is provided. A–e Different letters in a row represent significant differences of protein content in each condition at 0.05 level according to Fisher's least significant difference procedure. n.f. not found.

Condition	PC T1		NPC T1		PC T2		NPC T2	
	P29	G1	P29	G1	P29	G1	P29	G1
<b>Total Apoptosis</b>	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD
	1.7b ± 0.2	2.5c ± 0.3	1.2a ± 0.2	2.7c ± 0.2	3.2d ± 0.3	4.5e ± 0.2	3.4d ± 0.4	3.5d ± 0.3
<b>Total Autolysis</b>	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD	mol% ± SD
<i>Glucanases</i>	3.3a ± 0.4	3.7a ± 0.7	5bc ± 1	3.3a ± 0.8	3.3a ± 0.5	4.9bc ± 0.3	3.7ab ± 0.4	5.9c ± 0.5
<i>Mannosidases</i>	0.73b ± 0.08	0.51a ± 0.04	0.7b ± 0.2	0.6ab ± 0.1	1.2c ± 0.2	2.4e ± 0.1	1.7d ± 0.2	2.18e ± 0.09
<i>Non-vacuolar proteases</i>	n.f.a	n.f.a	0.13c ± 0.05	0.05b ± 0.02	0.022b ± 0.001	n.f.a	n.f.a	0.104c ± 0.001
<i>Vacuolar proteases</i>	1.5c ± 0.3	1.6c ± 0.4	2.94d ± 0.8	1.5c ± 0.4	0.8b ± 0.2	n.f.a	0.6b ± 0.1	1.4c ± 0.2
<i>Nucleases</i>	0.9a ± 0.1	1.3c ± 0.2	0.9a ± 0.2	1.0ab ± 0.2	0.9a ± 0.1	2.6d ± 0.2	1.2bc ± 0.1	2.3d ± 0.2
	0.18c ± 0.01	0.3de ± 0.1	0.25cd ± 0.04	0.18c ± 0.1	0.43e ± 0.02	n.f.a	0.29d ± 0.02	0.06b ± 0.02

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	127/193



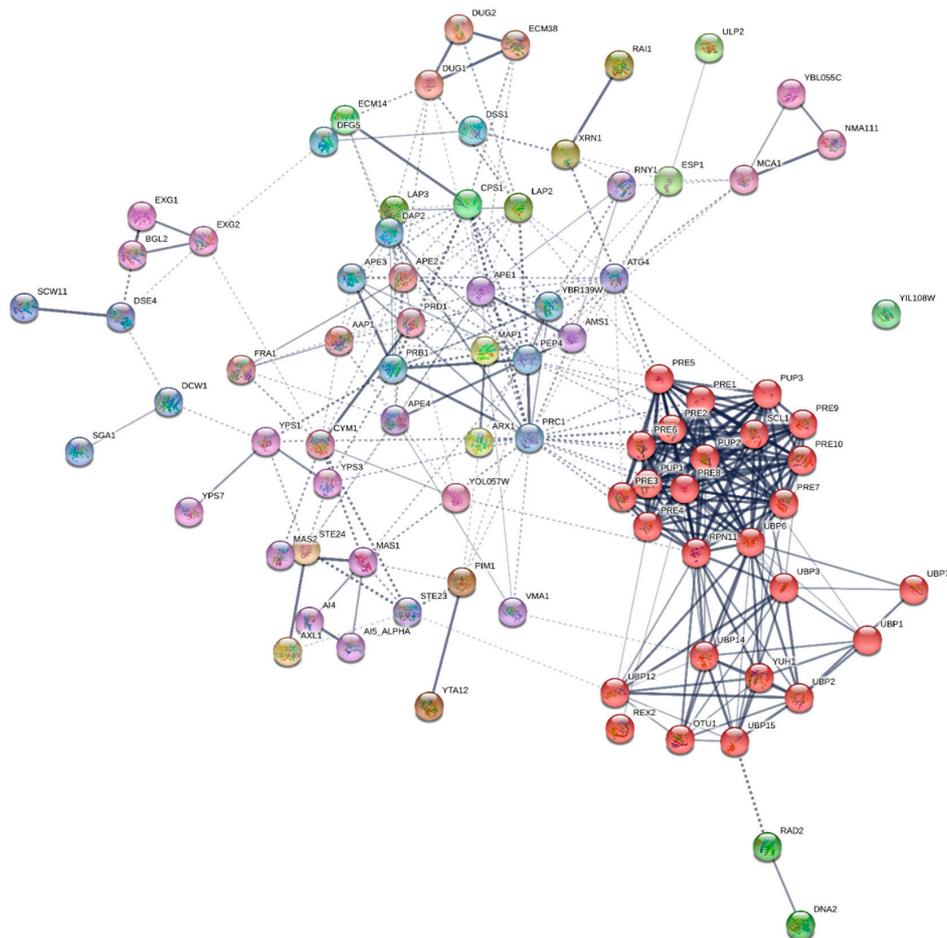
In order to observe the possible protein–protein connections between apoptosis and autolysis-related proteins in both strains, interaction maps built using the STRING v.11.0 database are provided in Figures 3 and 4. The connections between proteins are established by edges and the edges thickness represents the strength of these connections. From the total of 13 apoptosis proteins in both strains, only 17 interactions between them were reported, whereas more numbers of edges (350) and stronger connections were established in the case of autolysis proteins. The connections between proteins were obtained with a  $p$ -value  $< 6.21 \times 10^{-10}$  for apoptosis and  $< 1 \times 10^{-16}$  in the case of autolysis proteins. This enrichment indicates that the proteins are partially biologically connected as a group. Moreover, proteins were grouped into different clusters through MCL (Markov Cluster Algorithm) clustering method. Apoptosis proteins were sorted into three different clusters (Figure 3), represented by red, green and blue nodes. Connections between the proteins Nma111p, Mca1p and Bir1p (red nodes) and Tdh2p, Tdh3p, Por1p and Fis1p (green nodes), were reported as the strongest, while Cpr3p was the only protein that showed no interaction with the rest. On the contrary, a higher number of cluster and nodes were observed in the autolysis map (Figure 4). The red nodes were perfectly separated in the map, most of them belonging to the proteasome subunits. Among them, the alpha and beta subunits (Pre1-10p and Pup1-3p) showed the strongest interactions considering all the autolysis proteins identified. Apart from these, the ubiquitin-dependent proteins (Ubp1-3p, Ubp6p, Ubp7p, Ubp12p, Ubp14p, Ubp15p, Ulp2p, Otu1p, Rex2p, Rpn11p, and Yuh1p) are also highlighted in the red cluster. This could indicate a role of the proteasome complex and ubiquitin-dependent catabolism during autolysis, although it has been not reported so far. In addition, no interactions were reported for the protein Yil108wp.



**Figure 3.** Interaction network map built using STRING v11.0 and based on the 13 apoptosis-related proteins in total detected in *S. cerevisiae* P29 and G1. Proteins are shown as nodes and the existence of interactions between them are represented by edges (connection between nodes). Edges thickness indicates the strength of the different interactions. Nodes with the same color represent specific clusters. PPI enrichment  $p$ -value  $< 6.21 \times 10^{-10}$ .

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	128/193





**Figure 4.** Interaction network map built using STRING v11.0 and based on the 84 autolysis-related proteins in total detected in *S. cerevisiae* P29 and G1. Proteins are shown as nodes and the existence of interactions between them are represented by edges (connection between nodes). Edges thickness indicates the strength of the different interactions. Nodes with the same color represent specific clusters. PPI enrichment  $p$ -value  $< 1 \times 10^{-16}$ .

To achieve a more detailed conclusion, each process as well as the most remarkable proteins identified (over and down-represented, specific proteins of each strain and those showing high protein content, all of them under PC) have been discussed separately.

#### 1. Apoptosis

Apoptosis-related proteins identified in both yeast strains are provided in Table 2. The most remarkable apoptosis-related proteins are shown in Table 3 where those that were over-represented under PC were: Cpr3p, Esp1p, Nma111p and Oye2p in G1 at T1; whereas at T2, only Oye2p was over-represented in P29.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	129/193



**Table 2.** List of the most relevant apoptosis-related proteins identified in *S. cerevisiae* P29 and G1 under each study condition (PC: pressure condition, NPC: non-pressure condition) and sampling time (T1: middle of the second fermentation, T2: 1 month after it). Proteins showing a high content are highlighted in bold. a–g Different superscript letters indicate significant differences of protein content in each condition at 0.05 level according to Fisher's least significant difference procedure. Proteins showing significant differences in all conditions are marked with an asterisk \*. n.f.; not found. ns.; not significant.

Condition	PCT1			PCT2			NPCT1			NPCT2		
	P29	G1	SD	P29	G1	SD	P29	G1	SD	P29	G1	SD
<b>Strain</b>												
<b>Protein</b>	<b>Molecular function</b>											
Bir1p	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns
<b>Cpr3p</b> *	0.098b	0.001	0.3d	0.1	0.0977b	0.0003	n.f.a	0.081ab	0.005	0.098b	0.001	0.2cd
Esp1p	n.f.ns	0.007ns	0.004	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	0.005ns	0.002	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns
Fis1p	n.f.a	n.f.a	n.f.a	n.f.a	n.f.a	0.01	n.f.a	0.021a	0.007	n.f.a	n.f.a	0.13b
<b>Mca1p</b> *	n.f.a	n.f.a	n.f.a	0.11c	n.f.a	0.05b	n.f.a	0.05b	0.02	0.05b	n.f.a	0.137d
Nma111p	n.f.ns	0.02ns	0.01	n.f.ns	n.f.ns	0.011ns	n.f.ns	0.011ns	0.006	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns
<b>Oye2p</b> *	0.28c	0.03	0.4cd	0.1	0.4d	0.1	n.f.a	0.148b	0.001	0.13b	0.07	0.131b
Oye3p*	n.f.a	n.f.a	n.f.a	n.f.a	n.f.a	0.04b	n.f.a	0.04b	0.02	0.012a	0.006	0.09c
<b>Por1p</b> *	n.f.a	n.f.a	n.f.a	0.5e	n.f.a	0.1	n.f.a	0.09b	0.05	0.05ab	0.02	0.32d
Rny1p*	n.f.a	n.f.a	n.f.a	0.100e	n.f.a	0.003	n.f.a	0.016c	0.004	0.011b	0.004	0.08d
<b>Tdh2p</b> *	0.6b	0.1	0.79c	0.05	0.90c	0.05	2.2f	0.1	0.36a	0.03	1.12d	0.1
<b>Tdh3p</b> *	0.72b	0.02	0.98c	0.06	1.06cd	0.01	2.27g	0.09	0.36a	0.06	1.19e	0.05
Ysp2p	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns	0.003ns	0.002	n.f.ns	n.f.ns	n.f.ns

<sup>h</sup> Average values of protein content (mol %) and <sup>i</sup> standard deviation (SD).



**Table 3.** List of over-represented and specific proteins related to apoptosis and autolysis under CO<sub>2</sub> overpressure condition (PC) detected at the middle of the second fermentation (T1) and 1 month after it (T2), in *S. cerevisiae* P29 and G1.

Strain	<i>S. cerevisiae</i> P29		<i>S. cerevisiae</i> G1	
	T1	T2	T1	T2
<b>Apoptosis proteins</b>	-	Oye2p <sup>a</sup> (3.3)	Cpr3p (2.8), Esp1p (specific), Nma111p (specific), Oye2p (3.1) Exg2p (2.4)	
Glucanases	-	-	-	
Mannosidases	-	Ams1p (specific)	-	
<b>Autolysis proteins</b>	-	-	Ape1p (2.9), Ybr139wp (2.4)	
Vacuolar proteases	-	Pre6p (specific), Pre7p (specific), Rpn11p (specific)	Ape2p (3.3), Esp1p (specific), Lap3p (2.4), Mas2p (3.2), Nma111p (specific), Pre10p (specific), Pre4p (2.4), Ste24p (specific), Ubp6p (specific)	
Non-vacuolar proteases	-	-	-	
Nucleases	Dna2p (specific)	-	Vma1p (2.1), Ybl055cp (specific)	

<sup>a</sup> Fold change of protein content (PC/NPC) and specific proteins under PC are shown in brackets.



Oye2p, over-represented three-fold under PCT1 in flor yeast (Table 3), is a conserved NADPH oxidoreductase whose overexpression has been demonstrated to lower endogenous reactive oxygen species (ROS), increase resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PCD, and significantly decrease ROS levels generated by organic prooxidants [27]. On the other hand, the fact that Oye2p is over-represented in P29, only under PCT2, can be associated with ethanol stress response [28]. The cyclophilin Cpr3p, located in the matrix of yeast mitochondria and involved in protein folding [29], has been observed to mediate Cu-induced apoptosis in yeast [30] and some forms of necrotic death [31,32]. Additionally, proteins such as Esp1p and Nma111p were found in flor yeast only under PCT1, while in P29 they appeared exclusively under NPCT1. The caspase-like protease Esp1p has been associated with the apoptosis promotion in budding yeast, through the cleavage of the protein Mcd1p [33]; whereas the interaction of the nuclear mediator of apoptosis Nma111p and Bir1p (Figure 3) has been reported to induce apoptosis [34]. The high content under PCT1 of these proteins in flor yeast may be associated with the raise of typical stresses of sparkling wine production [35], conditions which are not common of this type of yeasts. Apart from these stresses, the absence of oxygen in a sealed bottle may compromise the viability of flor yeasts, since under oxidative conditions these yeasts are known to form biofilm, which allow their growth on non-fermentable carbon sources such as ethanol, assuring cell survival under such conditions [17,18].

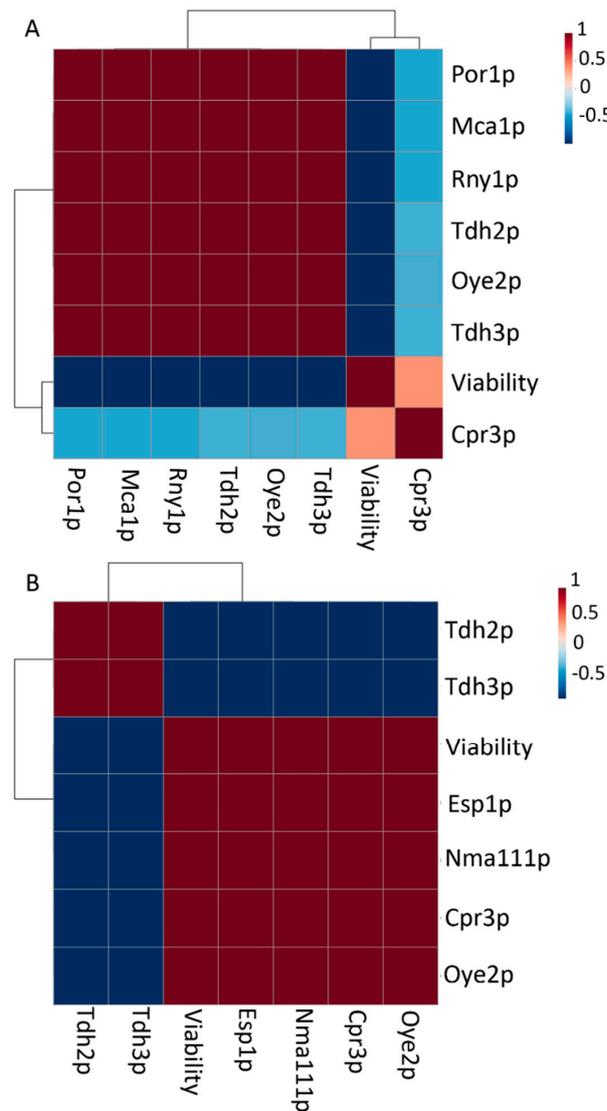
As for the rest of the proteins, although they were not found to be over-represented under PC, the GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) isoenzymes Tdh2p and Tdh3p highlighted in flor yeast under PCT2 in terms of content, two-folding the P29 content (Table 2). Although these enzymes have been reported to be crucial mediators of yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis together with nitric oxide (NO) [36] and a specific substrate of yeast metacaspase [37], they are known to be essential glycolytic enzymes [38]. Therefore, the difference in content of these enzymes may be due to a different metabolic response to environmental conditions. The metacaspase Mca1p was down-represented under PC in both strains at T1, and at T2 was only detected in P29 (Table 2), even though its protein content did not highlight. Furthermore, the RNase Rny1p, was also found to be down-represented under PCT1 in both strains, although in this case its content at T2 was higher than the caspase. Thompson and Parker (2009) [39] showed that in yeast, tRNAs are cleaved by this protein and released from the vacuole into the cytosol during oxidative stress, promoting apoptosis. Other interesting proteins identified in both strains to be down-represented under PC were: Por1p, a mitochondrial outer membrane protein porin 1 reported to regulate negatively acetic acid-induced apoptosis by an AAC (ADP/ATP carrier)-dependent mechanism [40]; Oye3p, which has an opposite role to Oye2p [27]; Fis1p or mitochondrial fission protein, found exclusively in P29, thought to mediate both ethanol-induced apoptosis and mitochondrial fragmentation [41], although without correlation with cell death; and Bir1p, member of the apoptosis inhibitor family involved in cell division regulation [42]. Moreover, it should be noted that the Aif1p or apoptosis-inducing factor, known to be translocated to the nucleus in response to apoptotic stimuli [43], was detected only in flor yeast under NPCT2 with a low content, but it was not selected to proceed with the proteomic analysis since it was detected with a score value and peptides < 2.

As it has been mentioned above, a significant drop in viability was observed under pressure conditions along the second fermentation (Figure 2). Therefore, those proteins detected under this condition may represent possible cell death biomarkers. In order to analyze this relationship, the software MetaboAnalyst was used to perform a correlation matrix between the content of apoptosis-related proteins and viability values identified just in a sealed bottle for each strain (Figure 5). Clustering analysis separated the proteins in two groups according to the type of correlation with cell viability. In the case of apoptosis in P29 (Figure 5A), most of the proteins showed negative correlations: Mca1p (p-value:  $4.7 \times 10^{-3}$ ), Oye2p ( $1.8 \times 10^{-5}$ ), Por1p ( $4.7 \times 10^{-5}$ ), Rny1p ( $4.7 \times 10^{-5}$ ), Tdh2p ( $1.5 \times 10^{-5}$ ), and Tdh3p ( $1.7 \times 10^{-5}$ ). On the contrary, those in G1 (Figure 5B) showed both positive: Oye2p ( $3.7 \times 10^{-5}$ ), Cpr3p ( $3.6 \times 10^{-5}$ ), Nma111p ( $3.4 \times 10^{-5}$ ), and Esp1p ( $2.8 \times 10^{-3}$ ); and negative: Tdh2p ( $5.7 \times 10^{-5}$ ) and Tdh3p ( $6.1 \times 10^{-5}$ ). All these proteins correlated with viability under PC may represent possible biomarkers during the second fermentation, since as it has been mentioned above, all of them have been related to cell death [37,39,40] or stress response [27]. Moreover, those proteins are

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	132/193



also found to be over-represented under PC such as Oye2p in both strains; and Cpr3p, Esp1p and Nma111p just in G1, could be proper biomarkers in order to accelerate cell death and promote further autolysis in these wine yeasts [14,15].



**Figure 5.** Correlation matrix and clustering analysis based on the content of normalized and scaled data of apoptosis proteins and cell viability observed under CO<sub>2</sub> overpressure conditions in: (A) *S. cerevisiae* P29 and (B) G1.

## 2. Autolysis

Glucanases, nucleases and proteases, especially those located in the vacuole, are the main hydrolytic enzymes involved in yeast autolysis. Autolysis-related proteins identified in both yeast strains are provided in Table S2. In these tables, relevant proteins in terms of content and those significant are highlighted. Among the GO annotations, “proteolysis” was the most significant biological process in both strains during autolysis, especially under NPCT1, followed by others related to proteasome functions and the organonitrogen compound metabolic process (Tables S3 and S4).

During yeast autolysis, glucanases and mannosidases were reported as the main enzymes involved in cell wall degradation [10]. Among the glucanases over-represented under PC, only the

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	133/193



exo-1,3-beta-glucanase Exg2p involved in cell wall beta-glucan assembly was detected in G1 at T1 (Table 3). Bgl2p and Exg1p (not over-represented under PC) were found with the highest contents in both strains, especially in flor yeast (Table S2). These endo and exo-beta-1,3-glucanases, respectively, are known to be the major glucanases of the cell wall required for cell wall maintenance and incorporation of newly synthesized mannoprotein molecules into the cell wall and beta-glucan assembly [44,45]. The presence of both over-represented proteins (Exg2p) and those most abundant under PC (Bgl2p and Exg1p) may indicate higher glucans and mannoproteins degradation and release during autolysis. Nevertheless, mannosidases were found with low protein content in both yeast strains and only the vacuolar mannosidase Ams1p involved in free oligosaccharide degradation [46] was detected to be over-represented under PC T2 only in P29 (Table 3).

Regarding those proteases not located in the vacuole, differences in terms of protein number were observed in the over-represented proteins under PC, depending on the yeast strain. Whereas in flor yeast, these over-represented proteins were found only at T1; in the case of P29, they were specifically detected at T2 (Table 3). In flor yeast, the following stood out: the leucine aminopeptidase Ape2p involved in peptides metabolism [47], which obtained a value 3.34-fold higher under PCT1; the protein Mas2, detected 3.25-fold under PC and required for mitochondrial processing protease (MPP) [48]; and the cysteine aminopeptidase Lap3p [49]. The presence of these proteins over-represented in flor yeast may be explained due to their function in protein and peptides processing, thus promoting amino acid and peptide release during autolysis [12]. Apart from these, other proteases mentioned above (Esp1p and Nma111p), proteasome subunits (Pre4p, Pre10p and Ubp6p) and a metalloendopeptidase (Ste24p) were also found to be highly represented under PC or specifically in flor yeast. On the other hand, in P29, only three proteins (Pre6p, Pre7p and Rpn11p) were found to be over-represented under PCT2 and specific to this strain (Table 3). As in flor yeast, most of the proteins identified in P29 to be over-represented were involved in proteasomal functions, which is in accordance with the GO terms associated with proteasome in both strains (Tables S3 and S4). The 26S proteasome, which comprised of a 19S regulatory particle and a 20S catalytic core particle, is the protease responsible for the non-vacuolar degradation of cellular proteins [50,51] containing 14 subunits (seven alpha-type and seven beta-type). All these proteasome subunits along with those involved in ubiquitin-dependent catabolism as Ubp proteins, were perfectly clustered (red nodes) in the interaction map (Figure 4) and indeed, they showed the strongest connections among the total. These results suggest an important role of this complex during autolysis, although it has not been reported yet. Additionally, other proteins such as the peptidase Dug1p, involved in glutathione degradation [52], were not detected as over-represented under PC, but reached a maximum value in flor yeast at NPC T2 (Table S2), which might explain the fact that at this time and condition in this strain, the total content of peptidases experimented with an increase, as was mentioned above. Also, this protein was identified under PC T2 specifically in P29 (Table S2).

Yeast vacuole contains a total of seven proteases (reported thus far) which contribute to a wide range of essential functions, being the principal function the protein degradation under starvation conditions [53]. In fact, Teichert et al. (1989) [54] observed a degradation of up to 85% of the intracellular content during this stress. These vacuolar proteases include three aminopeptidases (Ape1p, Ape3p and Dap2p), two carboxypeptidases (Prc1p and Cps1p) and two endopeptidases (Pep4p and Prb1p), even though recently, Parzych et al. (2018) [55] reported the presence of another carboxypeptidase, Atg42p/Ybr139wp, required for normal vacuole function and autophagy. Among the vacuolar proteases, only Ape1p and Ybr139wp were found to be over-represented under PC at T1, in the case of flor yeast, whereas no proteins were highly represented at T2 (Table 3). Both the aminopeptidase Ape1p and the carboxypeptidase Ybr139wp have been involved in autophagy [55–57]. Moreover, even though it was not found to be over-represented, the proteinase A or Pep4p was identified in all the sampling times and it reached the highest protein content in both strains, standing out in flor yeast under PCT2 (Table S2). This vacuolar protease has been demonstrated to be the main enzyme involved in yeast autolysis and responsible for 80% of the nitrogen release [58]. In addition, a protective role has been observed during acetic acid-induced apoptosis [59] and chronological aging [60]. As for the rest of vacuolar proteases, it highlighted the carboxypeptidase Prc1p [61], which

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	134/193



obtained high values of protein content in flor yeast and especially at T2 (Table S2). Finally, in addition to proteases and glucanases, nucleases involvement in autolysis has been studied under enological conditions [62,63], but further studies are necessary to clarify the impact on wine quality. In this study, over-represented nucleases under PC were found only at T1 in both strains. Among them, the endonuclease Vma1p [64] highlighted in flor yeast and obtained a value two-fold higher under this condition (Table S2). Moreover, other nucleases such as Ybl055cp were also found to be specific to flor yeast. According to Qiu et al. (2005) [65], this protein may participate in DNA degradation during apoptosis. In P29, however, only Dna2p involved in DNA elongation [66] was over-represented under PC (Table 3).

In addition to the flocculation capacity reported in flor yeast [18] and its ethanol tolerance, an accelerated autolysis represents a desirable feature for the sparkling wines production, since it would allow a faster cell compound release and acquisition of the organoleptic properties during aging. The detection of both glucanases and vacuolar proteases highly represented in sealed bottle conditions and others with high content in flor yeast, make this type of yeast an interesting alternative for sparkling wine improvement and elaboration. In fact, the selection of flocculent yeasts and the study of the autolytic ability of these yeasts to improve sparkling wine fermentation have been reported [67–69]. Furthermore, the impact of flor yeasts on the sparkling wine quality has been recently observed [70]. These authors used for the first time a flor yeast to carry out a second fermentation in a bottle and revealed that aroma compounds are affected by pressure and fermentation stage.

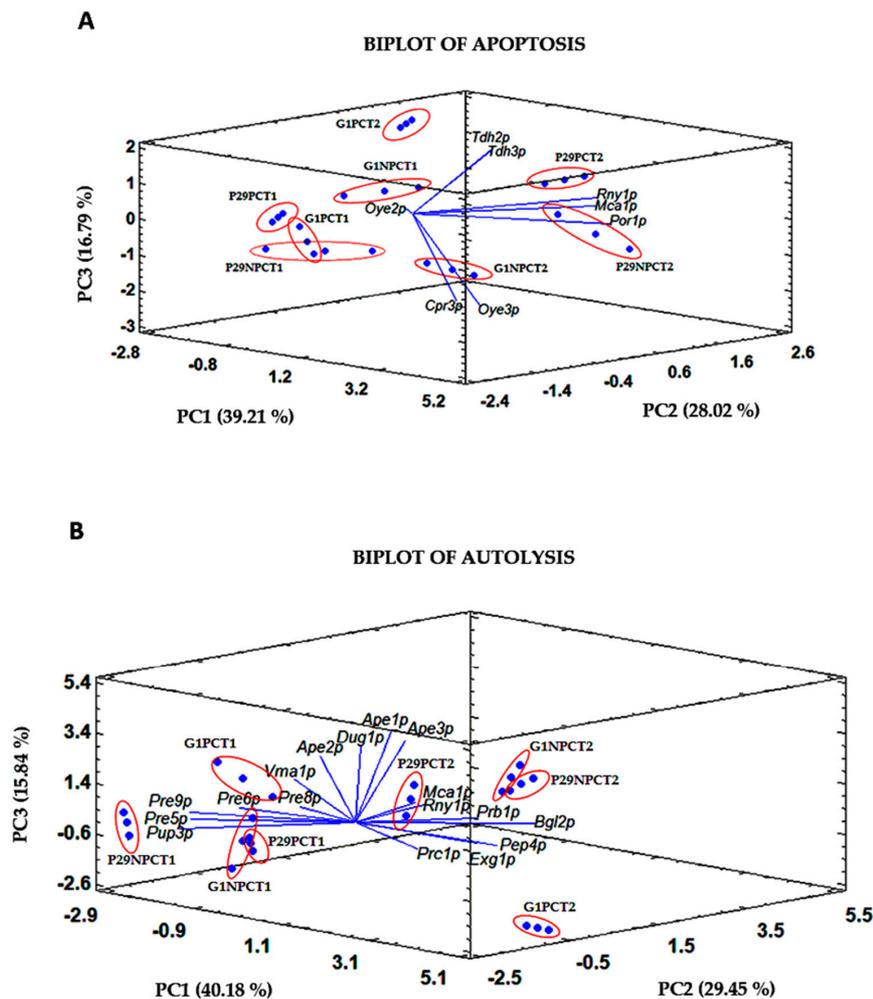
### 3. Principal Component Analysis (PCA)

Those proteins showing between 4–8 homogeneous groups (HG), at 0.05 level, according to Fisher's least significant difference procedure (highlighted with an asterisk in Tables 2 and S2) in both yeast strains and biological process, were subjected to a Principal Component Analysis (PCA) (Figure 6). This analysis allows for the establishment of linear combinations between the different variables which account for most of the variability of the data and provide classification among the samples.

Three components whose values are greater than or equal to 1.0, have been extracted in both PCAs. In this way, the three PCs obtained for the biplot of apoptosis proteins explain 84.01% of the total cumulative variance by the eight selected variables. PC1 accounts for 39.21% of the variance, while PC2 and PC3 explain 28.02 and 16.79%, respectively. According to the results, PC1 seems to distinguish between yeast strains, locating the P29 and G1 samples on the right and left side, respectively. The contribution of each protein to each component is established by their coordinate values on the corresponding axis. Proteins such as Rny1p (0.51) and Mca1p (0.49) in P29, and the GAPDH proteins Tdh2p (−0.27) and Tdh3p (−0.25) in G1, were those that contributed the most to this difference between strains. On the other hand, PC2 grouped the samples based on the time effect, establishing a separation between T1 samples (on the left with negative scores) and those at T2 (on the right with positive scores). This component was mainly influenced by Tdh2p (0.54) and Tdh3p (0.52) at T2, and Oye2p (−0.33) at T1. Differences in time may be explained since cell death was more relevant at the end of the fermentative process, as is shown in Figure 2 for the viability, which may be caused by the pressure effect. On the contrary, apoptosis does not seem to be affected at T1, since samples of both strains were perfectly grouped. Last, PC3 differentiated the samples depending on the condition: PC samples seem to be located on the positive side of the component, while the control samples NPC are on the negative side. This component correlates mainly with the content of Oye2p (0.22 and −0.72) and the GAPDH enzymes (both with 0.22). The pressure effect is more remarkable in the samples taken at T2, and especially in flor yeast G1, whose samples show more separation, which correlates with the higher drop in viability at this last time under PC (Figure 2).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	135/193





**Figure 6.** Biplot of Principal Component Analysis (PCA) based on the significantly different proteins identified in *S. cerevisiae* P29 and G1, related to apoptosis (A) and autolysis (B). Samples are shown in red circles and replicate values in blue dots.

As for the biplot of autolysis proteins, the three PCs account for 85.47 % of the total variance. PC1 explains 40.18%, PC2 29.45% and the last component PC3, 15.84%. PC1 clearly grouped the samples taken at T1 (negative scores) from those at T2 (positive scores). It was mainly influenced by the endonuclease Vma1p (−0.32) and proteasome subunits as Pre8p and Pre9p (both −0.32) at T1, whereas glucanases Exg1p (0.36) and Bgl2p (0.26), as well as the vacuolar protease Pep4p (0.36) at T2. This difference could indicate an important role of proteasome at the middle of the second fermentation and a high requirement of proteins involved in cell wall remodeling during the first month of aging, which also participate in cell wall degradation and peptides release during autolysis. Moreover, this process is known to take place 2–3 months after the end of second fermentation [10,12,58]. PC2 seems to differentiate between P29 samples taken at T1, on the left, from those at T2, on the right, and correlates with proteasome subunits (mainly Pup3p: −0.32 and Pre5p: −0.29) at P29T1, and Rny1p (0.39) and Mca1p (0.37) at P29T2. On the other hand, PC3 appears to establish two sample groups. The first one located on the negative side of PC3, grouping the G1 samples under NPCT1 and PCT2, and the other on the positive side contains the samples G1NPCT2 and G1PCT1. The proteins Pre8p (−0.10), Dug1p (0.55), and the aminopeptidases Ape1p (0.51) and Ape2p (0.50) were those that contributed the most to this component. As it is observed, the pressure effect on

autolysis-related proteome in both strains is more noticeable in samples obtained at the first month of aging, which is the time when autolysis starts. In addition, this effect seems to be more relevant in G1 whose samples showed a higher separation than those from P29.

#### 4. Conclusions

In this work, a proteomic analysis was carried out in order to detect possible cell death biomarkers in yeast through the study of apoptosis and autolysis proteome along the secondary fermentation in two industrial strains. This analysis was carried out in two yeast strains used in post-fermentative processes. All results considered, the presence of apoptosis and autolysis proteins could show evidences that these processes are taking place, and an effect of CO<sub>2</sub> overpressure on the cell death-related proteome is observed. Additionally, over-represented proteins and those correlated with cell viability under pressure conditions such as Cpr3p, Esp1p, Oye2p, and Nma111p, as well as proteins detected non strain-dependent as Bgl2p, Exg1p, and Pep4p, may be proper biomarkers in order to accelerate cell death and improve yeast autolytic capacity during aging in sparkling wine elaboration. In addition, the use of multivariate statistical analysis such as PCA, showed differences in the behavior of apoptosis and autolysis proteome and allowed to group the samples according to the effect of the different factors studied: strain, time and pressure. The differentiation of the samples seems to be due to both pressure and fermentation stage effect.

From the industrial and enological point of view, the use of a flor yeast in sparkling wine production and improvement may be considered. Apart from its ethanol tolerance and flocculation ability, the fast cell death observed along the prise de mousse, its high content in glucanases and vacuolar proteases, as well as the numerous highly-represented proteins under pressure conditions, make this strain an interesting alternative within the sparkling wines field. However, further proteomic and metabolomics studies focused on the organoleptic properties of flor yeasts, genetic approaches, and electronic microscopy observations are required in order to achieve more solid conclusions. The proteomic profiles obtained in this study could be considered at the time of selecting wine yeast strains for sparkling wine production and aim to shed light on the knowledge of yeast behavior when these are in a life and death debate under enological conditions.

**Supplementary Materials:** It can be found at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1).

**Author Contributions:** J.A.P.-A.: Investigation, Methodology, Writing-original draft. J.M.-G.: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing-original draft. J.C.M.: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing- review & editing. J.M.: Supervision, Validation, Visualization. T.G.M.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing-review & editing.

**Funding:** This research was funded by the “XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación 2018” (MOD 4.2. SINERGIAS, Ref XXIII. PP Mod 4.2, JC Mauricio) from University of Cordoba (Spain), the Spain’s Ministry of Science, Innovation and Universities, and the European Fund of Regional Development (FEDER): Grant No. RTA2014-00016-C03-03.

**Acknowledgments:** Kind help of the staff at the Central Research Support Service (SCAI) of the University of Cordoba with the protein analyses is gratefully acknowledged. Special mention to Minami Ogawa for the translation of the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Torresi, S.; Frangipane, M.T.; Anelli, G. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1232–1241.
2. Carmona-Gutierrez, D.; Eisenberg, T.; Büttner, S.; Meisinger, C.; Kroemer, G.; Madeo, F. Apoptosis in yeast: Triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 763.
3. Carmona-Gutierrez, D.; Bauer, M.A.; Zimmermann, A.; Aguilera, A.; Austriaco, N.; Ayscough, K.; Balzan, R.; Bar-Nun, S.; Barrientos, A.; Belenky, P.; et al. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microb. Cell* **2018**, *5*, 4.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	137/193



4. Falcone, C.; Mazzoni, C. External and internal triggers of cell death in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 2237–2250.
5. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541.
6. Fröhlich, K.U.; Madeo, F. Apoptosis in yeast—A monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 6–9.
7. Orozco, H.; Matallana, E.; Aranda, A. Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 1.
8. Duc, C.; Pradal, M.; Sanchez, I.; Noble, J.; Tesnière, C.; Blondin, B. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184838.
9. Babayan, T.L.; Bezrukov, M.G. Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnol.* **1985**, *5*, 129–136.
10. Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127.
11. Leroy, M.J.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Yeast autolysis during champagne aging. *Am. J. Enol. Viticult.* **1990**, *41*, 21–28.
12. Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1081–1085.
13. Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V.; Polo, M.C. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *68*, 155–160.
14. Cebollero, E.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R. Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: A reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 614–616.
15. Gonzalez, R.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *84*, 21–26.
16. Tabera, L.; Muñoz, R.; Gonzalez, R. Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 2351–2358.
17. Alexandre, H. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 269–275.
18. Legras, J.L.; Moreno-García, J.; Zara, S.; Zara, G.; García-Martínez, T.; Mauricio, J.C.; Mannazzu, I.; Coi, A.L.; Bou Zeidan, M.; Dequin, S.; et al. Flor yeast: New perspectives beyond wine aging. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 503.
19. Reynolds, T.B.; Fink, G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **2001**, *291*, 878–881.
20. Zara, S.; Antonio Farris, G.; Budroni, M.; Bakalinsky, A.T. *HSP12* is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast* **2002**, *19*, 269–276.
21. Charpentier, C.; Dos Santos, A.M.; Feuillat, M. Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune". *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *96*, 253–262.
22. Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Millán, M.C.; Mauricio, J.C. A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *172*, 21–29.
23. OIV. 2018. Available online: <https://www.oiv.int/en> (accessed on January 15<sup>th</sup> 2019).
24. Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Mauricio, J.C. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 25–33.
25. Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteom.* **2005**, *4*, 1265–1272.
26. Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C.; Carrascosa, A.V. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 45–51.
27. Odat, O.; Matta, S.; Khalil, H.; Kampranis, S.C.; Pfau, R.; Tschlis, P.N.; Makris, A.M. Old yellow enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress and programmed cell death in yeast. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36010–36023.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	138/193



28. Alexandre, H.; Ansanay-Galeote, V.; Dequin, S.; Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **2001**, *498*, 98–103.
29. Matouschek, A.; Rospert, S.; Schmid, K.; Glick, B.S.; Schatz, G. Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6319–6323.
30. Liang, Q.; Zhou, B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 4741–4749.
31. Nakagawa, T.; Shimizu, S.; Watanabe, T.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Yamagata, H.; Inohara, H.; Kubo, T.; Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **2005**, *434*, 652.
32. Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Büttner, S.; Tavernarakis, N.; Madeo, F. Necrosis in yeast. *Apoptosis* **2010**, *15*, 257–268.
33. Yang, H.; Ren, Q.; Zhang, Z. Cleavage of Mcd1 by caspase-like protease Esp1 promotes apoptosis in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 2127–2134.
34. Walter, D.; Wissing, S.; Madeo, F.; Fahrenkrog, B. The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 1843–1851.
35. Penacho, V.; Valero, E.; Gonzalez, R. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 176–182.
36. Almeida, B.; Buttner, S.; Ohlmeier, S.; Silva, A.; Mesquita, A.; Sampaio-Marques, B.; Osório, N.S.; Kollau, A.; Mayer, B.; Leão, C.; et al. NO-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3279–3288.
37. Silva, A.; Almeida, B.; Sampaio-Marques, B.; Reis, M.I.R.; Ohlmeier, S.; Rodrigues, F.; Do Vale, A.; Ludovico, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) is a specific substrate of yeast metacaspase. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 2044–2049.
38. McAlister, L.; Holland, M.J. Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15019–15027.
39. Thompson, D.M.; Parker, R. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 43–50.
40. Trindade, D.; Pereira, C.; Chaves, S.R.; Manon, S.; Côrte-Real, M.; Sousa, M.J. VDAC regulates AAC-mediated apoptosis and cytochrome c release in yeast. *Microb. Cell* **2016**, *3*, 500.
41. Kitagaki, H.; Araki, Y.; Funato, K.; Shimoi, H. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2935–2942.
42. Li, F.; Flanary, P.L.; Altieri, D.C.; Dohlman, H.G. Cell division regulation by *BIR1*, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6707–6711.
43. Wissing, S.; Ludovico, P.; Herker, E.; Büttner, S.; Engelhardt, S.M.; Decker, T.; Link, A.; Proksch, A.; Rodrigues, F.; Corte-Real, M.; et al. An *AIF* orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 969–974.
44. Mrsa, V.; Klebl, F.; Tanner, W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo-beta-1, 3-glucanase. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2102–2106.
45. Cappellaro, C.; Mrsa, V.; Tanner, W. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5030–5037.
46. Chantret, I.; Frenoy, J.P.; Moore, S.E. Free-oligosaccharide control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Roles for peptide: N-glycanase (Png1p) and vacuolar mannosidase (Ams1p). *Biochem. J.* **2003**, *373*, 901–908.
47. Trumbly, R.J.; Bradley, G. Isolation and characterization of aminopeptidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1983**, *156*, 36–48.
48. Jensen, R.E.; Yaffe, M.P. Import of proteins into yeast mitochondria: The nuclear *MAS2* gene encodes a component of the processing protease that is homologous to the *MAS1*-encoded subunit. *EMBO J.* **1988**, *7*, 3863–3871.
49. Kambouris, N.G.; Burke, D.J.; Creutz, C.E. Cloning and characterization of a cysteine proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21570–21576.
50. Fischer, M.; Hilt, W.; Richter-Ruoff, B.; Gonen, H.; Ciechanover, A.; Wolf, D.H. The 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 69–75.
51. Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Ann. Rev. Genet.* **1996**, *30*, 405–439.
52. Ganguli, D.; Kumar, C.; Bachhawat, A.K. The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2007**, *175*, 1137–1151.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	139/193



53. Hecht, K.A.; O'Donnell, A.F.; Brodsky, J.L. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell. Logist.* **2014**, *4*, e28023.
54. Teichert, U.; Mechler, B.; Müller, H.; Wolf, D.H. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16037–16045.
55. Parzych, K.R.; Ariosa, A.; Mari, M.; Klionsky, D.J. A newly characterized vacuolar serine carboxypeptidase, Atg42/Ybr139w, is required for normal vacuole function and the terminal steps of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 1089–1099.
56. Klionsky, D.J.; Cueva, R.; Yaver, D.S. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 287–299.
57. Suzuki, K.; Kondo, C.; Morimoto, M.; Ohsumi, Y. Selective Transport of  $\alpha$ -Mannosidase by Autophagic Pathways. Identification of a novel receptor, Atg34p. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 30019–30025.
58. Alexandre, H.; Heintz, D.; Chassagne, D.; Guilloux-Benatier, M.; Charpentier, C.; Feuillat, M. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2001**, *26*, 235–240.
59. Pereira, C.; Chaves, S.; Alves, S.; Salin, B.; Camougrand, N.; Manon, S.; Sousa, M.J.; Côte-Real, M. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: The role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. *Mol. Microbiol.* **2010**, *76*, 1398–1410.
60. Carmona-Gutiérrez, D.; Bauer, M.A.; Ring, J.; Knauer, H.; Eisenberg, T.; Büttner, S.; Ruckstuhl, C.; Reisenbichler, A.; Magnes, C.; Rechberger, G.N.; et al. The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. *Cell Death Dis.* **2010**, *19*, e161.
61. Van den Hazel, H.B.; Kielland-Brandt, M.C.; Winther, J.R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **1996**, *12*, 1–16.
62. Charpentier, C.; Freyssinet, M. The mechanism of autolysis in wine. *Yeast* **1989**, *5*, S181–S186.
63. Zhao, J.; Fleet, G.H. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2005**, *32*, 415–423.
64. Hirata, R.; Ohsumi, Y.; Nakano, A.; Kawasaki, H.; Suzuki, K.; Anraku, Y. Molecular structure of a gene, *VMA1*, encoding the catalytic subunit of H (+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6726–6733.
65. Qiu, J.; Yoon, J.H.; Shen, B. Search for apoptotic nucleases in yeast role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15370–15379.
66. Bae, S.H.; Choi, E.; Lee, K.H.; Park, J.S.; Lee, S.H.; Seo, Y.S. Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* possesses a single-stranded DNA-specific endonuclease activity that is able to act on double-stranded DNA in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26880–26890.
67. Garofalo, C.; Berbegal, C.; Grieco, F.; Tufariello, M.; Spano, G.; Capozzi, V. Selection of indigenous yeast strains for the production of sparkling wines from native Apulian grape varieties. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *20*, 7–17.
68. Perpetuini, G.; Di Gianvito, P.; Arfelli, G.; Schirone, M.; Corsetti, A.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Biodiversity of autolytic ability in flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains suitable for traditional sparkling wine fermentation. *Yeast* **2016**, *33*, 303–312.
69. Tofalo, R.; Perpetuini, G.; Di Gianvito, P.; Arfelli, G.; Schirone, M.; Corsetti, A.; Suzzi, G. Characterization of specialized flocculent yeasts to improve sparkling wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, 1574–1584.
70. Martínez-García, R.; Roldán, Y.; Moreno, J.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; García-Martínez, T. Use of a flor yeast strain for the second fermentation of sparkling wines: Effect of endogenous CO<sub>2</sub> over-pressure on the volatilome. *Food Chem.* **2020**, in press.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	140/193



#### 4.2.3 Aceleración de la autólisis de levaduras durante la segunda fermentación en botella.

Las glucanasas son enzimas asociadas al proceso de autólisis en levaduras. Con el fin de estudiar la capacidad *killer* que podrían tener las glucanasas y así poder acelerar la autólisis en la elaboración de vinos espumosos, se realizó el siguiente experimento.

La cepa de levadura *Tetrapisispora phaffii* produce una toxina *killer* conocida como Kpkt que posee una extensa actividad anti-*Hanseniaspora/ Kloeckera* bajo condiciones de elaboración de vino. La caracterización bioquímica de la toxina revela una homología del 93% con la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *S. cerevisiae*, Bgl2p. Como consecuencia, la actividad  $\beta$ -glucanasa está relacionada con la actividad *killer* ya que induce modificaciones en la pared celular de cepas sensibles. Debido a que la toxina está activa en un intervalo de pH de 3-5 y a temperaturas menores de 40 °C, sería adecuado su uso bajo condiciones enológicas (Ciani y Fatichenti, 2001; Oro et al., 2014).

La glucanasa Bgl2p, importante para el mantenimiento e incorporación de manoproteínas a la pared celular (Mrsa et al., 1993), fue identificada como uno de los contenidos proteicos más elevados en las muestras con presión, y también en los controles, con respecto al total de proteínas relacionadas con la autólisis un mes después de finalizada la segunda fermentación, período donde tiene lugar este proceso. Además, debido a su papel en la muerte celular durante el envejecimiento (Kalebina et al., 2006) y su función glucosidasa sería una diana interesante para optimizar y acelerar el proceso de autólisis durante el período de envejecimiento de los vinos espumosos. Otra proteína interesante fue la endonucleasa Lcl3p, seleccionada por haber sido identificada sólo en las muestras de levaduras bajo condiciones de presión durante el análisis proteómico.

Todas las cepas de levadura empleadas en este estudio pertenecen a la especie *S. cerevisiae* (Tabla 2, sección Materiales y Métodos): dos cepas mutantes,  $\Sigma\Delta YGR282c$  y  $\Sigma\Delta YGL085w$ , de los genes involucrados en la autólisis, *BGL2* y *LCL3*, respectivamente; la cepa  $\Sigma 1278b$  como control; y dos cepas industriales comúnmente usadas en la elaboración de vino espumoso (P29 y AWRI-1631).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	141/193



El principal objetivo de este experimento es acelerar el proceso de autólisis mediante el uso de la actividad *killer* de la toxina Kpkt, y el estudio de mutaciones en los genes *BGL2* y *LCL3*, a través de los siguientes objetivos específicos:

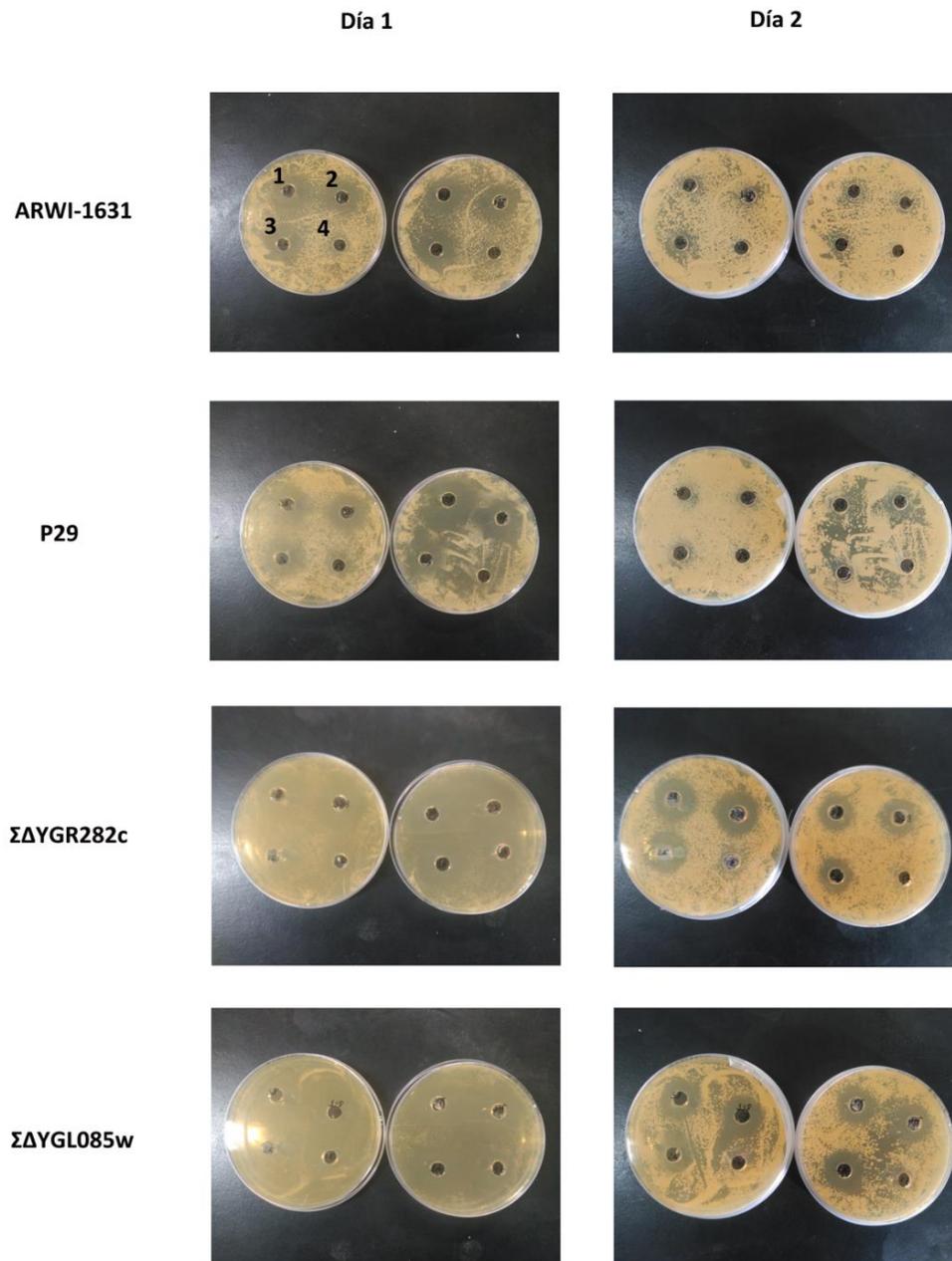
a) *Estudiar el efecto killer de la toxina en distintas cepas de levadura.*

Los ensayos killer en medio sólido (YPD y extracto de malta) se llevaron a cabo para comparar el efecto de la toxina nativa extraída de *T. phaffii* y la toxina recombinante procedente de un mutante de *Pichia pastoris*.

En cuanto a los resultados, todas las cepas de levadura estudiadas mostraron sensibilidad a la toxina recombinante, permaneciendo hasta el día 2 en el caso de las cepas mutantes  $\Sigma\Delta YGR282c$  y  $\Sigma\Delta YGL085w$  (Figura 16). Para examinar la eficiencia de las proteínas recombinante y nativa se realizó un ensayo usando ambas proteínas (purificada y sin purificar). Los resultados mostraron que las cepas fueron sensibles a la proteína recombinante, pero no a la nativa (Figura 17). Tras numerosos intentos para conocer la razón de este resultado, no se pudo determinar el efecto de la toxina nativa, probablemente, debido a problemas relacionados con la producción de la propia toxina por la cepa de *T. phaffii*.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	142/193

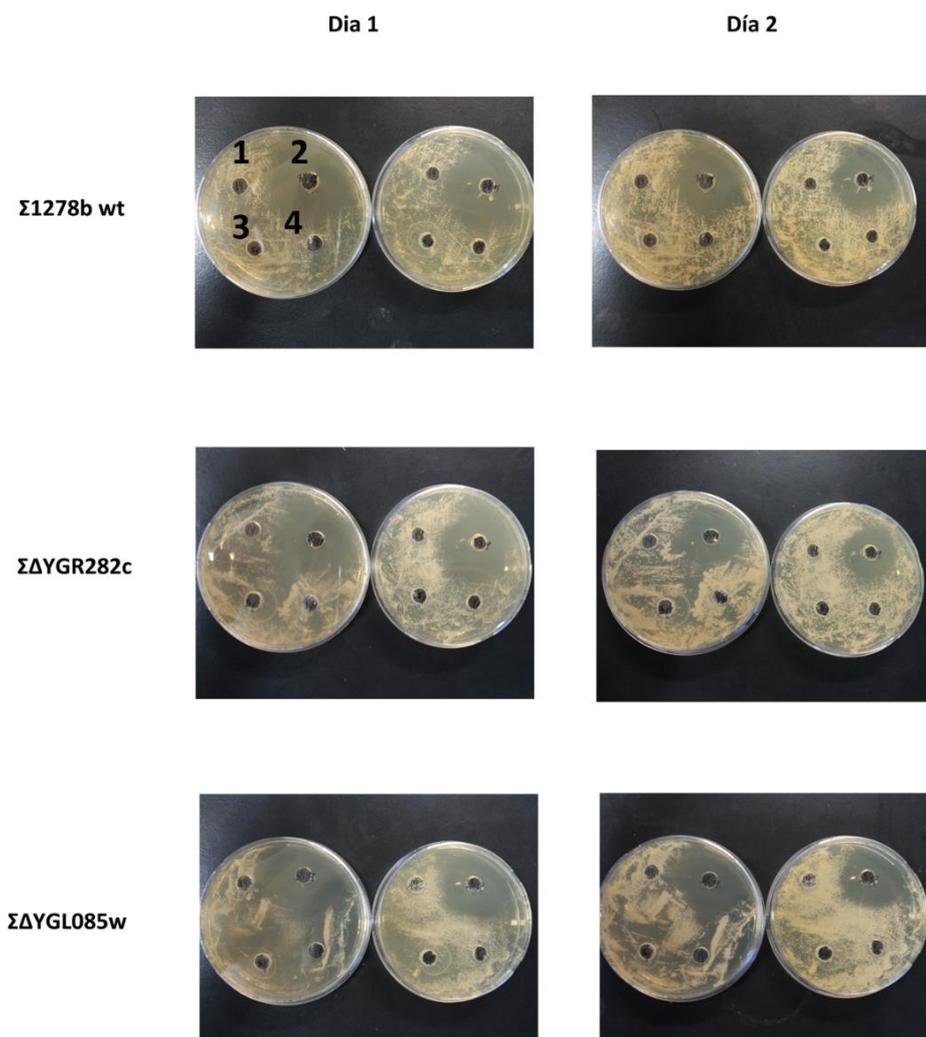




**Figura 16.** Resultados de los ensayos *killer* llevados a cabo para la toxina recombinante procedente de *P. pastoris*. 1 y 2 (toxina clon 38), 3 (toxina clon 26, control positivo), 4 (toxina clon 17, control negativo).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	143/193





**Figura 17.** Resultados de los ensayos *killer* para determinar la eficiencia de la toxina recombinante y la nativa procedente de *T. phaffii*. 1 (toxina clon 24, control negativo), 2 (toxina recombinante clon 38, control positivo), 3 y 4 (toxina nativa no precipitada y precipitada, respectivamente).

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	144/193



b) *Medición de la eficiencia autolítica de dos genes (BGL2 y LCL3) en medio vínico.*

Las fermentaciones en botella para el estudio de la eficiencia de la autólisis en vino se desarrollaron usando un vino sintético (Tabla 2, sección Materiales y Métodos) inoculado con  $5 \times 10^5$  células/mL de cada cepa e incubado a 20 °C durante 28 días.

Los resultados de viabilidad obtenidos del estudio de la eficiencia de la autólisis en vino después de 28 días de fermentación indicaron que las muestras en botella cerrada (condición de presión) presentaron un menor número de células viables que aquellas en botella abierta (Tabla 5). Estos resultados podrían indicar que las mutaciones en los dos genes *BGL2* y *LCL3* potencian el efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub>, provocando una muerte celular acelerada, ya que en el caso de las cepas mutantes no presentaron células vivas en condiciones de presión.

**Tabla 5.** Resultados de viabilidad en vino obtenidos en cada condición de estudio (con presión y sin presión) y en cada cepa. Los datos representan los valores medios  $\pm$  desviación estándar. N.d. No detectado.

Cepa	Viabilidad con presión (células/mL)	Viabilidad sin presión (células/mL)
$\Sigma 1278b$	$3.32 \pm 0.11 \times 10^3$	$13.6 \pm 0.06 \times 10^3$
$\Sigma \Delta YGR282c$	N.d	$5 \pm 1,10 \times 10^3$
$\Sigma \Delta YGL085w$	N.d	$4.24 \pm 0.81 \times 10^3$

Debido a los problemas mencionados anteriormente con respecto a la producción de la proteína nativa, no fue posible determinar la actividad *killer* de la toxina bajo condiciones de producción de vino.

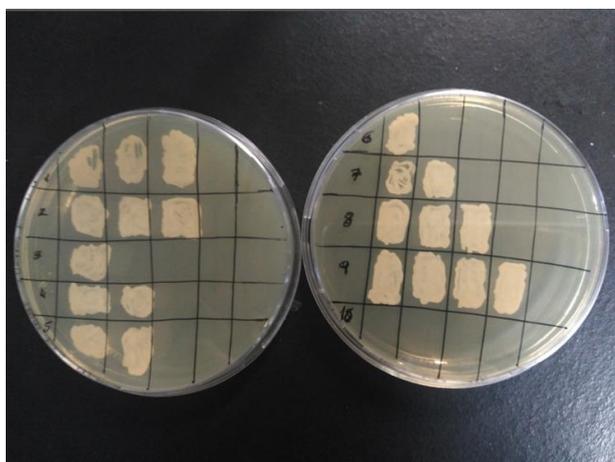
*-Caracterización de la cepa S. cerevisiae P29 mediante el análisis de sus esporas y tétradas.*

Además del estudio de la autólisis también se llevó a cabo un análisis de las esporas y tétradas de la cepa *S. cerevisiae* P29, para futuras investigaciones desde el punto de vista de la mejora genética. Para ello esta cepa se incubó previamente en medio mínimo con acetato de potasio para inducir la esporulación y las esporas de cada tétrada se diseccionaron usando un micromanipulador.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	145/193



En cuanto a los resultados, se obtuvieron valores elevados tanto de eficiencia (55%) como de viabilidad de las esporas (58%). Además, la formación de tétradas en la mayoría de las esporas viables sugiere que el ciclo de vida más probable para esta cepa sería el homotálico, que es el más frecuente en las levaduras vínicas (Figura 18).



**Figura 18.** Resultados de viabilidad de las esporas de la cepa *S. cerevisiae* P29 crecidas en medio de esporulación.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	146/193



#### 4.3 Estudio de la importancia de orgánulos celulares como la mitocondria en la segunda fermentación en botella.

Durante la etapa de toma de espuma o “prise de mousse” en la elaboración de vinos espumosos, las levaduras se someten a una segunda fermentación en botella y posteriormente a un período de envejecimiento, que suele durar unos 9 meses en el caso del cava español. Diversos estudios han analizado los cambios que sufren las levaduras a lo largo de esta etapa, así como su importancia en la mejora de las propiedades organolépticas de estos vinos. La resistencia a los estreses propios de una segunda fermentación y la mejora de la calidad del vino se considera un criterio de selección de levaduras para asegurar el éxito de la etapa “prise de mousse”. Ante estas condiciones tan extremas, la mitocondria podría resultar esencial para la supervivencia celular. Este orgánulo se requiere para los procesos de respiración, metabolismo de energía, formación de ROS, y metabolismo de lípidos y aminoácidos. La expresión de genes mitocondriales relacionados con el metabolismo oxidativo y respiración aeróbica se ha descrito en estudios transcriptómicos durante la segunda fermentación de los vinos espumosos. Además, este orgánulo también se ha relacionado con la respuesta a estrés por etanol. Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar el papel de la mitocondria a nivel proteómico bajo condiciones típicas de sobrepresión de CO<sub>2</sub> durante la etapa “prise de mousse”.

Para ello se usó a la cepa *S. cerevisiae* P29, característica de la producción de vino espumoso. Antes de proceder con la segunda fermentación, esta cepa se aclimató en un mosto pasteurizado siguiendo el protocolo del INCAVI. El llenado de las botellas con un vino base comercial, azúcar y levaduras, se llevó a cabo una vez se alcanzaron altos niveles de concentración, viabilidad y etanol en el mosto. Para comprobar el efecto de la presión, se dividieron las botellas en dos condiciones: condición de presión o CP, donde las botellas se cerraron con un tapón metálico; y condición sin presión o CNP, usando un tapón perforado. Las botellas se incubaron y las muestras se recogieron por triplicado a diferentes tiempos a lo largo de la segunda fermentación (mitad o T1, y un mes después de finalizada o T2), teniendo en cuenta los valores de presión interna (3 bares en T1 y 6.5 bares en T2). Para las botellas control, se tuvieron en cuenta valores similares de etanol y azúcares en ambas condiciones. Tras el muestreo, se realizó la extracción proteica y estas proteínas se separaron según su punto isoeléctrico en el fraccionador *OFFGEL*.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	147/193



Posteriormente, se realizó la identificación mediante espectrometría de masas, la cuantificación usando el contenido proteico, y la selección de aquellas proteínas asociadas a la mitocondria a través de bases de datos de levadura.

En el Apéndice 4 se muestran los resultados correspondientes a este estudio, que se ha enviado a la revista *International Journal of Food Microbiology* para su publicación.

Según los resultados obtenidos, aquellas proteínas requeridas para la respiración y la síntesis de aminoácidos ramificados relacionados con la formación de compuestos aromáticos fueron más relevantes en contenido bajo condiciones de presión. Por otro lado, principalmente enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*TCA*) y otras requeridas para el transporte y traducción se encontraron con mayor número y contenidos más altos en las botellas sin presión. El análisis de componentes principales, realizado para las proteínas mitocondriales asociadas a procesos metabólicos (*TCA*, respiración y metabolismo de aminoácidos), permitió distinguir y agrupar las muestras según los efectos de la presión y el tiempo de muestreo. El análisis de correlación entre el contenido en etanol y las proteínas asociadas a la cadena respiratoria bajo ambas condiciones reveló que este compuesto podría tener un mayor efecto que la presión.

**Apéndice 4.** “Mitochondrial proteome changes under second fermentation of sparkling wine production”.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	148/193



#### 4.4 Comparación de las proteínas de estrés de levaduras bajo presión de CO<sub>2</sub> con proteínas de estrés sin presión.

La elaboración de vino espumoso por el método tradicional abarca dos etapas fermentativas: una primera para transformar el mosto en vino base, y una segunda fermentación en botella seguida de un largo período de envejecimiento (toma de espuma o “prise de mousse”). En esta última etapa las levaduras están sometidas a numerosos estreses que provocan cambios en su metabolismo y fisiología celular. El estrés osmótico, oxidativo, nutricional o por etanol son algunos de los más comunes que tienen lugar bajo condiciones fermentativas. Sin embargo, hay otros factores que son típicos de la segunda fermentación como la baja temperatura y la sobrepresión de CO<sub>2</sub>. Aunque existen estudios transcriptómicos y metabolómicos durante la segunda fermentación, el efecto de esta sobrepresión de CO<sub>2</sub> no ha sido caracterizado en detalle. Por tanto, este trabajo se centra en estudiar los cambios que tienen lugar en las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y el efecto de la presión por CO<sub>2</sub> durante la segunda fermentación en una cepa vínica comúnmente usada en la producción de vino espumoso, *S. cerevisiae* P29.

El crecimiento y aclimatación previos de esta cepa se realizó según el protocolo del INCAVI. La cepa se puso a crecer en YPD durante 48 h y la posterior aclimatación se llevó a cabo en un mosto pasteurizado durante 5 días a 21 °C. El tiraje o llenado de las botellas se realizó cuando en el mosto se alcanzaron valores altos de concentración celular ( $1.4 \times 10^8$  células/mL), viabilidad (97 %) y etanol (10.39 % v/v). Se llenaron un total de 12 botellas con un vino base comercial, sacarosa (22 g/L) y levaduras ( $1.5 \times 10^6$  células/mL). La mitad de las botellas se cerraron usando un tapón de plástico y un obturador metálico, representando la condición con presión o CP, mientras que el resto de las botellas se cerraron con un tapón perforado representando la condición control sin presión o CNP. Posteriormente, todas las botellas se incubaron a 14 °C. El muestreo se realizó a partir de tres botellas al azar y en dos tiempos a lo largo de la segunda fermentación (mitad de fermentación o T1 y un mes después o T2). Para las botellas con presión se tuvo en cuenta el valor de presión interna medida con un afrómetro: 3 bares de presión a mitad de la segunda fermentación y 6.5 bares un mes después. Por otro lado, para el muestreo en las botellas control se procedió según el contenido similar en etanol y azúcares residuales obtenido bajo ambas condiciones. Adicionalmente, la viabilidad se

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	149/193



obtuvo realizando las correspondientes diluciones seriadas decimales en solución Ringer y su posterior siembra y conteo en cajas de Petri con medio YPD tras 48 h. Tras el muestreo, las células de levadura se centrifugaron y lisaron previamente a la obtención de la fracción proteica. Estas proteínas a su vez se separaron mediante su punto isoeléctrico en un fraccionador *OFFGEL*. Tras su separación, las proteínas se digirieron en péptidos usando tripsina y la identificación se realizó a través de espectrometría de masas acoplada a *HPLC*. Una vez identificadas las proteínas, se cuantificaron y se seleccionaron aquellas relacionadas con la respuesta a estrés mediante el uso de bases de datos como *SGD* y *Uniprot*. Además, se cuantificó el contenido de ciertos metabolitos presentes en el vino espumoso como el etanol, glicerol y ácido acético, los azúcares residuales y el pH.

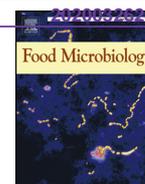
Los resultados de este trabajo se muestran en el Apéndice 5, correspondiente al artículo Porras-Agüera et al. (2020) publicado en la revista *Food Microbiology*.

En cuanto a los resultados, se observó que el contenido y el número de proteínas de estrés disminuían bajo condiciones de presión, y más aún un mes después de finalizada la segunda fermentación. Entre las proteínas de estrés más relevantes, destacaron aquellas relacionadas con la síntesis de glicerol (Gpd1p, Gpp1p y Gpp2p), que aumentaron su contenido a mitad de fermentación bajo presión. Proteínas asociadas a estrés oxidativo como la oxidoreductasa Glr1p, también se detectaron en las levaduras en botella cerrada, aunque presentaron un mayor contenido y abundancia en la condición control. Se identificaron proteínas relacionadas con la respuesta a metabolitos tóxicos como el etanol o acetaldehído, entre ellas Tps1p implicada en la síntesis de trehalosa. Además de estos estreses, también se detectaron proteínas relacionadas con la respuesta a la falta de nutrientes y a baja temperatura. El uso de análisis multivariados permitió diferenciar las muestras y proporcionó interesantes biomarcadores de estrés.

**Apéndice 5.** Porras-Agüera, J.A.; Román-Camacho, J.J.; Moreno-García, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. 2020. Effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on the yeast “stressome” during the “prise de mousse” of sparkling wine. Food Microbiol. 89:103431. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103431>

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	150/193





## Effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on the yeast “stressome” during the “prise de mousse” of sparkling wine

Juan A. Porrás-Agüera<sup>a</sup>, Juan J. Román-Camacho<sup>a</sup>, Jaime Moreno-García<sup>a</sup>, Juan C. Mauricio<sup>a,\*</sup>,  
Juan Moreno<sup>b</sup>, Teresa García-Martínez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Severo Ochoa (C6) Building, Agrifood Campus of International Excellence CeiA3, University of Córdoba, Ctra. N-IV-A Mm 396, 14014, Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural Chemistry, Marie Curie (C3) Building, Agrifood Campus of International Excellence CeiA3, University of Córdoba, Ctra. N-IV-A Mm 396, 14014, Córdoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sparkling wine  
Prise de mousse  
CO<sub>2</sub> overpressure  
Yeast  
Stress proteome

### ABSTRACT

Sparkling wines elaboration by the “Champenoise” method involves a second fermentation of a base wine in hermetically sealed bottles and a subsequent aging period. The whole process is known as “prise de mousse”. The endogenous CO<sub>2</sub> pressure produced during the second fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* could modify the sub-proteome involved in the response to different stresses, or “stressome”, and cell viability thus affecting the wine organoleptic properties. This study focuses on the stressome evolution along the prise de mousse under CO<sub>2</sub> overpressure conditions in an industrial *S. cerevisiae* strain. The results reveal an important effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on the stress sub-proteome, cell viability and metabolites such as glycerol, reducing sugars and ethanol. Whereas the content of glycerol biosynthesis-related proteins increased in sealed bottle, those involved in the response to toxic metabolites like ROS, ethanol, acetaldehyde and acetic acid, decreased in content. Proteomic profile obtained in this study may be used to select suitable wine yeast strains for sparkling wine elaboration and improve their stress tolerance.

### 1. Introduction

Sparkling wines contain endogenous carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) in solution, obtained exclusively through a fermentative process (Buxaderas and López-Tamames, 2012). The organoleptic properties of sparkling wine are conferred by the climate, soil factors of the region, native varieties of grapes, yeast strains used for its elaboration, etc. (Buxaderas and López-Tamames, 2012; Ruiz-Moreno et al., 2017; Vigentini et al., 2017). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is employed for sparkling wine elaboration due to its high fermentative ability and adaptability to a changing fermentative medium (Matallana and Aranda, 2017).

Sparkling wine elaboration by the “Champenoise method” involves two main stages. First, a “base wine” is produced through a primary alcoholic fermentation of the grape must, initiated by *S. cerevisiae* starter cultures (Buxaderas and López-Tamames, 2012; Matallana and Aranda, 2017). Secondly, once the base wine is obtained, it is bottled during a process known as “tirage”, involving an addition of sugars and yeast cells. This is used to carry out the secondary fermentation, where CO<sub>2</sub> is produced by yeast cells and accumulated inside the bottle, giving

these wines the typical foam and effervescence (Buxaderas and López-Tamames, 2012; Moreno-García et al., 2015b). Second fermentation is followed by a prolonged aging period where wine remains in contact with yeast lees (Buxaderas and López-Tamames, 2003, 2012; Esteruelas et al., 2014; Torresi et al., 2011). During this aging, autolysis of the yeast cells takes place (Comuzzo et al., 2015; Martí-Raga et al., 2016; Torresi et al., 2011) modifying the organoleptic characteristics of sparkling wines (Esteruelas et al., 2014; Mans et al., 2018). The process that involves the second fermentation and the subsequent aging period is called “prise de mousse” (Buxaderas and López-Tamames, 2012; Martínez-García et al., 2017).

The capacity of the yeast strain to overcome the stress in sparkling wines has been proposed as a selection method to guarantee the success of the prise de mousse process (Mans et al., 2018; Martí-Raga et al., 2016). Stresses like high sugar, ethanol, reactive oxygen species (ROS) content, nutrients starvation or low temperature are commonly reported in yeasts under fermentation conditions (Borrull et al., 2016; Ivorra et al., 1999; Martínez-García et al., 2017; Penacho et al., 2012; Salvadó et al., 2008). It is widely known that proteins play an essential

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [b02poagj@uco.es](mailto:b02poagj@uco.es) (J.A. Porrás-Agüera), [b32rocaj@uco.es](mailto:b32rocaj@uco.es) (J.J. Román-Camacho), [b62mogaj@uco.es](mailto:b62mogaj@uco.es) (J. Moreno-García), [mi1gamaj@uco.es](mailto:mi1gamaj@uco.es) (J.C. Mauricio), [qe1movij@uco.es](mailto:qe1movij@uco.es) (J. Moreno), [mi2gamam@uco.es](mailto:mi2gamam@uco.es) (T. García-Martínez).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103431>

Received 7 May 2019; Received in revised form 8 January 2020; Accepted 13 January 2020

Available online 18 January 2020

0740-0020/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	151/193



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas del Objetivo 1, en relación con el estudio de las proteínas relacionadas con la pared celular y floculación durante la segunda fermentación en botella, se extraen del artículo:

“A Differential Proteomic Approach to Characterize the Cell Wall Adaptive Response to CO<sub>2</sub> Overpressure During Sparkling Wine Making”. Enviado para su publicación en *LWT-Food Science and Technology*.

- La respuesta proteómica de la cepa *S. cerevisiae* P29 a la sobrepresión por CO<sub>2</sub> endógeno produce un incremento en proteínas requeridas para el ensamblaje de glucanos y metabolismo de lípidos.
- La cepa *S. cerevisiae* G1 es una buena alternativa para su uso en la elaboración de vinos espumosos, debido a que muestra un mayor contenido en glucanasas, manoproteínas y proteínas de pared celular relacionadas principalmente con el procesamiento de glucanos bajo condiciones de presión.

Las conclusiones obtenidas del Objetivo 2, sobre el estudio del proteoma relacionado con los procesos de autofagia, apoptosis y autólisis durante la segunda fermentación en la elaboración de vino espumoso, están recogidas en los siguientes artículos:

“Autophagic Proteome in Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains During Second Fermentation for Sparkling Wine Elaboration”. Publicado en la revista *Microorganisms*. 8, 523. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040523>.

- La sobrepresión por CO<sub>2</sub> y la duración del proceso tienen un efecto negativo en el contenido y número de proteínas relacionadas con la autofagia principalmente en *S. cerevisiae* G1.
- Bajo condiciones de presión, las proteínas requeridas para la regulación de la autofagia y formación del autofagosoma destacaron en *S. cerevisiae* G1.
- Bajo condiciones de presión, las proteínas responsables de los procesos de expansión y nucleación vesicular fueron más abundantes en *S. cerevisiae* P29.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	152/193



“First Proteomic Approach to Identify Cell Death Biomarkers in Wine Yeasts During Sparkling Wine Production”. Publicado en la revista *Microorganisms*. 7, 542. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110542>.

- La sobrepresión por CO<sub>2</sub> afecta negativamente a la viabilidad celular en ambas cepas, sobre todo en *S. cerevisiae* G1.
- La presión y el tiempo de duración del proceso afectan al proteoma asociado a los procesos de apoptosis y autólisis.

Por otro lado, las conclusiones obtenidas del Objetivo 2.3, referente al estudio para la aceleración de la autólisis durante la segunda fermentación en botella son las siguientes:

- La sensibilidad mostrada por las cepas estudiadas a la glucanasa Bgl2 sugiere un posible uso en la industria con el objetivo de acelerar la autólisis.
- Las mutaciones en genes asociados a enzimas hidrolíticas que participan en la autólisis, como *BGL2* y *LCL3*, afectan negativamente a la viabilidad celular bajo condiciones de segunda fermentación.
- La cepa *S. cerevisiae* P29 muestra valores elevados de eficiencia y viabilidad de esporas, que indica que su ciclo de vida es homotático.

Las conclusiones del Objetivo 3, en relación con el estudio del proteoma mitocondrial durante la segunda fermentación en botella, se obtienen del siguiente artículo:

“Mitochondrial proteome changes under second fermentation of sparkling wine production”. Enviado a la revista *International Journal of Food Microbiology*.

- La sobrepresión por CO<sub>2</sub> y el tiempo de duración del proceso influyen en el proteoma mitocondrial, disminuyendo el contenido de proteínas asociadas al ciclo de los ácidos tricarbónicos, y aumentando el de aquellas requeridas para la

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	153/193



cadena respiratoria y al metabolismo de aminoácidos relacionados con la formación de compuestos aromáticos.

Las conclusiones obtenidas del Objetivo 4, sobre el efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en las proteínas de estrés en levadura durante la segunda fermentación, se deducen del artículo:

“Effect of Endogenous CO<sub>2</sub> Overpressure on the Yeast “Stressome” During the “Prise de Mousse” of Sparkling Wine”. Publicado en la revista Food Microbiology. 89, 103431. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103431>.

- La sobrepresión por CO<sub>2</sub> provoca un aumento del contenido de proteínas asociadas principalmente a mecanismos para contrarrestar el estrés como la síntesis de glicerol, respuesta a metabolitos tóxicos, eliminación de ROS y acumulación de energía.

### Conclusiones generales y perspectivas futuras

Como conclusión general se ha demostrado que la sobrepresión por CO<sub>2</sub> endógeno presenta un efecto mayor en el proteoma de la levadura de flor G1, como consecuencia de su menor adaptación a estas condiciones. Además, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral abren nuevas vías de investigación centradas en la mejora de los vinos espumosos y el uso de otras cepas que proporcionen nuevas características, como es el caso de las levaduras de flor. Con este trabajo de investigación, se ha pretendido obtener nueva información relevante acerca del comportamiento del proteoma de las levaduras industriales bajo unas condiciones tan especiales como aquéllas llevadas a cabo durante la elaboración de vino espumoso. Los perfiles proteómicos obtenidos permiten detectar posibles biomarcadores o dianas que pueden conducir al diseño de estrategias para mejorar el proceso industrial mediante la manipulación genética de las levaduras de segunda fermentación, y también pueden servir de ayuda para seleccionar las cepas más adecuadas para el proceso.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	154/193



## CONCLUSIONS

The conclusions obtained from the Objective 1, in relation to the study of proteins associated with cell wall and flocculation during the second fermentation in bottle, are extracted from the following article:

“A Differential Proteomic Approach to Characterize the Cell Wall Adaptive Response to CO<sub>2</sub> Overpressure During Sparkling Wine Making”. Submitted for publication in *LWT-Food Science and Technology*.

- The proteomic response of *S. cerevisiae* P29 strain to endogenous CO<sub>2</sub> overpressure leads to an increase in proteins required for glucan assembly and lipid metabolism.
- Due to a high content in glucanases, mannoproteins and cell wall proteins mainly related to glucan processing under pressure conditions, *S. cerevisiae* G1 is a good alternative for sparkling wine elaboration.

The conclusions obtained from the Objective 2, about the study of the proteome related to autophagy, apoptosis and autolysis processes during the second fermentation of sparkling wine elaboration, are collected from the following articles:

“Autophagic Proteome in Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains During Second Fermentation for Sparkling Wine Elaboration”. Published in *Microorganisms*. 8, 523. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040523>.

- CO<sub>2</sub> overpressure and the duration of the process have a negative effect on the content and number of proteins related to autophagy, mainly in *S. cerevisiae* G1.
- Under pressure conditions, proteins for autophagy regulation and autophagosome formation stood out in *S. cerevisiae* G1.
- Under pressure conditions, proteins responsible for vesicular expansion and nucleation were more abundant in *S. cerevisiae* P29.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	155/193



“First Proteomic Approach to Identify Cell Death Biomarkers in Wine Yeasts During Sparkling Wine Production”. Published in *Microorganisms*. 7, 542. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110542>.

- CO<sub>2</sub> overpressure negatively affect the cell viability in both yeast strains, especially in *S. cerevisiae* G1.
- Pressure and duration of the process affect the proteome associated with apoptosis and autolysis processes.

On the other hand, the conclusions obtained from the Objective 2.3, regarding the study for the acceleration of autolysis during the second fermentation in bottle were as follows:

- The sensitivity shown by the yeast strains studied to the glucanase Bgl2 suggests its possible use for accelerating the autolysis process.
- The mutations in genes associated with hydrolytic enzymes which participate in autolysis, such as *BGL2* and *LCL3*, negatively affect the cell viability under second fermentation conditions.
- *S. cerevisiae* P29 shows high values of spore efficiency and viability, which indicates a homothallic life cycle.

The conclusions of the Objective 3, in relation to the study of the mitochondrial proteome during the second fermentation in bottle, are obtained from the following article:

“Mitochondrial proteome changes under second fermentation of sparkling wine production”. Submitted for publication in *International Journal of Food Microbiology*.

- CO<sub>2</sub> overpressure and the duration of the process influence the mitochondrial proteome, decreasing the content of proteins associated with tricarboxylic acid

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	156/193



cycle, and increasing that of those required for respiratory chain and amino acid metabolism related to aromatic compounds formation.

The conclusions obtained from the Objective 4, about the effect of CO<sub>2</sub> overpressure on stress-related proteins in yeast during the second fermentation, are deduced from the article:

“Effect of Endogenous CO<sub>2</sub> Overpressure on the Yeast “Stressome” During the “Prise de Mousse” of Sparkling Wine”. Published in Food Microbiology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103431>.

- CO<sub>2</sub> overpressure leads to an increase in the content of proteins mainly associated with mechanisms to counteract the stress such as glycerol synthesis, toxic metabolites response, ROS removing and energy accumulation.

### General conclusions and future perspectives

As a general conclusion it has been demonstrated that endogenous CO<sub>2</sub> overpressure shows a higher effect in flor yeast proteome, as a consequence of its lesser adaptation to these conditions. In addition, the results obtained in this Doctoral Thesis open new research opportunities focused on sparkling wine improvement and the use of other yeast strains which provide new features as flor yeasts. With this research work, it has been tried to throw out relevant information about the proteome behavior of industrial yeasts under conditions as special as those carried out during sparkling wine elaboration. Proteomic profiles obtained allow to detect possible biomarkers or targets which can lead to design of strategies, in order to improve the industrial process through genetic manipulation of second fermentation yeasts and also can help in selecting the most suitable strains for the process.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	157/193



## 6. REFERENCIAS

Abeliovich, H. 2004. Regulation of autophagy by the target of rapamycin (Tor) proteins. *Autophagy*. 60-69.

Abeliovich, H.; Klionsky, D.J. 2001. Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:463-479.

Abramova, N.; Sertil, O.; Mehta, S.; Lowry, C.V. 2001. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 183:2881-2887.

Aguilera, F.; Peinado, R.A.; Millan, C.; Ortega, J.M.; Mauricio, J.C. 2006. Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 110:34-42.

Ahn, S.H.; Cheung, W.L.; Hsu, J.Y.; Diaz, R.L.; Smith, M.M.; Allis, C.D. 2005. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell.* 120:25-36.

Alberts, A.S.; Bouquin, N.; Johnston, L.H.; Treisman, R. 1998. Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein  $\beta$  subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J. Biol. Chem.* 273:8616-8622.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. Garland Science, New York, NY.

Alexandre, H. 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 167:269-275.

Alexandre, H.; Ansanay-Galeote, V.; Dequin, S.; Blondin, B. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett.* 498:98-103.

Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. 2006. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12:119-127.

Almeida, B.; Buttner, S.; Ohlmeier, S.; Silva, A.; Mesquita, A.; Sampaio-Marques, B.; et al. 2007. NO-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Sci.* 120:3279-3288.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	158/193



Almeida, T.; Marques, M.; Mojzita, D.; Amorim, M.A.; Silva, R.D.; Almeida, B.; et al. 2008. Isc1p plays a key role in hydrogen peroxide resistance and chronological lifespan through modulation of iron levels and apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 19:865-876.

Aouida, M.; Mekid, H.; Belhadj, O.; Mir, L.M.; Tounekti, O. 2007. Mitochondria-independent morphological and biochemical apoptotic alterations promoted by the anti-tumor agent bleomycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Cell Biol.* 85:49-55.

Apweiler, R.; Bairoch, A.; Wu, C.H.; Barker, W.C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; et al. 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 32:D115-D119.

Arellano, M.; Duran, A.; Perez, P. 1996. Rho 1 GTPase activates the (1–3) beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* 15:4584-4591.

Ashe, M.P.; De Long, S.K.; Sachs, A.B. 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 11:833-848.

Auesukaree, C.; Damnernsawad, A.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P.; Boonchird, C.; Kaneko, Y.; et al. 2009. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* 50:301-310.

Bakalinsky, A.T.; Snow, R. 1990. Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallism. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:849-857.

Balzan, R.; Sapienza, K.; Galea, D.R.; Vassallo, N.; Frey, H.; Bannister, W.H. 2004. Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology.* 150:109-115.

Bandara, A.; Fraser, S.; Chambers, P.J.; Stanley, G.A. 2009. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res.* 9:1208-1216.

Barbosa, C.; Falco, V.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. 2009. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J. Biosci. Bioeng.* 108:99-104.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	159/193



Barrientos, A.; Ugalde, C. 2013. I Function, therefore i am: Overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes. *Cell. Metabolism*. 18:147-149.

Bauer, F.F.; Govender, P.; Bester, M.C. 2010. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88:31-39.

Bauer, F.F.; Pretorius I.S. 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:27-51.

Bayly, J.C.; Douglas, L.M.; Pretorius, I.S.; Bauer, F.F.; Dranginis, A.M. 2005. Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5:1151-1156.

Begley, U.; Dyavaiah, M.; Patil, A.; Rooney, J.P.; DiRenzo, D.; Young, C.M.; et al. 2007. Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Mol. Cell.* 28:860-870.

Bell, S.J., Henschke, P.A. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Re.* 11:242-295.

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. *Int. J. Food Microbiol.* 121:169-177.

Beltran, G.; Novo, M.; Leberre, V.; Sokol, S.; Labourdette, D.; Guillamon, J.M.; et al. 2006. Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6:1167-1183.

Beltran, G.; Novo, M.; Rozes, N.; Mas, A.; Guillamón, J.M. 2004. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 4:625-632.

Benito, A.; Calderón, F.; Benito, S. 2019. The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation.* 5:54.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	160/193



Beopoulos, A.; Nicaud, J.M.; Gaillardin, C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1193-1206.

Bester, M.C.; Pretorius, I.S.; Bauer, F.F. 2006. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FLO* gene expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr. Genet.* 49:375-383.

Bidard, F.; Bony, M.; Blondin, B.; Dequin, S.; Barre, P. 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* *FLO1* flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast.* 11:809-822.

Blasco, L.; Viñas, M.; Villa, T.G. 2011. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. *Int. Microbiol.* 14:61-71.

Bleazard, W.; McCaffery, J.M.; King, E.J.; Bale, S.; Mozdy, A.; Tieu, Q.; et al. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1:298-304.

Bonilla, M.; Cunningham, K.W. 2002. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci. STKE.* 2002:pe17-pe17.

Borneman, A.R.; Forgan, A.H.; Pretorius, I.S.; Chambers, P.J. 2008. Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* 8:1185-1195.

Borrull, A.; López-Martínez, G.; Miró-Abella, E.; Salvadó, Z.; Poblet, M.; Cordero-Otero, R.; et al. 2016. New insights into the physiological state of *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol acclimation for producing sparkling wines. *Food Microbiol.* 54:20-29.

Borrull, A.; Poblet, M.; Rozès, N. 2015. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiol.* 48:41-48.

Bouchez, C.; Devin, A. 2019. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS): a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway. *Cells.* 8:287.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	161/193



Bowman, S.M.; Free, S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 28:799-808.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brosnan, M.P.; Donnelly, D.; James, T.C.; Bond, U. 2000. The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J. Appl. Microbiol.* 88:746-755.

Büttner, S.; Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Ruli, D.; Knauer, H.; Ruckstuhl, C.; et al. 2007. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell.* 25:233-246.

Büttner, S.; Eisenberg, T.; Herker, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Kroemer, G.; Madeo, F. 2006. Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *The J. Cell Biol.* 175:521-525.

Cabib, E.; Bowers, B.; Sburlati, A.; Silverman, S.J. 1988. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol. Sci.* 5:370-375.

Cabib, E.; Silverman, S. J.; Shaw, J.A. 1992. Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 138:97-102.

Camarasa, C.; Grivet, J.P.; Dequin, S. 2003. Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology.* 149:2669-2678.

Capone, D.L.; Pardon, K.H.; Cordente, A.G.; Jeffery, D.W. 2011. Identification and quantitation of 3-s-cysteinylglycinehexan-1-ol (cysgly-3-mh) in sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59:11204–11210.

Cardona, F.; Carrasco, P.; Pérez-Ortín, J.E.; Í del Olmo, M.; Aranda, A. 2007. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 114:83-91.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	162/193



Caridi, A. 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89:417-422.

Carmona-Gutierrez, D.; Bauer, M.A.; Zimmermann, A.; Aguilera, A.; Austriaco, N.; Ayscough, K.; et al. 2018. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microb. Cell*. 5:4.

Carmona-Gutierrez, D.; Eisenberg, T.; Büttner, S.; Meisinger, C.; Kroemer, G.; Madeo, F. 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ*. 17:763-773.

Carrascosa, A. V.; Muñoz, R.; González, R. 2011. (Eds.). *Molecular wine microbiology*. Elsevier. pp. 33-49.

Carrau, F.M.; Medina, K.; Farina, L.; Boido, E.; Henschke, P.A.; Dellacassa, E. 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res*. 8:1196-1207.

Cebollero, E.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R. 2005. Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: a reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. *Biotechnol. Prog*. 21:614-616.

Cebollero, E.; Gonzalez, R. 2006. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol*. 72:4121-4127.

Cebollero, E.; Gonzalez, R. 2007. Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology. *Biotechnol. Adv*. 25:396-409.

Chalier, P.; Angot, B.; Delteil, D.; Doco, T.; Gunata, Z. 2007. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem*. 100:22-30.

Chandler, M.; Stanley, G.A.; Rogers, P.; Chambers, P. 2004. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol*. 54:427-454.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	163/193



Charpentier, C.; Feuillat, M. 1993. Yeast autolysis. *Wine Microbial. Biotechnol.* 225-242.

Chen, S.R.; Dunigan, D.D.; Dickman, M.B. 2003. Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. and Med.* 34:1315-1325.

Chenau, J.; Michelland, S.; Sidibe, J.; Seve, M. 2008. Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci.*, 6:9.

Cherry, J.M.; Hong, E.L.; Amundsen, C.; Balakrishnan, R.; Binkley, G.; Chan, E.T.; et al. (2011). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 40:D700-D705.

Chevtzoff, C.; Yoboue, E.D.; Galinier, A.; Casteilla, L.; Daignan-Fornier, B.; Rigoulet, M.; et al. 2010. Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285:1733-1742.

Chiva, R.; López-Malo, M.; Salvadó, Z.; Mas, A.; Guillamón, J.M. 2012. Analysis of low temperature-induced genes (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res.* 12:831-843.

Ciani, M.; Comitini, F.; Mannazzu, I.; Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10:123-133.

Ciani, M.; Maccarelli, F. 1997. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:199-203.

Claro, F.B.; Rijsbrack, K.; Soares, E.V. 2007. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J. Appl Microbiol.* 102:693-700.

Codon, A.C.; Gasent-Ramirez, J.M., Benitez, T. 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:630-638.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	164/193



Coelho, E.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A. 2011. Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *J. Agr. Food Chem.* 59:8770-8778.

Coloretti, F.; Zambonelli, C.; Tini, V. 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23:672-676.

Conrad, M.; Schothorst, J.; Kankipati, H.N.; Van Zeebroeck, G.; Rubio-Teixeira, M.; Thevelein, J.M. 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38:254-299.

Cramer, A.C.; Vlassides, S.; Block, D.E. 2002. Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 77:49-60.

Cravatt, B.F.; Simon, G.M.; Yates Iii, J.R. 2007. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature.* 450:991.

Crépin, L.; Nidelet, T.; Sanchez, I.; Dequin, S.; Camarasa, C. 2012. Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8102-8111.

Cronwright, G.R.; Rohwer, J.M.; Prior, B.A. 2002. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4448-4456.

Cui, Y.; Zhao, S.; Wu, Z.; Dai, P.; Zhou, B. 2012. Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 23:4373-4382.

Cullen, P.J.; Sprague, G.F. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:13619-13624.

Dasari, S.; Chambers, M.C.; Slebos, R.J.; Zimmerman, L.J.; Ham, A.J.L.; Tabb, D.L. 2010. TagRecon: High-throughput mutation identification through sequence tagging. *J. Proteome Res.* 9:1716-1726.

De Deken, R.H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology.* 44:149-156.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	165/193



Dengis, P.B.; Nelissen, L.R.; Rouxhet, P.G. 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top-and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:718-728.

Diez, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Ruiz-Larrea, F. 2010. Effect of yeast mannoproteins and grape polysaccharides on the growth of wine lactic acid and acetic acid bacteria. *J. Agr. Food Chem.* 58:7731-7739.

Douglas, C.M. 2001. Fungal  $\beta$  (1, 3)-D-glucan synthesis. *Sabouraudia.* 39:55-66.

Drexler, H.C.A. 1998. Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis.* 3:1-7.

Dudek, J.; Rehling, P.; van der Laan, M. 2013. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *BBA-Mol. Cell Res.* 1833:274-285.

Dupin, I.V.; McKinnon, B.M.; Ryan, C.; Boulay, M.; Markides, A.J.; Jones, G.P.; et al. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J. Agric. Food Chem.* 48:3098-3105.

Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Büttner, S.; Tavernarakis, N.; Madeo, F. 2010. Necrosis in yeast. *Apoptosis.* 15:257-268.

Epple, U.D.; Suriapranata, I.; Eskelinen, E.L.; Thumm, M. 2001. Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J. Bacteriol.* 183:5942-5955.

Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. 2001. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:153-159.

Espinazo-Romeu, M.; Cantoral, J.M.; Matallana, E.; Aranda, A. 2008. Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Res.* 8:1127-1136.

Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Torán, M.J.; Garcia-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2056-2061.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	166/193



Evangelista, M.; Blundell, K.; Longtine, M.S.; Chow, C.J.; Adames, N.; Pringle, J.R.; et al. 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*. 276:118-122.

Fahrenkrog, B.; Sauder, U.; Aebi, U. 2004. The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci*. 117:115-126.

Fairbairn, S.; McKinnon, A.; Musarurwa, H.T.; Ferreira, A.C.; Bauer, F.F. 2017. The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Front. Microbiol*. 8:2554.

Fannjiang, Y.; Cheng, W.C.; Lee, S.J.; Qi, B.; Pevsner, J.; McCaffery, J.M.; et al. 2004. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev*. 18:2785-2797.

Fidalgo, M.; Barrales, R.R.; Ibeas, J.I., Jimenez, J. 2006. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 103:11228-11233.

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

Fleet, G.H.; Heard, G.M. 1993. Yeast-Growth during Fermentation. In: Fleet, G.H., (Eds.) Harwood Academic, Wine, Microbiology and Biotechnology, Lausanne, pp:27-54.

Franchin, C.; Pivato, M.; Rattazzi, M.; Arrigoni, G.; Million, R. 2014. OFFGEL fractionation of peptides: Where really is your sample?. *J. Chromatogr. A*. 1355:278-283.

Frank, S.; Gaume, B.; Bergmann-Leitner, E.S.; Leitner, W.W.; Robert, E.G.; Catez, F.; et al. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*. 1:515-525.

Fukuda, T.; Kanki, T. 2018. Mechanisms and physiological roles of mitophagy in yeast. *Mol. Cells*. 41:35.

Gallart, M.; López-Tamames, E.; Suberbiola, G.; Buxaderas, S. 2002. Influence of fatty acids on wine foaming. *J. Agr. Food Chem*. 50:7042-7045.

Ganss, S.; Kirsch, F.; Winterhalter, P.; Fischer, U.; Schmarr, H.G. 2011. Aroma changes due to second fermentation and glycosylated precursors in Chardonnay and Riesling sparkling wines. *J. Agr. Food Chem*. 59:2524-2533.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	167/193



García-Ríos, E.; Guillamón, J.M. 2019. Mechanisms of yeast adaptation to wine fermentations. In: *Yeasts in Biotechnology and Human Health*. Springer, Cham, pp:37-59.

Garofalo, C.; Arena, M.P.; Laddomada, B.; Cappello, M.S.; Bleve, G.; Grieco, F.; et al. 2016. Starter cultures for sparkling wine. *Fermentation*. 2:21.

Gasch, A.P.; Werner-Washburne, M. 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomic*. 2:181-192.

Giacometti, J.; Tomljanović, A.B.; Josić, D. 2013. Application of proteomics and metabolomics for investigation of food toxins. *Food Res. Int.* 54:1042-1051.

González, R.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V. 2003. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *Int. J. Food Microbiol.* 84:21-26.

Gonzalez, R.; Morales, P. 2017. Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. *Microb. Biotechnol.* 10:1449.

González-Ramos, D.; Cebollero, E.; González, R. 2008. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5533-5540.

González-Ramos, D.; González, R. 2006. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agr. Food Chem.* 54:9411-9416.

Gourlay, C.W.; Ayscough, K.R. 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing?. *Nature reviews Mol. Cell Biol.* 6:583-589.

Gouveia, C.; Soares, E.V. 2004. Pb<sup>2+</sup> inhibits competitively flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. I. Brewing.* 110:141-145.

Greenhalf, W.; Stephan, C.; Chaudhuri, B. 1996. Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 380:169-175.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	168/193



Gross, A.; Pilcher, K.; Blachly-Dyson, E.; Basso, E.; Jockel, J.; Bassik, M.C.; et al. 2000. Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-XL. *Mol. Cell. Biol.* 20:3125-3136.

Guadalupe, Z.; Martínez, L.; Ayestarán, B. 2010. Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *Am. J. Enol. Viticult.* 61:191-200.

Guaragnella, N.; Ždravlečić, M.; Antonacci, L.; Passarella, S.; Marra, E.; Giannattasio, S. 2012. The role of mitochondria in yeast programmed cell death. *Front. Oncol.* 2:70.

Guijo, S.; Mauricio, J.C.; Salmon, J.M.; Ortega, J.M. 1997. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and flor film ageing of dry Sherry-type wines. *Yeast* 13:101-117.

Guilloux-Benatier, M.; Guerreau, J.; Feuillat, M. 1995. Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am. J. Enol. Viticult.* 46:486-492.

Guiraud, J.P.; Fontana, A. 1992. Isolation and characterization of a flocculating mutant of *Saccharomyces diastaticus*. *Res. Microbiol.* 143:81-91.

Guo, W.; Tamanoi, F.; Novick, P. 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3:353.

Gustin, M.C.; Albertyn, J.; Alexander, M.; Davenport, K. 1998. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.

Hanada, T.; Noda, N.N.; Satomi, Y.; Ichimura, Y.; Fujioka, Y.; Takao, T.; et al. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282:37298-37302.

Harding, T.M.; Morano, K.A.; Scott, S.V.; Klionsky, D.J. 1995. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.* 131:591-602.

Hauptmann, P.; Riel, C.; Kunz-Schughart, L.A.; Fröhlich, K.U.; Madeo, F.; Lehle, L. 2006. Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol. Microbiol.* 59:765-778.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	169/193



Hazelwood, L.A.; Daran, J.M.; Van Maris, A.J.; Pronk, J.T.; Dickinson, J.R. 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2259-2266.

He, C.; Klionsky, D.J. 2007. Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy.* 3:271-274.

Heinisch, J.J.; Rodicio, R. 2017. Stress responses in wine yeast. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.* Springer, Cham, pp:377-395.

Herker, E.; Jungwirth, H.; Lehmann, K.A.; Maldener, C.; Fröhlich, K.U.; Wissing, S.; et al. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164:501-507.

Hernawan, T.; Fleet, G. 1995. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J. Ind. Microbiol.* 14:440-450.

Herrmann, J.M.; Riemer, J. 2012. Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 287:4426-4433.

Hiltunen, J.K.; Chen, Z.; Haapalainen, A.M.; Wierenga, R.K.; Kastaniotis, A.J. 2010. Mitochondrial fatty acid synthesis—an adopted set of enzymes making a pathway of major importance for the cellular metabolism. *Prog. Lipid Res.* 49:27-45.

Hiltunen, J.K.; Schonauer, M.S.; Autio, K.J.; Mittelmeier, T.M.; Kastaniotis, A.J.; Dieckmann, C.L. 2009. Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *J. Biol. Chem.* 284:9011-9015.

Hirst, M.B.; Richter, C.L. 2016. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am. J. Enol. Viticult.* 67:361-370.

Hohmann, S. 2015. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* 61:373-382.

Hon, T.; Dodd, A.; Dirmeier, R.; Gorman, N.; Sinclair, P.R.; Zhang, L.; et al. 2003. A mechanism of oxygen sensing in yeast multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J. Biol Chem.* 278:50771-50780.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	170/193



Hörth, P.; Miller, C.A.; Preckel, T.; Wenz, C. 2006. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics*. 5:1968-1974.

Horvath, S.E.; Böttinger, L.; Vögtle, F.N.; Wiedemann, N.; Meisinger, C.; Becker, T.; et al. 2012. Processing and topology of the yeast mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase 1. *J. Biol. Chem.* 287:36744-36755.

Horvath, S.E.; Daum, G. 2013. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* 52:590-614.

Hounsa, C.G.; Brandt, E.V.; Thevelein, J.; Hohmann, S.; Prior, B.A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. 144:671-680.

Hu, X.H.; Wang, M.H.; Tan, T.; Li, J.R.; Yang, H.; Leach, L.; et al. 2007. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 175:1479-1487.

Hutchins, M.U.; Klionsky, D.J. 2001. Vacuolar localization of oligomeric  $\alpha$ -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276:20491-20498.

Ichimura, Y.; Kirisako, T.; Takao, T.; Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Ishihara, N.; et al. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 408:488-492.

Inoue, S.B.; Takewakt, N.; Takasuka, T.; Mio, T.; Adachi, M.; Fujii, Y.; et al. 1995. Characterization and gene cloning of 1, 3- $\beta$ -d-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 231:845-854.

Iraqi, I.; Kienda, G.; Soeur, J.; Faye, G.; Baldacci, G.; Kolodner, R.D.; et al. 2009. Peroxiredoxin Tsa1 is the key peroxidase suppressing genome instability and protecting against cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 5.

Ishigami, M.; Nakagawa, Y.; Hayakawa, M.; Imura, Y. 2004. *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbial. Lett.* 237:425-430.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	171/193



Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; et al. 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics*. 4:1265-1272.

Jiménez-Martí, E.; Gomar-Alba, M.; Palacios, A.; Ortiz-Julien, A. 2011. Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1551-1561.

Jin, Y.L.; Ritcey, L.L.; Speers, R.A.; Dolphin, P.J. 2001. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59:1-9.

Jin, Y.L.; Speers, R.A. 2000. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58:108-116.

Jona, G.; Choder, M.; Gileadi, O. 2000. Glucose starvation induces a drastic reduction in the rates of both transcription and degradation of mRNA in yeast. *BBA-Gene Struct. Expr.* 1491:37-48.

Jorin-Novo, J.V.; Maldonado, A.M.; Echevarria-Zomeno, S.; Valledor, L.; Castillejo, M.A.; Curto, M.; et al. 2009. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *J. Proteom.* 72:285-314.

Juega, M.; Nunez, Y.P.; Carrascosa, A.V.; Martinez-Rodriguez, A.J. 2012. Influence of yeast mannoproteins in the aroma improvement of white wines. *J. Food Sci.* 77:M499-M504.

Jung, U.S.; Levin, D.E. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 34:1049-1057.

Kalebina, T.S.; Rekestina, V.V. 2019. Molecular organization of yeast cell envelope. *Mol. Biol.* 53:850-861.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	172/193



Kamada, Y.; Funakoshi, T.; Shintani, T.; Nagano, K.; Ohsumi, M.; Ohsumi, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150:1507-1513.

Kanki, T.; Furukawa, K.; Yamashita, S.I. 2015. Mitophagy in yeast: molecular mechanisms and physiological role. *BBA-Mol. Cell Res.* 1853:2756-2765.

Kanki, T.; Wang, K.; Baba, M.; Bartholomew, C.R.; Lynch-Day, M.A.; Du, Z.; et al. 2009a. A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 20:4730-4738.

Kanki, T.; Wang, K.; Cao, Y.; Baba, M.; Klionsky, D.J. 2009b. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell.* 17:98-109.

Kemp, B.; Alexandre, H.; Robillard, B.; Marchal, R. 2015. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agr. Food Chem.* 63:19-38.

Ketela, T.; Green, R.; Bussey, H. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p Is a Potential Cell Wall Stress Sensor and Upstream Activator of the *PKC1-MPK1* Cell Integrity Pathway. *J. Bacteriol.* 181:3330-3340.

Khalfan, W.A.; Klionsky, D.J. 2002. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:468-475.

Kihara, A.; Noda, T.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y. 2001. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152:519-530.

Kim, Y.M.; Bombeck, C.A.; Billiar, T.R. 1999. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ. Res.* 84:253-256.

Kirisako, T.; Baba, M.; Ishihara, N.; Miyazawa, K.; Ohsumi, M.; Yoshimori, T.; et al. 1999. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147:435-446.

Kirisako, T.; Ichimura, Y.; Okada, H.; Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Yoshimori, T.; et al. 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	173/193



essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151:263-276.

Kitagaki, H.; Araki, Y.; Funato, K.; Shimoi, H. 2007. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* 581:2935-2942.

Klionsky, D. 2003. Autophagy. (Ed.). In: CRC press (Georgetown, TX: Landes Biosciences).

Klionsky, D.J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118:7-18.

Klionsky, D.J.; Cregg, J.M.; Dunn, W.A.; Emr, S.D.; Sakai, Y.; Sandoval, I.V.; et al. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 5:539-545.

Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23:185-202.

Klis, F.M.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:239-256.

Kollár, R.; Reinhold, B.B.; Petráková, E.; Yeh, H.J.; Ashwell, G., Drgonová, J.; et al. 1997. Architecture of the yeast cell wall  $\beta$  (1 $\rightarrow$  6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$  (1 $\rightarrow$  3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272:17762-17775.

Kondoh, O.; Tachibana, Y.; Ohya, Y.; Arisawa, M.; Watanabe, T. 1997. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1, 3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 179:7734-7741.

Köning, H.; Uden, G.; Fröhlich, J. 2017. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer.

Kowalski, L.R.; Kondo, K.; Inouye, M. 1995. Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 15:341-353.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	174/193



Kubota, S.; Takeo, I.; Kume, K.; Kanai, M.; Shitamukai, A.; Mizunuma, M.; et al. 2004. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:968-972.

Kuriyama, H.; Umeda, I.; Kobayashi, H. 1991. Role of cations in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and discrimination of the corresponding proteins. *Can. J. Microbiol.* 37:397-403.

Landolfo, S.; Politi, H.; Angelozzi, D.; Mannazzu, I. 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *BBA-Gen. Subjects.* 1780:892-898.

Lang, T.; Reiche, S.; Straub, M.; Bredschneider, M.; Thumm, M. 2000. Autophagy and the cvt Pathway Both Depend on AUT9. *J. Bacteriol.* 182:2125-2133.

Legakis, J.E.; Yen, W.L.; Klionsky, D.J. 2007. A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy.* 3:422-432.

Legras, J.L.; Moreno-Garcia, J.; Zara, S.; Zara, G.; Garcia-Martinez, T.; Mauricio, J.C.; et al. 2016. Flor yeast: new perspectives beyond wine aging. *Front. Microbiol.* 7:503.

Leroy, M.J.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C. 1990. Yeast autolysis during champagne aging. *Am. J. Enol. Viticult.* 41:21-28.

Levin, D.E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:262-291.

Levine, B.; Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 6:463-477.

Li, W.; Sun, L.; Liang, Q.; Wang, J.; Mo, W.; Zhou, B. 2006. Yeast *AMID* homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Mol. Biol. Cell.* 17:1802-1811.

Liang, Q.; Zhou, B. 2007. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol. Biol. Cell.* 18:4741-4749.

Ligr, M.; Madeo, F.; Fröhlich, E.; Hilt, W.; Fröhlich, K.U.; Wolf, D.H. 1998. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS lett.* 438:61-65.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	175/193



Ligr, M.; Velten, I.; Frohlich, E.; Madeo, F.; Ledig, M.; Frohlich, K.U.; et al. 2001. The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 12:2422-2432.

Lill, R.; Hoffmann, B.; Molik, S.; Pierik, A.J.; Rietzschel, N.; Stehling, O.; et al. 2012. The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *BBA-Mol. Cell Res.* 1823:1491-1508.

Lodder, A.L.; Lee, T.K.; Ballester, R. 1999. Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 152:1487-1499.

López de Lerma, N.; Peinado, R.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. 2018. Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chem.* 250:22-29.

Lubbers, S.; Voilley, A.; Feuillat, M.; Charpentier, C. 1994. Influence of mannoproteins from yeast on the aroma intensity of a model wine. *LWT-Food Sci. Technol.* 27:108-114.

Ludovico, P.; Rodrigues, F.; Almeida, A.; Silva, M.T.; Barrientos, A.; Côte-Real, M. 2002. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13:2598-2606.

Ma, M.; Liu, Z.L. 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:829-845.

Macedo-Márquez, A. 2012. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 15:97-103. Madeo, F.; Fröhlich, E.; Fröhlich, K.U. 1997. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* 139:729-734.

Madeo, F.; Fröhlich, E.; Ligr, M.; Grey, M.; Sigrist, S.J.; Wolf, D.H.; et al. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 145:757-767.

Madeo, F.; Herker, E.; Maldener, C.; Wissing, S.; Lächelt, S.; Herlan, M.; et al. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell.* 9:911-917.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	176/193



Malina, C.; Larsson, C.; Nielsen, J. 2018. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Res.* 18:foy040.

Mamede, M.E.; Cardello, H.M.; Pastore, G.M. 2005. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chem.* 89:63-68.

Manon, S.; Chaudhuri, B.; Guérin, M. 1997. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* 415:29-32.

Mao, K.; Klionsky, D.J. 2013. Mitochondrial fission facilitates mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy.* 9:1900-1901.

Martínez, P.; Rodríguez, L.P.; Benítez, T. 1997. Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 48:160-168.

Martínez, P.; Rodríguez, L.P.; Benítez, T. 1997. Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 48:160-168.

Martínez-García, R.; García-Martínez, T.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; Moreno, J. 2017. Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO<sub>2</sub> pressure in sealed bottle. *Food Chem.* 237:1030-1040.

Martínez-García, R.; Roldán-Romero, Y.; Moreno, J.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; García-Martínez, T. 2020. Use of a flor yeast strain for the second fermentation of sparkling wines: Effect of endogenous CO<sub>2</sub> over-pressure on the volatilome. *Food Chem.* 308:125555.

Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C. 2000. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agr. Food Chem.* 48:1081-1085.

Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C.; Carrascosa, A.V. 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J. Food Microbiol.* 71:45-51.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	177/193



Martí-Raga, M.; Marullo, P.; Beltran, G.; Mas, A. 2016. Nitrogen modulation of yeast fitness and viability during sparkling wine production. *Food Microbiol.* 54:106-114.

Martí-Raga, M.; Sancho, M.; Guillamón, J.M.; Mas, A.; Beltran, G. 2015. The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *Food Res. Int.* 67:126-135.

Matallana, E.; Aranda, A. 2017. Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* 64:103-110.

Mauricio, J.C.; Ortega, J.M. 1997. Nitrogen compounds in wine during its biological aging by two flor film yeasts: An approach to accelerated biological aging of dry sherry-type wines. *Biotechnol. Bioeng.* 53:159-167.

Mayr, J.A. 2015. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38:137-144.

Mazur, P.; Baginsky, W. 1996. In vitro activity of 1, 3- $\beta$ -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* 271:14604-14609.

Mazur, P.; Morin, N.; Baginsky, W.; El-Sherbeini, M.; Clemas, J.A.; Nielsen, J.B.; et al. 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1, 3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* 15:5671-5681.

Mazzoni, C.; Herker, E.; Palermo, V.; Jungwirth, H.; Eisenberg, T.; Madeo, F.; et al. 2005. Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep.* 6:1076-1081.

Mendes-Ferreira, A.; Del Olmo, M.; García-Martínez, J.; Jiménez-Martí, E.; Mendes-Faia, A.; Pérez-Ortín, J.E.; et al. 2007. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3049-3060.

Mio, T.; Adachi-Shimizu, M.; Tachibana, Y.; Tabuchi, H.; Inoue, S.B.; Yabe, T.; et al. 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSCI/FKS1* and its involvement in beta-1, 3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 179:4096-4105.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	178/193



Mizushima, N.; Levine, B.; Cuervo, A.M.; Klionsky, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451:1069.

Mizushima, N.; Noda, T.; Ohsumi, Y. 1999. Apg16p is required for the function of the Apg12p–Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J*. 18:3888-3896.

Mizushima, N.; Noda, T.; Yoshimori, T.; Tanaka, Y.; Ishii, T.; George, M.D.; et al. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*,. 395:395-398.

Moradas-Ferreira, P.; Costa, V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep*. 5:277-285.

Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Polo, M.C. 1996. Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cava (sparkling wines). *J. Agr. Food Chem*. 44:3783-3788.

Moreno-García, J.; Coi, A.L.; Zara, G.; García-Martínez, T.; Mauricio, J.C.; Budroni, M. 2018. Study of the role of the covalently linked cell wall protein (Ccw14p) and yeast glycoprotein (Ygp1p) within biofilm formation in a flor yeast strain. *FEMS Yeast Res*. 18:foy005.

Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Mauricio, J.C. 2015. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiol*. 46:25-33.

Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Millán, M.C.; Mauricio, J.C. 2014. A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation. *Int. J. Food Microbiol*. 172:21-29.

Moreno-García, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. 2017. Differential Proteome Analysis of a Flor Yeast Strain under Biofilm Formation. *Int. J. Mol. Sci*. 18:720.

Mozdy, A.D.; McCaffery, J.M.; Shaw, J.M. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol*. 151:367-380.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	179/193



Mulford, K.E.; Fassler, J.S. 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot. Cell.* 10:761-769.

Murata, Y.; Homma, T.; Kitagawa, E.; Momose, Y.; Sato, M.S.; Odani, M.; et al. 2006. Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4 °C. *Extremophiles.* 10:117-128.

Nakagawa, Y.; Sakumoto, N.; Kaneko, Y.; Harashima, S. 2002. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:707-713.

Narasimhan, M.L.; Damsz, B.; Coca, M.A.; Ibeas, J.I.; Yun, D.J.; Pardo, J.M.; et al. 2001. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell.* 8:921-930.

Nasmyth, K.; Dirick, L. 1991. The role of *SWI4* and *SWI6* in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell.* 66:995-1013.

Noda, T.; Kim, J.; Huang, W.P.; Baba, M.; Tokunaga, C.; Ohsumi, Y.; et al. 2000. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* 148:465-480.

Noda, T.; Ohsumi, Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273:3963-3966.

Nonaka, H.; Tanaka, K.; Hirano, H.; Fujiwara, T.; Kohno, H.; Umikawa, M.; et al. 1995. A downstream target of *RHO1* small GTP-binding protein is *PKC1*, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:5931-5938.

Núñez, Y.P.; Carrascosa, A.V.; Gonzalez, R.; Polo, M.C.; Martínez-Rodríguez, A. 2006. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *J. Agr. Food Chem.* 54:7898-7903.

Núñez, Y.P.; Carrascosa, A.V.; González, R.; Polo, M.C.; Martínez-Rodríguez, A.J. 2005. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *J. Agr. Food Chem.* 53:7232-7237.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	180/193



Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:211-216.

OIV. 2012. Directrices para la caracterización de levaduras de vino del género *Saccharomyces* aisladas de ambientes vitivinícolas. RESOLUCIÓN OIV-OENO 370-2012. <http://www.oiv.int/public/medias/1459/oiv-oeno-370-2012-es.pdf>.

OIV. 2019. Compendium of international methods of wine and must analysis. January 2019. <http://www.oiv.int/public/medias/6619/compendium-2019-en-vol1.pdf>.

OIV. 2020. OIV FOCUS THE GLOBAL SPARKLING WINE MARKET. April 2020. <http://www.oiv.int/public/medias/7291/oiv-sparkling-focus-2020.pdf>.

Onodera, J.; Ohsumi, Y. 2004. Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279:16071-16076.

Orlowski, R.Z. 1999. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:303-313.

Orozco, H.; Matallana, E.; Aranda, A. 2012. Oxidative stress tolerance, adenylate cyclase, and autophagy are key players in the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2748-2757.

Palomero, F.; Benito, S.; Morata, A.; Tesfaye, W.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. 2009. Effect on the autolysis process and the colouring matter of several commercial preparations with  $\beta$ -glucanase action in red winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* 229:585-592.

Palomero, F.; Morata, A.; Benito, S.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. 2007. Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chem.* 105:838-846.

Pammer, M.; Briza, P.; Ellinger, A.; Schuster, T.; Stucka, R.; Feldmann, H.; et al. 1992. *DIT101 (CSD2, CALI)*, a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast.* 8:1089-1099.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	181/193



Pan, Y. 2011. Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast. *Exp. Gerontol.* 46:847-852.

Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:263.

Peinado, R.A.; Mauricio, J.C. 2009. Biologically aged wine. *Wine Chem. Biochem.* Springer, New York, NY. Pp. 81-101.

Peinado, R.A.; Moreno, J.A.; Muñoz, D.; Medina, M.; Moreno, J. 2004. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *J. Agric. Food Chem.* 52:6389-93.

Penacho, V.; Valero, E.; Gonzalez, R. 2012. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 153:176-182.

Pereira, C.; Camougrand, N.; Manon, S.; Sousa, M.J.; Côte-Real, M. 2007. ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis. *Mol. Microbiol.* 66:571-582.

Pereira, C.; Chaves, S.; Alves, S.; Salin, B.; Camougrand, N.; Manon, S.; et al. 2010. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. *Mol. Microbiol.* 76:1398-1410.

Perez-Gallardo, R.V.; Briones, L.S.; Díaz-Pérez, A.L.; Gutiérrez, S.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Campos-García, J. 2013. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.* 13:804-819.

Pérez-Ortín, J.E.; García-Martínez, J. 2005. Genómica y proteómica de levaduras vínicas. En: *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V.; Muñoz, R.; González, R. (Eds.). pp 185-209. AMV Ediciones, Madrid (España).

Perrone, G.G.; Tan, S.X.; Dawes, I.W. 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *BBA-Mol Cell Res.* 1783:1354-1368.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	182/193



Philip, B.; Levin, D.E. 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell Biol.* 21:271-280.

Piggott, N.; Cook, M.A.; Tyers, M.; Measday, V. 2011. Genome-wide Fitness Profiles Reveal a Requirement for Autophagy during Yeast Fermentation. *G3 (Bethesda).* 1:353-367.

Pinto, J.; Oliveira, A.S.; Azevedo, J.; De Freitas, V.; Lopes, P.; Roseira, I.; et al. 2018. Assessment of oxidation compounds in oaked Chardonnay wines: A GC–MS and 1H NMR metabolomics approach. *Food Chem.* 257:120-127.

Pinu, F.R. 2018. Grape and wine metabolomics to develop new insights using untargeted and targeted approaches. *Fermentation*, 4:92.

Pozniakovsky, A.I.; Knorre, D.A.; Markova, O.V.; Hyman, A.A.; Skulachev, V.P.; Severin, F.F. 2005. Role of mitochondria in the pheromone-and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J. Cell Biol.* 168:257-269.

Pozo-Bayón, M.Á.; Martínez-Rodríguez, A.; Pueyo, E.; Moreno-Arribas, M.V. 2009. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Technol.* 20:289-299.

Pozo-Bayón, M.A.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C. 2003. Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *Am. J. Enol. Viticult.* 54:273-278.

Pueyo, E.; Martínez-Rodríguez, A.; Polo, M.C.; Santa-María, G.; Bartolomé, B. 2000. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agr Food Chem.* 48:116-122.

Puig-Pujol, A.; Bertran, E.; García-Martínez, T.; Capdevila, F.; Mínguez, S.; Mauricio J.C. 2013. Application of a new organic yeast immobilization method for sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* 64:3.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	183/193



Qadota, H.; Python, C.P.; Inoue, S.B.; Arisawa, M.; Anraku, Y.; Zheng, Y.; et al. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3- $\beta$ -glucan synthase. *Science*. 272:279-281.

Qi, S.-W., Li, Q.X. 2010. Proteomics in pesticide toxicology. En: R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Volume I. Academic Press, Cambridge, MA: USA.

Rainieri, S.; Pretorius, I.S. 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50:15-32.

Reeds, P.J.; Berthold, H.K.; Boza, J.J.; Burrin, D.G.; Jahoor, F.; Jaksic, T.; et al. 1997. Integration of amino acid and carbon intermediary metabolism: studies with uniformly labeled tracers and mass isotopomer analysis. *Eur. J. Pediatr.* 156:S50-S58.

Reggiori, F.; Shintani, T.; Chong, H.; Nair, U.; Klionsky, D.J. 2005. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*. 1:101-109.

Regodón, J.A.; Pérez, F.; Valdés, M.E.; De Miguel, C.; Ramirez, M. 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* 14:247-254.

Ribeiro, G.F.; Côte-Real, M.; Johansson, B. 2006. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol. Biol. Cell.* 17:4584-4591.

Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 16:17-23.

Rochfort, S.; Ezernieks, V.; Bastian, S.E.P.; Downey, M.O. 2010. Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chem.* 121:1296–1304.

Rodrigues, F.; Ludovico, P.; Leao, C. 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Rosa, C.A.; Péter, G. (Eds.). pp. 101-121. Springer: New York, NY, USA.

Rodriguez-Nogales, J.M.; Fernández-Fernández, E.; Vila-Crespo, J. 2012. Effect of the addition of  $\beta$ -glucanases and commercial yeast preparations on the chemical and sensorial characteristics of traditional sparkling wine. *Eur. Food Res. Technol.* 235:729-744.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	184/193



- Rodriguez-Vargas, S.; Estruch, F.; Randez-Gil, F. 2002. Gene expression analysis of cold and freeze stress in Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3024-3030.
- Romano, P.; Fiore, C.; Paraggio, M.; Caruso, M.; Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86:169-180.
- Roncero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41:367-378.
- Rossignol, T.; Dulau, L.; Julien, A.; Blondin, B. 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast.* 20:1369-1385.
- Rossignol, T.; Kobi, D.; Jacquet-Gutfreund, L.; Blondin, B. 2009. The proteome of a wine yeast strain during fermentation, correlation with the transcriptome. *J. Appl. Microbiol.* 107:47-55.
- Rossouw, D.; Olivares-Hernandes, R.; Nielsen, J.; Bauer, F.F. 2009. Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6600-6612.
- Rossouw, D.; van den Dool, A.H.; Jacobson, D.; Bauer, F.F. 2010. Comparative transcriptomic and proteomic profiling of industrial wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3911-3923.
- Sahara, T.; Goda, T.; Ohgiya, S. 2002. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* 277:50015-50021.
- Sampermans, S.; Mortier, J.; Soares, E.V. 2005. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J. Appl Microbiol.* 98:525-531.
- Santos, J.; Sousa, M.J.; Leão, C. 2012. Ammonium is toxic for aging yeast cells, inducing death and shortening of the chronological lifespan. *PloS One.* 7.
- Saraiva, L.; Silva, R.D.; Pereira, G.; Gonçalves, J.; Côrte-Real, M. 2006. Specific modulation of apoptosis and Bcl-xL phosphorylation in yeast by distinct mammalian protein kinase C isoforms. *J. Cell Sci.* 119:3171-3181.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	185/193



Saulnier, L.; Mercereau, T.; Vezinhet, F. 1991. Mannoproteins from flocculating and non-flocculating *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 54:275-286.

Schade, B.; Jansen, G.; Whiteway, M.; Entian, K.D.; Thomas, D.Y. 2004. Cold adaptation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 15:5492-5502.

Schmelzle, T.; Hall, M.N. 2000. *TOR*, a central controller of cell growth. *Cell.* 103:253-262.

Schmelzle, T.; Helliwell, S.B.; Hall, M.N. 2002. Yeast protein kinases and the *RHO1* exchange factor *TUS1* are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell Biol.* 22:1329-1339.

Schmidt, A.; Schmelzle, T.; Hall, M.N. 2002. The *RHO1-GAPs SAC7, BEM2* and *BAG7* control distinct *RHO1* functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 45:1433-1441.

Schueuermann, C.; Steel, C.C.; Blackman, J.W.; Clark, A.C.; Schwarz, L.J.; Moraga, J.; et al. 2019. A GC-MS untargeted metabolomics approach for the classification of chemical differences in grape juices based on fungal pathogen. *Food Chem.* 270:375–384.

Scott, S.V.; Baba, M.; Ohsumi, Y.; Klionsky, D.J. 1997. Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.* 138:37-44.

Shahinian, S.; Bussey, H. 2000.  $\beta$ -1, 6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35:477-489.

Sharma, S.C. 1997. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152:11-15.

Shaw, J.M. Nunnari, J. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12:178-184.

Silva, A.; Almeida, B.; Sampaio-Marques, B.; Reis, M.I.R.; Ohlmeier, S.; Rodrigues, F.; et al. 2011. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. *BBA-Mol. Cell Res.* 1813:2044-2049.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	186/193



Singh, K.; Kang, P.J.; Park, H.O. 2008. The Rho5 GTPase is necessary for oxidant-induced cell death in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:1522-1527.

Snyder, C.M.; Shroff, E.H.; Liu, J.; Chandel, N.S. 2009. Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members. *PloS One.* 4.

Soares, E.V. 2011. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J. Appl. Microbiol.* 110:1-18.

Sonck, K.A.; Kint, G.; Schoofs, G.; Vander Wauven, C.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S.C. 2009. The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics.* 9:565-579.

Song, Q.; Kumar, A. 2012. An overview of autophagy and yeast pseudohyphal growth: integration of signaling pathways during nitrogen stress. *Cells.* 1:263-283.

Speers, R.A.; Wan, Y.Q.; Jin, Y.L.; Stewart, R.J. 2006. Effects of fermentation parameters and cell wall properties on yeast flocculation. *J. I. Brewing.* 112:246-254.

Stack, J.H.; DeWald, D.B.; Takegawa, K.; Emr, S.D. 1995. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.* 129:321-334.

Stanley, D.; Bandara, A.; Fraser, S.; Chambers, P.J.; Stanley, G.A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. App. Microbiol.* 109:13-24

Stratford, M. 1989. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast.* 5:487-496.

Stratford, M. 1996. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. *FEMS Microbiol. Lett.* 136:13-18.

Straver, M.H.; Kijne, J.W.; Smit, G. 1993. Cause and control of flocculation in yeast. *Trends Biotechnol.* 11:228-232.

Stuart, R.A. 2008. Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40:411.

Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A. 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Tech.* 23:39-50.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	187/193



Suzuki, K.; Kubota, Y.; Sekito, T.; Ohsumi, Y. 2007. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*. 12:209-218.

Suzuki, K.; Ohsumi, Y. 2007. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 581:2156-2161.

Suzzi, G.; Romano, P.; Zambonelli, C. 1984. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences, and stability of the character. *Can. J. Microbiol*. 30:36-39.

Tabera, L.; Muñoz, R.; González, R. 2006. Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol*. 72:2351-2358.

Tai, S.L.; Daran-Lapujade, P.; Walsh, M.C.; Pronk, J.T.; Daran, J.M. 2007. Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. *Mol. Biol. Cell*. 18:5100-5112.

Takeshige, K.; Baba, M.; Tsuboi, S.; Noda, T.; Ohsumi, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol*. 119:301-311.

Takpho, N.; Watanabe, D.; Takagi, H. 2018. Valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase Bat1. *Microbial. Cell*. 5:293.

Taylor, N.W.; Orton, W.L. 1975. Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. I. Brewing*. 81:53-57.

Teixeira, M.C.; Raposo, L.R.; Mira, N.P.; Lourenço, A.B.; Sá-Correia, I. 2009. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol*. 75:5761-5772.

Tesnière, C.; Brice, C.; Blondin, B. 2015. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 99:7025-7034.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAVQESA</a>	Página	188/193



Teunissen, A.W.R.H.; Holub, E.; Van Der Hucht, J.; Van Den Berg, J.A.; Steensma, H.Y. 1993. Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 9:423-427.

Theodoridis, G.; Gika, H.; Franceschi, P.; Caputi, L.; Arapitsas, P.; Scholz, M.; et al. 2012. LC-MS based global metabolite profiling of grapes: Solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics*. 8:175–185.

Todd, B.E.; Fleet, G.H.; Henschke, P.A. 2000. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *Am. J. Enol. Viticult.* 51:65-72.

Tofalo, R.; Perpetuini, G.; Di Gianvito, P.; Arfelli, G.; Schirone, M.; Corsetti, A.; et al. 2016. Characterization of specialized flocculent yeasts to improve sparkling wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 120:1574-1584.

Torresi, S.; Frangipane, M.T.; Anelli, G. 2011. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chem.* 129:1232-1241.

Torresi, S.; Frangipane, M.T.; Garzillo, A.M.; Massantini, R.; Contini, M. 2014. Effects of a  $\beta$ -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food Res. Int.* 55:83-92.

Trabalzini, L.; Paffetti, A.; Scaloni, A.; Talamo, F.; Ferro, E.; Coratza, G.; et al. 2003. Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 370:35-46.

Treu, L.; Campanaro, S.; Nadai, C.; Toniolo, C.; Nardi, T.; Giacomini, A.; et al. 2014. Oxidative stress response and nitrogen utilization are strongly variable in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with different fermentation performances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:4119-4135.

Tudela, R.; Gallardo-Chacón, J.J.; Rius, N.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. 2012. Ultrastructural changes of sparkling wine lees during long-term aging in real enological conditions. *FEMS Yeast Res.* 12:466-476.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	189/193



Turetschek, R.; Lyon, D.; Desalegn, G.; Kaul, H.P.; Wienkoop, S. 2016. A proteomic workflow using high-throughput de novo sequencing towards complementation of genome information for improved comparative crop science. In *Proteomics in Systems Biology*; Humana Press: New York, NY, USA. pp. 233–243.

Ubeda, C.; Kania-Zelada, I.; del Barrio-Galán, R.; Medel-Marabolí, M.; Gil, M.; Peña-Neira, Á. 2019. Study of the changes in volatile compounds, aroma and sensory attributes during the production process of sparkling wine by traditional method. *Food Res. Int.* 119:554-563.

Uren, A.G.; Beilharz, T.; O’Connell, M.J.; Bugg, S.J.; Van Driel, R.; Vaux, D.L.; et al. 1999. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:10170-10175.

Váchová, L.; Palková, Z. 2005. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J. Cell Biol.* 169:711-717.

Valero, E.; Millán, C.; Ortega, J.M.; Mauricio, J.C. 2003. Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Sci. Food Agric.* 83:830-835.

Vanhoenacker, G.; De Villiers, A.; Lazou, K.; De Keukeleire, D.; Sandra, P. 2001. Comparison of high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy and capillary electrophoresis-mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines. *Chromatographia.* 54:309-315.

Vartak, R.; Porras, C.A.M.; Bai, Y. 2013. Respiratory supercomplexes: Structure, function and assembly. *Protein and Cell.* 4:582-590.

Vedel, F.; Lalanne, É.; Sabar, M.; Chétrit, P.; De Paepe, R. 1999. The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. *Plant Physiol. Biochem.* 37:629-643.

Velázquez, R.; Zamora, E.; Álvarez, M.; Álvarez, M.L.; Ramírez, M. 2016. Using mixed inocula of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiol.* 59:150-160.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	190/193



Verna, J.; Lodder, A.; Lee, K.; Vagts, A.; Ballester, R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:13804-13809.

Vidgren, V.; Londesborough, J. 2011. 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing. J. I. Brewing. 117:475-487.

Vigentini, I.; Barrera Cardenas, S.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C.A.; Picozzi, C.; et al. 2017. Use of native yeast strains for in-bottle fermentation to face the uniformity in sparkling wine production. Front. Microbiol. 8:1225.

Villas-Bôas, S.G.; Mas, S.; Åkesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrom. Rev. 24:613-646.

Visser, W.; Scheffers, W.A.; Batenburg-van der Vegte, W.H.; van Dijken, J.P. 1990. Oxygen requirements of yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 56:3785-3792.

Vögtle, F.N.; Wortelkamp, S.; Zahedi, R.P.; Becker, D.; Leidhold, C.; Gevaert, K.; et al. 2009. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. Cell. 139:428-439.

Walter, D.; Wissing, S.; Madeo, F.; Fahrenkrog, B. 2006. The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. J. Cell Sci. 119:1843-1851.

Wanichthanarak, K.; Fahrman, J.F.; Grapov, D. 2015. Genomic, proteomic, and metabolomic data integration strategies. Biomark. Insights. 10:BMI-S29511.

Watari, J.; Takata, Y.; Ogawa, M.; Sahara, H.; Koshino, S.; Onnela, M.L.; et al. 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. Yeast. 10:211-225.

Waters, E.J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.M. 1994. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. Carbohydr. Polym. 23:185-191.

Webert, H.; Freibert, S.A.; Gallo, A.; Heidenreich, T.; Linne, U.; Amlacher, S.; et al. 2014. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. Nat. Commun. 5:1-12.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	191/193



Williamson, D. 2002. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat. Rev. Genet.* 3:475-481.

Wissing, S.; Ludovico, P.; Herker, E.; Büttner, S.; Engelhardt, S.M.; Decker, T.; et al. 2004. An *AIF* orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166:969-974.

Wolff, S.; Otto, A.; Albrecht, D.; Zeng, J.S.; Büttner, K.; Glückmann, M.; et al. 2006. Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol. Cell. Proteomics.* 5:1183-1192.

Wu C.C.; MacCoss M.J. 2002. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4:242-250.

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. *Int. J. Food Microbiol.* 108:376-384.

Yang, H.; Ren, Q.; Zhang, Z. 2008. Cleavage of Mcd1 by caspase-like protease Esp1 promotes apoptosis in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 19:2127-2134.

Yang, Z.; Huang, J.; Geng, J.; Nair, U.; Klionsky, D.J. 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 17:5094-5104.

Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12:1542-1552.

You, K.M.; Rosenfield, C.L.; Knipple, D.C. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1499-1503.

Zara, S.; Antonio Farris, G.; Budroni, M.; Bakalinsky, A.T. 2002. *HSP12* is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast.* 19:269-276.

Zara, S.; Bakalinsky, A.T.; Zara, G.; Pirino, G.; Demontis, M.A.; Budroni, M. 2005. *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2934-2939.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	192/193



Zara, S.; Gross, M.K.; Zara, G.; Budroni, M.; Bakalinsky, A.T. 2010. Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 76:4089-4091.

Zhang, L.; Hach, A. 1999. Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. Cell. Mol. Life Sci. 56:415-426.

Zhang, W.; Li, F.; Nie, L. 2010. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. Microbiology. 156:287-301.

Ziman, M.; Chuang, J.S.; Schekman, R.W. 1996. Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. Mol. Biol. Cell. 7:1909-1919.

Zuzuarregui, A.; Carrasco, P.; Palacios, A.; Julien, A.; Del Olmo, M. 2005. Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. J. Appl. Microbiol. 98:299-307.

Zuzuarregui, A.; Monteoliva, L.; Gil, C. 2006. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 72:836-847.

Código Seguro de Verificación	V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA	Fecha	17/07/2020 13:43:54
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	JUAN ANTONIO PORRAS AGÜERA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA">http://sede.uco.es/verifirma/code/V3PIDGF4FARCOZRAGXXAXVQESA</a>	Página	193/193

