



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Título de la tesis: ESTUDIO PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE  
LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CAVA

Thesis Title: PROTEOMIC AND METABOLOMIC STUDY OF WINE  
YEASTS DURING CAVA PRODUCTION

Directores: JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO  
MARÍA TERESA GARCÍA MARTÍNEZ

Doctorando/a: MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ JIMÉNEZ

Fecha de depósito tesis en el Idep: 20 de octubre de 2020

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	1/186



TITULO: *ESTUDIO PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE LEVADURAS  
VINICAS DURANTE LA PRODUCCION DE CAVA*

AUTOR: *María del Carmen González Jiménez*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

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

---



**TÍTULO DE LA TESIS:**

ESTUDIO PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CAVA.

**THESIS TITLE:**

PROTEOMIC AND METABOLOMIC STUDY OF WINE YEASTS DURING CAVA PRODUCTION.

**DOCTORANDO:** MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ JIMÉNEZ

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

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 Doña **María del Carmen González Jiménez**, titulado "ESTUDIO PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO DE LEVADURAS VÍNICAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CAVA" se ha 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 Dña. **María del Carmen González Jiménez**, Graduada en Bioquímica 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 algunos miembros 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.

La doctoranda **María del Carmen González Jiménez** 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 primer autor de tres artículos de investigación y otros dos en fase de preparación para ser enviados a publicar. Los trabajos presentados han sido publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports* (JCR) de Microbiología, en las áreas

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	2/186



especializadas de Microbiología de los alimentos y de Biotecnología de los microorganismos.

La revisión bibliográfica consultada y actualizada le ha proporcionado, por un lado, una base sólida sobre su tema de investigación y le ha permitido elaborar una introducción que consta de la elaboración y metodología de vinos espumosos, microbiología y características organolépticas de estos vinos, así como de un estudio de las Ciencias Biómicas en Enología. Y, por otra parte, se ha centrado en tres aspectos fundamentales como son: en el flujo de los compuestos del carbono en levaduras vínicas, en la identificación de las proteínas implicadas en el metabolismo de los compuestos del aroma y en los procesos biológicos afectados por la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación. 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. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten confirmar la hipótesis de partida, así pues, se podría utilizar una levadura no convencional, una levadura formadora de velo de flor, para la elaboración de vinos espumosos. El uso de una levadura flor para la producción de vino espumoso sería interesante debido a su alta tolerancia al etanol y a sus propiedades adhesivas que facilitan su mejor recuperación en la fase "degüelle", lo que hace que la levadura de flor sea adecuada para una segunda fermentación en botella. Esto significaría, no solo una reducción en los costos y tiempo de producción sino también un aumento en la biodiversidad de las cepas de levadura para la producción 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 científica 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 **María del Carmen González Jiménez**.

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 octubre 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: 2020.10.08 22:54:44 +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: 2020.10.08 22:53:14 +02'00'

Fdo.: Dr JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO

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

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	3/186



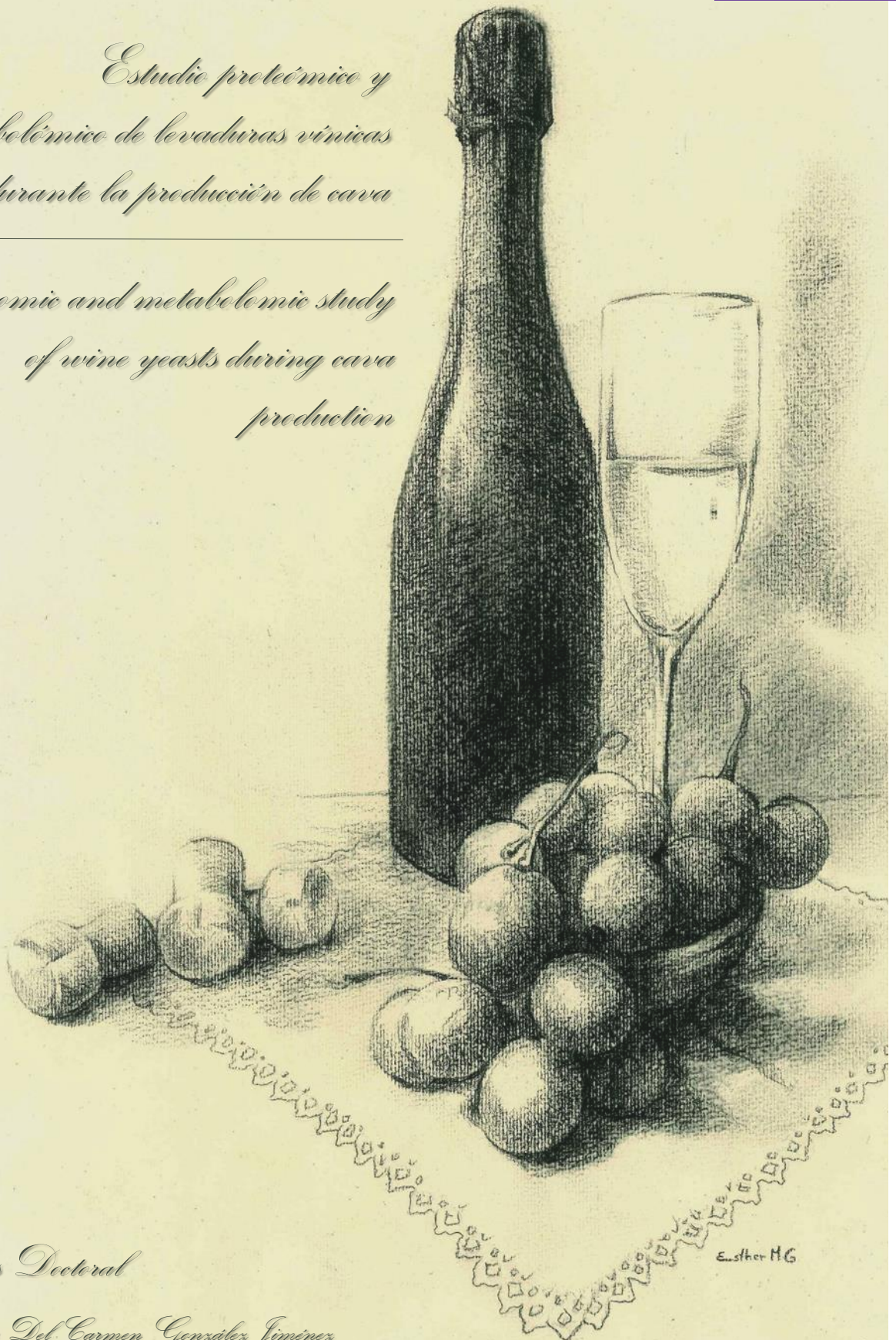
Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
21/12/2020 00:52
2020086579

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	4/186



*Estudio proteómico y  
metabólico de levaduras vinicas  
durante la producción de cava*

*Proteomic and metabolomic study  
of wine yeasts during cava  
production*



*Tesis Doctoral*

*Maria Del Carmen González Jiménez*

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	5/186



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
21/12/2020 00:52
2020086579

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	6/186



*“– ¿Qué te parece desto, Sancho? – dijo Don Quijote –  
Bien podrán los encantadores quitarme la ventura,  
pero el esfuerzo y el ánimo será imposible.”*

*Segunda Parte del Ingenioso Hidalgo*

*Don Quijote de la Mancha*

*Miguel de Cervantes*

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	7/186





Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
21/12/2020 00:52
2020086579

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	8/186



### ***Agradecimientos***

*Al final llegó el día. Parecía imposible. Echando la vista atrás, esta Tesis es una historia de pequeños momentos que me han unido a personas increíbles a las que quiero agradecer haber estado ahí. Durante todo este camino, he tenido momentos muy buenos, pero también ha habido momentos complicados. Gracias a ellos, he crecido a nivel personal y profesional.*

*No es fácil que una tesis sin beca salga adelante. Por esta razón, en primer lugar, quiero agradecer a mis directores, la Dra. Teresa García Martínez y el Dr. Juan Carlos García Mauricio, el haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, por su ayuda, dedicación y apoyo incondicional. Sin ellos, nada de esto hubiese sido posible. Gracias por confiar en mí.*

*Al Dr. Juan José Moreno Vigara, responsable del grupo de investigación “Viticultura y Enología, Vitenol” por su asesoramiento y apoyo en todo momento.*

*A la Dra. Anna Puig-Pujol, perteneciente al Departamento de Investigaciones Enológicas, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias - Instituto Catalán de la Viña y el Vino (IRTA-INCAVI), por su colaboración en este proyecto de Tesis Doctoral.*

*A la Universidad de Córdoba, al programa de doctorado “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”, al grupo de investigación “Viticultura y Enología (Vitenol)” y a los miembros del Departamento de Microbiología por aceptarme como estudiante de posgrado y su colaboración en este trabajo. En especial a los profesores M<sup>a</sup> Carmen Millán y Rafael Peinado y al personal técnico de laboratorio (M<sup>a</sup> Carmen Fernández) por su compañía y su disposición para ayudar en cualquier momento.*

*A las diferentes instituciones y entidades necesarias para la financiación de los trabajos de investigación que componen esta Tesis Doctoral: al Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3) por la ayuda recibida para la realización de la estancia de tres meses en un centro de investigación europeo, al XXIII Programa Propio de Fomento de la Investigación (SINERGIAS, Ref XXIII. PP Mod 4.2), al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba y al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, Grant No. RTA2014-00016-C03-03).*

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	9/186



*A la Dra. Marilena Budroni, del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Sassari, (Sassari, Cerdeña, Italia), por su magnífica acogida, por su dedicación y, sobre todo, por su apoyo en todo momento tanto dentro como fuera de la Universidad. A los Drs. Severino Zara, Giacomo Zara e Ilaria Mannazzu, así como, a los miembros del Departamento Chiara, Angela, Francesco, Gavino y Nadine, por su ayuda y por hacerme sentir como un miembro más del grupo.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología y Química Agrícola; en particular, a Jaime, Minami, Irene, Juanje, Nuria, Silvia y Rafa Martínez, por toda su ayuda prestada, pero especialmente por, todos los grandes momentos que hemos pasado juntos y por todos esos ratos de risas. Una mención especial a mi compañero de Tesis, Juan Antonio, con el que he compartido toda esta etapa, en la cual nos hemos ayudado y apoyado mutuamente. Todos y cada uno de vosotros sois especiales y únicos, lo cual os hace maravillosos. Gracias por todo, me llevo grandes amistades.*

*Por último, y no menos importante, quiero agradecer a mi familia, en especial, a mis padres Manuel y M<sup>a</sup> Carmen y a mi hermana Araceli, por su apoyo incondicional durante todo este largo camino, por transmitirme las ganas y fuerzas necesarias en los momentos difíciles, pero principalmente, por vuestro amor incondicional. Sin vosotros nada de esto sería posible. Gracias por estar siempre a mi lado. A mi pareja Fran, que ha estado siempre ahí cuando lo necesitaba, por su apoyo y comprensión, su alegría, su cariño y sus abrazos. Sin ti no hubiese sido lo mismo. A toda mi "Mojipandy" por enseñarme la importancia de las pequeñas cosas, porque con ellos, el camino es mejor. A Mercedes, Paco y Esther (mi artista favorita), por toda la ayuda recibida durante estos años y sus palabras de ánimo.*

*¡MUCHAS GRACIAS a todos y cada uno de los que me han acompañado y ayudado durante esta etapa!*

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	10/186



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1 <i>Antecedentes históricos de los vinos espumosos</i> .....	7
1.2 <i>Definición y tipos de vinos espumosos</i> .....	10
1.3 <i>Métodos de elaboración de vinos espumosos</i> .....	11
1.3.1 <i>Método tradicional de elaboración</i> .....	12
1.4 <i>Microbiología del vino espumoso</i> .....	17
1.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
1.4.2 <i>Cinética de crecimiento durante la fermentación alcohólica</i> .....	20
1.4.3 <i>Levaduras de velo de flor</i> .....	23
1.4.4 <i>Proceso autolítico de las levaduras</i> .....	26
1.4.5 <i>Fermentación alcohólica</i> .....	28
1.5 <i>Características organolépticas de los vinos espumosos</i> .....	31
1.5.1 <i>Compuestos responsables del aroma en el vino</i> .....	33
1.6 <i>Disciplinas Biómicas en Enología</i> .....	45
1.6.1 <i>Genómica</i> .....	47
1.6.2 <i>Transcriptómica</i> .....	47
1.6.3 <i>Proteómica</i> .....	48
1.6.4 <i>Metabolómica</i> .....	51
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	56
2.1 <i>Justificación de la Tesis Doctoral</i> .....	56
2.2 <i>Objetivos</i> .....	57
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	61
3.1 <i>Microorganismos</i> .....	61
3.2 <i>Medios de cultivo</i> .....	61
3.3 <i>Experimentación y condiciones de estudio</i> .....	62
3.4 <i>Análisis proteómico</i> .....	63
3.4.1 <i>Extracción de proteínas</i> .....	63
3.4.2 <i>Separación e identificación de proteínas</i> .....	64
3.4.3 <i>Contenido proteico</i> .....	66
3.4.4 <i>Tratamiento proteómico. Filtrados en distintas bases de datos</i> .....	66
3.5 <i>Análisis metabólico</i> .....	67
3.5.1 <i>Determinaciones de parámetros enológicos y de color</i> .....	67

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	11/186



3.5.2	<i>Análisis de metabolitos volátiles</i> .....	67
3.5.2.1	<i>Determinación de compuestos volátiles mayoritarios y polioles</i> .....	68
3.5.2.2	<i>Determinación de compuestos volátiles minoritarios</i> .....	68
3.5.2.3	<i>Determinación y cuantificación de aminoácidos</i> .....	70
3.6	<i>Análisis estadístico</i> .....	71
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>73</b>
4.1	<i>Capítulo I. Estudio del flujo de los compuestos del carbono en levaduras vínicas y de las enzimas implicadas durante la producción de cava.</i> .....	73
4.2	<i>Capítulo II. Identificación de las proteínas implicadas en el metabolismo de los compuestos del aroma durante la producción de cava.</i> .....	75
4.3	<i>Capítulo III. Comparativa de los procesos biológicos más importantes afectados por la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en Saccharomyces cerevisiae durante la segunda fermentación.</i> .....	76
<b>5.</b>	<b>INFORME CON EL FACTOR DE IMPACTO Y CUARTIL DEL JOURNAL CITATION REPORTS (JCR)</b> .....	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>89</b>
	<b>ANEXO I. MOVILIDAD INTERNACIONAL</b> .....	<b>114</b>
	<b>ANEXO II. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS</b> .....	<b>120</b>
1.	<i>Publicaciones Nacionales no Indexadas</i> .....	120
2.	<i>Presentaciones de Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales</i> .....	121

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	12/186



## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Producción mundial de vino espumoso (OIV, 2020). .....	9
<b>Figura 2.</b> Etapas más relevantes del proceso de elaboración de Cava por el método tradicional. ....	16
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado del ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	21
<b>Figura 4.</b> Ciclo de crecimiento de las levaduras (Figura adaptada de Moreno-Arribas y Polo, 2009). ....	23
<b>Figura 5.</b> Cinética típica de la degradación de glucosa y fructosa y de la producción de etanol durante la fermentación alcohólica (Rodicio y Heinisch, 2017). ....	30
<b>Figura 6.</b> Esquema de la fermentación alcohólica y gliceropirúvica. Síntesis de compuestos volátiles que contribuyen a las propiedades organolépticas del vino. ....	31
<b>Figura 7.</b> Esquema de la síntesis de compuestos aromáticos por la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bothelo, 2008). ....	34
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de las rutas de formación de los alcoholes superiores por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	37
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de las rutas de formación de los ésteres por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	39
<b>Figura 10.</b> Ruta de biosíntesis de la melatonina en levaduras. L-Trp (triptófano), Trp (triptamina), 5OH-Trp (5-hidroxitriptófano), Ser (serina), NAS (N-acetilserotonina), 5MT (5-metoxitriptamina). Los números indican las diferentes etapas de la ruta: 1. Descarboxilación del triptófano; 2. Hidroxilación de triptamina; 3. Descarboxilación de 5-hidroxitriptófano; 4. Carboxilación de 5-hidroxitriptófano; 5. Serotonina N-acetilación; 6. N-acetilserotonina O-metilación; 7. N-acetilserotonina O-desmetilación; 8. Serotonina O-metilación; 9. N-acetilación de 5-metoxitriptamina; 10. Desacetilación de melatonina. (Muñiz-Calvo et al., 2019). ....	115
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de la región del gen ARNr amplificado por PCR usando los cebadores ITS1 e ITS4 (espaciador transcrito interno, ITS). ....	116

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	13/186



## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de los medios de cultivo utilizados. ....	61
<b>Tabla 2.</b> Programa de gradiente empleado en el HPLC para la detección de aminoácidos en el vino.....	70
<b>Tabla 3.</b> Informe de las publicaciones científicas como primer autor.....	79

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	14/186



## ABREVIATURAS

2D-PAGE	Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis
AATasa	Alcohol-O-acetyl/acyltransferase
ADH	Alcohol dehydrogenase
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate
ATP	Adenosine TriPhosphate
CE	Capillary Electrophoresis
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CID	Collision-Induced Dissociation
CoA	Coenzyme A
CWP	Cell Wall protein
DOP	Denominación de Origen Protegida
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	ElectroSpray Ionization
FID	Flame Ionization Detector
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FWHM	Full-Width Half-Maximum
GC	Gas Chromatography
GO	Gene Ontology
GOC	Genetic Ontology Consortium
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> S	Hydrogen sulfide
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfuric acid
HCD	Higher Energy Collision-Induced Dissociation
HCl	Hydrochloric acid
HG	Homogeneous Groups

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	15/186





HPLC	High-Performance Liquid chromatography
IEF	IsoElectric Focusing
InDel	"Insertion or deletion" contraction
IPG	Immobilized pH Gradient
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC	Liquid Chromatography
LIT	Linear Ion Trap
LRI	Linear Retention Index
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinases
MDLC	Multidimensional Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nicotin Adenine Dinucleotide
NGS	Next Generation Sequencing
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OPA	Orthophthaldehyde
ORF	Open Reading Frame
PDC	Pyruvate decarboxylase
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEF	Pulsed Electric Fields
pI	Isoelectric Point
PKA	protein kinase A
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SBSE-TD-GC-MS	Stir Bar Sorptive Extraction - Thermal Desorption - Gas Chromatography - Mass Spectrometry
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	16/186



SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SO <sub>2</sub>	Sulfur dioxide
TDU	Thermal Desorption Unit
TOF	Time Of Flight
UFC	Unidad formadora de colonias
UPR	Unfolded Protein Response

---

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	17/186



## RESUMEN

El vino espumoso elaborado por el método tradicional o *Champenoise* implica dos fermentaciones consecutivas. La primera fermentación es aquella en la que el mosto de uva se transforma en vino base y, tras su elaboración, tiene lugar la ‘toma de espuma’, durante la cual se desarrolla la segunda fermentación y la autólisis de las levaduras. Esta segunda fermentación consiste en el llenado de las botellas con vino base y el ‘licor de tiraje’, compuesto por levaduras, azúcar y bentonita, todo ello en botella cerrada. Este último proceso fermentativo se continúa con un período prolongado de envejecimiento del vino en contacto con las lías de levadura en una zona oscura y fresca de la bodega.

Durante todo el proceso de elaboración del vino, las levaduras deben ser capaces de soportar numerosos factores de estrés, como un elevado contenido en etanol, falta de nutrientes, baja temperatura y sobrepresión de CO<sub>2</sub> endógeno, entre otros. Las levaduras modifican su metabolismo celular según las condiciones ambientales, por lo que en el proceso de elaboración de cava se consigue mantener la viabilidad y asegurar su éxito. De este modo, una mejor comprensión del metabolismo de las levaduras, su adaptación y su comportamiento en las condiciones típicas de la segunda fermentación son necesarias para el proceso de selección de cepas y su aplicación en la industria del vino, y puede ser interesante para el control de la calidad y la mejora del proceso de vinificación.

La influencia de las levaduras sobre las características organolépticas del vino es un factor biótico clave ya que, por un lado, éstas afectan a la calidad de la uva; y por otro, son capaces de producir gran cantidad de compuestos que contribuyen a estas características y, en definitiva, a su calidad. En general, el mayor porcentaje de la composición aromática total del vino está representado por compuestos volátiles derivados del metabolismo de las levaduras. Durante la fermentación, las levaduras producen etanol y dióxido de carbono, además de muchos otros metabolitos importantes, como son glicerol y ácido acético y cientos de compuestos aromáticos activos, entre los que se incluyen alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, ácidos grasos volátiles y compuestos de carbonilo. Como consecuencia, cada cepa produce un perfil aromático fermentativo diferente de compuestos volátiles, incluso cuando se utilice el mismo mosto de uva.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el metabolismo celular de dos cepas de levadura industriales, *Saccharomyces cerevisiae* P29 y G1, durante la segunda

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	18/186



fermentación en la elaboración de vino espumoso. La cepa P29 se usa convencionalmente en la elaboración de vinos espumosos procedente de la Denominación de Origen Vilafranca del Penedès (Barcelona, España), mientras que la cepa G1 es una levadura formadora de velo de flor responsable de la crianza biológica de los vinos finos de la Denominación de Origen Montilla-Moriles (Córdoba, España). El empleo de levaduras no convencionales se ha convertido en una tendencia actual muy interesante en la industria del vino. Debido a la capacidad de esta levadura para soportar altas concentraciones de etanol, el uso de una levadura de velo de flor para la elaboración de vino espumoso supone una novedosa ventaja para la industria del vino. Además, las cepas de levadura de velo de flor poseen características distintivas en comparación con otras cepas fermentativas de *S. cerevisiae*, como su capacidad para formar una biopelícula en la interfaz aire-líquido del vino. Estas propiedades adhesivas celulares permitirían a los enólogos eliminar fácilmente las levaduras y sedimentos en la “fase de degüelle” durante la elaboración del Cava por el método tradicional. Esto conlleva reducir los costes y el tiempo de producción, lo que implica un importante paso adelante en la industria del vino espumoso. Al mismo tiempo, mitiga la situación actual de baja diversidad de levaduras disponibles comercialmente para la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional.

Ambos tipos de cepas presentaron una cinética de fermentación similar. Sin embargo, mostraron diferencias en su metabolismo celular a nivel de proteoma. Estas diferencias son debidas a una adaptación de la cepa de velo de flor a condiciones nuevas de estrés. La respuesta proteómica de la cepa de levadura de flor a las condiciones típicas de segunda fermentación se caracterizó por un aumento en el número y contenido de las proteínas implicadas en la formación de compuestos derivados de la fermentación (etanol y glicerol); y un bajo contenido proteico en las proteínas involucradas con la formación de ésteres. Por otro lado, la respuesta metabólica fue bastante similar en ambas cepas. Además, en la levadura flor, fue posible establecer un mayor número de correlaciones significativas entre ésteres y proteínas durante la segunda fermentación en botella. Por otra parte, el estudio global obtenido de procesos biológicos que tienen lugar durante la segunda fermentación en la levadura convencional mostró una mayor representación de procesos biológicos relacionados con la traducción de proteínas, probablemente en respuesta al estrés causado por las duras condiciones de fermentación.

Los resultados obtenidos junto con las propiedades enológicas de capacidad de adhesión y de tolerancia a elevadas concentraciones de etanol, convierten a la cepa G1 en

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	19/186



una candidata muy interesante para la mejora de la calidad y producción de los vinos espumosos.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	20/186



## ABSTRACT

Sparkling wine made by the traditional method, also named Champenoise, involves two consecutive fermentations. It is in the first fermentation where the must is transformed into base wine and, after its elaboration, the “*toma de espuma*” takes place. During this stage, the second fermentation and the autolysis of the yeasts happen. This second fermentation consists of filling the bottles with base wine and the “*tirage*” liquor, composed of yeast, sugar and bentonite, all in a closed bottle. This last fermentation process is continued with a prolonged period of aging the wine in contact with the yeast lees in a dark and cool area of the cellar.

Throughout the winemaking process, yeasts must be able to withstand numerous stress factors such as high ethanol content, lack of nutrients, low temperature and endogenous CO<sub>2</sub> overpressure, among others. To maintain viability and ensure the success of this process, yeast modifies its cellular metabolism. Therefore, a better understanding of the yeast metabolism, its adaptation and its behavior in the typical conditions of the second fermentation is necessary for the process of strain selection and the improvement of its application in the wine industry. Furthermore, they can be interesting for the quality control and the improvement of the winemaking process.

The influence of yeasts on the organoleptic characteristics of wine is a key biotic factor since, on the one hand, they affect the quality of the grape, and on the other, they are capable of producing a large number of compounds that contribute to these characteristics and, ultimately, to its quality. In general, the highest percentage of the total aromatic composition of wine is represented by volatile compounds derived from yeast metabolism. During fermentation, yeast produces ethanol and carbon dioxide, as well as many other important metabolites, such as glycerol, acetic acid and hundreds of active aromatic compounds, including higher alcohols, esters, aldehydes, organic acids, volatile fatty acids and carbonyl compounds. As a result, each strain produces a different fermentation aroma profile of volatile compounds, even when the same grape must is used.

In this doctoral thesis, the cell metabolism of two industrial yeast strains, *Saccharomyces cerevisiae* P29 and G1, during the second fermentation in the production of sparkling wine has been studied. The P29 strain is conventionally used in the

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	21/186




production of sparkling wines, while the G1 strain is a flor veil forming yeast responsible for the biological aging of fine wines from the Montilla-Moriles Denomination of Origin (Córdoba, Spain). The application of non-conventional yeasts has become a very interesting current trend in the wine industry. Due to the capability of this yeast to support high concentrations of ethanol, the use of a flor veil yeast for the production of sparkling wine is a new advantage for the wine industry. In addition, flor yeast strains possess distinctive characteristics compared to other *S. cerevisiae* fermentation strains, such as their ability to form a biofilm at the air-liquid interface of the wine. These cellular adhesive properties would allow winemakers to easily remove yeasts and sediments in the “degüelle” phase during the production of Cava by the traditional method. This will reduce costs and production time, which is a major step forward in the sparkling wine industry. At the same time, it mitigates the current situation of the low diversity of commercially available yeasts for the production of sparkling wines by the traditional method.

Both types of strains had similar fermentation kinetics; however, they showed differences in their cell metabolism at the proteome level. These differences are due to an adaptation of the flor strain to new stress conditions. The proteomic response of the flor yeast strain to typical secondary fermentation conditions was characterized by an increase in the number and content of proteins involved in the formation of fermentation-derived compounds (ethanol and glycerol); and low protein content in the proteins involved in ester formation. On the other hand, the metabolomic response was quite similar in both strains. Furthermore, in the flor yeast, it was possible to establish a greater number of significant correlations between esters and proteins during the second fermentation in the bottle. On the other hand, the overall study obtained from biological processes taking place during the second fermentation in conventional yeast showed a greater representation of biological processes related to protein translation, probably in response to stress caused by the harsh fermentation conditions.


The results obtained, together with the oenological properties of adhesion capability and tolerance to high concentrations of ethanol, make the G1 strain a very interesting candidate for improving the quality and production of sparkling wines.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	22/186



# INTRODUCCIÓN

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	23/186





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos de los vinos espumosos

El origen de los vinos se remonta al antiguo y nuevo testamento (Libro de Proverbios 23:31 y 9:17, respectivamente) (Bullock *et al.*, 1998). La invención de los vinos espumosos se ha atribuido al monje francés Dom Pierre Pérignon, ya que fue el primero en la región en dar un enfoque empírico pero razonado sobre la elaboración de los vinos (Bonal, 1995), y fue el *procureur* de la abadía de Hautvilles hasta su muerte en 1715. Se dedicaba a la producción de vino a partir de un viñedo propio de diez hectáreas, pero también recibía diezmos de uvas de terrenos circundantes. Dom Pérignon se propuso obtener un vino blanco excepcional mediante el embotellamiento de ese vino sin que la fermentación hubiese concluido. El objetivo de esta manera de elaboración era poder beber el vino fuera de la bodega y conseguir una mayor duración hasta la siguiente cosecha (Peñín, 2008). También, se le atribuyó la autoría del libro: “*The art of tending vineyards and the wines of Champagne*”. Este libro se publicó tres meses después de su muerte por Canon Godinot. Consiste en un tratado de normas sobre cómo vendimiar para obtener un vino con un color blanco inmejorable a partir de la variedad de uva *Pinot Noir*. Además, proporciona consejos sobre cómo podar el viñedo o la necesidad de seleccionar la uva separando los granos putrefactos de los sanos. En esta obra también se muestra una clasificación de los viñedos de acuerdo con la calidad de sus uvas y se recomendó la vinificación independiente, práctica que aún en la actualidad, se sigue manteniendo. Durante el siglo XVII, el vino de *Champagne* se consumió en la corte del rey francés, Louis XIV, conocido como “Rey Sol”. A partir de ahí, el vino se fue introduciendo en la corte francesa e inglesa como ‘vino para la aristocracia’. Hasta el siglo XVIII, estos vinos espumosos se transportaban en barriles hasta Inglaterra, allí se embotellaban en botellas de vidrio ahumado para hacerlas más resistentes a la presión ejercida por el dióxido de carbono. Al principio, las burbujas presentes en el vino suponían un inconveniente, pero años después, estas burbujas llegaron a representar un signo de personalidad y elegancia, a pesar de la presencia de escamas y del aspecto blanquecino debido a las lías de la segunda fermentación (Díaz de Mendívil *et al.*, 1999).

La evolución en la elaboración de los vinos espumosos estuvo marcada por la creación de las primeras *maisons de champagne* en el siglo XVIII. Esto supuso un primer paso hacia la obtención de una mayor calidad para los vinos. Además, es en este siglo cuando tienen lugar grandes descubrimientos científicos como es el caso de Lavoisier, el

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	24/186



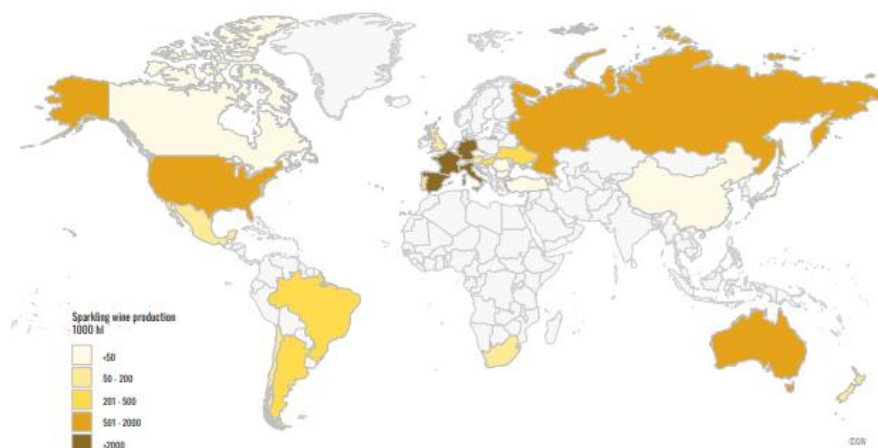
primero en comprender el fenómeno de la fermentación. Trabajo completado por Gay-Lussac, quien escribió la ecuación de esa reacción y construyó un alcoholímetro para poder medir el grado alcohólico de las bebidas espirituosas.

No fue hasta el siglo XIX cuando Jean-Baptiste François estableció la relación entre la cantidad de azúcar presente en un vino en botella y la presión de gas carbónico en su interior, como consecuencia de su interés por el gran número de problemas encontrados durante la elaboración de estos vinos causadas por las explosiones en las botellas debidas a la presión o a la falta de azúcar necesario para el buen desarrollo de la fermentación (Duteurtre, 2010). Otro factor clave fue la invención de los pupitres con agujeros con la dimensión de las botellas de forma oblicua por parte de Nicole-Barbe Ponsardin, dando lugar a la aparición de la etapa de removido y de degüelle para la eliminación de la opacidad blanquecina. Al principio se colocaban en estado horizontal y se les giraban ligeramente a diario con un octavo de vuelta hasta llegar a una posición cada vez más vertical, para conducir la nubosidad acumulada cerca del corcho de la botella. De esta manera, al quitar el tapón, las lías se dirigen al exterior de la botella, y el vino adquiriría un aspecto limpio y un color amarillo brillante (Olavarrieta, 1995; Buxaderas y López-Tamames, 2012).

En los últimos veinte años, el mercado del vino espumoso se ha expandido de manera muy rápida a consecuencia de la alta demanda global. La producción de vino espumoso se encuentra concentrada en determinadas zonas. Casi la mitad del volumen total producido en 2018 proviene de Italia (27%), Francia (22%), Alemania (14%) y España (11%), Figura 1. Destacan *Spumante* en Italia, *Champagne* en Francia, *Sekt* en Alemania, *Cava* en España y *Cap Clasique* en Sudáfrica. Todos presentan una característica común, el origen endógeno o natural del gas carbónico.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	25/186





**Figura 1.** Producción mundial de vino espumoso (OIV, 2020).

En España, el origen del Cava se encuentra asociado a la vitivinicultura catalana de mediados del siglo XIX. Su aparición comienza como imitación de los vinos espumosos elaborados en Francia y su consumo pertenecía a un ambiente elitista. Hay evidencia de cuatro botellas de champán que se almacenaron en la bodega real durante el reinado de Fernando VII. Sin embargo, estos vinos no se introdujeron en la corte española hasta el reinado de Amadeo I de Saboya, que atendió al gusto de la nobleza italiana en 1871 (Olavarrieta, 1995). Fue en 1879 cuando aparecieron las primeras botellas de vino espumoso español en Barcelona y suministradas por Josep Raventós en la región del Penedès. Esta región se considera el lugar de nacimiento del vino espumoso español, denominado ‘Cava’. Es en este siglo cuando varias familias de Sant Sadurní d’Anoia comenzaron a elaborar según el método tradicional este tipo de vino con cultivos de la zona. De esta manera nació el Cava con una identidad propia y distinta de cualquier otro vino espumoso de calidad. En los años 20, el Cava se afianzó en el mercado español alcanzando su mayor crecimiento en los años 60 y no fue hasta la década de los 80 cuando se consolidó internacionalmente. Hoy es uno de los sectores vitivinícolas más dinámicos y prósperos de la vitivinicultura. Aunque su producción es menor en comparación con los vinos tranquilos, el impacto económico para la industria enológica es muy importante (más del 95% de la producción es catalana).

En 2018, la producción de vino espumoso en España aumentó a 2.1 mhL, siendo el Cava el tipo de vino espumoso más producido en el país, representando el 89% del volumen total producido. En ese mismo año se vendieron más de 90 millones de botellas

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	26/186



en España. En cuanto a las exportaciones, la mayor parte del vino espumoso producido en España se vende al extranjero (88% en 2018), llegando a ser el tercer exportador por detrás de Francia, con 1.8 mhL. Los principales destinos fueron Bélgica, Alemania y Estados Unidos. Datos proporcionados por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Cava, OIV (2020) (<http://www.doCava.es/>).

### ***1.2 Definición y tipos de vinos espumosos***

Según la Orden del 27 de Julio de 1972 (B.O.E. número 189, de 8 de agosto de 1972) por la que se reglamentan los vinos espumosos naturales y los vinos gasificados, se definen los vinos espumosos como “aquellos vinos procedentes de uvas de variedades adecuadas, que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico de origen endógeno y que al ser descorchada la botella y escanciado el vino, forma espuma de sensible persistencia, seguida de un desprendimiento continuo de burbujas. El gas carbónico habrá de proceder de una segunda fermentación, realizada en envase herméticamente cerrado, de azúcares naturales del vino base o azúcares agregados y el producto terminado deberá tener una presión mínima de cuatro atmósferas, medida a 20°C”.

La selección de la variedad de uva para la elaboración del vino espumoso debe hacerse de forma minuciosa y teniendo en cuenta factores como: el clima, la formación de espuma, la composición del vino base (niveles de azúcar, acidez y pH), la capacidad de envejecimiento y el estilo del vino. Gracias a la gran diversidad de climas, suelos y variedades de uvas en las zonas de producción, los vinos espumosos obtenidos presentan diferentes estilos y características, por lo que se diferencian según su color (la gran mayoría de los vinos espumosos son blancos, aunque también, se pueden encontrar algunos tintos o rosados), el nivel de azúcar residual, la cantidad de dióxido de carbono disuelto y la presión a la que se encuentra disuelto dicho gas.

Los vinos espumosos se denominan en función de su contenido en azúcares en:

- Brut Nature: hasta 3 g/L (sin azúcar añadido)
- Extra Brut: hasta 6 g/L
- Brut: hasta 12 g/L
- Extra Seco: entre 12 y 17 g/L
- Seco: entre 17 a 32 g/L
- Semi-Seco: entre 32 a 50 g/L
- Dulce: más de 50 g/L

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	27/186



### 1.3 Métodos de elaboración de vinos espumosos

La calidad y el precio dependen, en gran medida, del método de elaboración utilizado. Todos comparten una característica común que es la realización de dos fermentaciones consecutivas. Existen 6 métodos de elaboración:

*Método ancestral:* fue el precursor del primer método desarrollado para la elaboración de vinos espumosos, probablemente, del método tradicional. Este método no presenta una segunda fermentación como tal, sino una continuación de la primera fermentación ya que el vino se embotella antes de que ésta haya finalizado. Además, tiene lugar sin la adición de azúcar, es decir, sin licor de tiraje, ni de expedición. El proceso se detiene simplemente eliminando las levaduras, el sedimento es tan insignificante que no hay fase de degüelle. Los vinos espumosos más famosos elaborados a partir de este método son franceses, el *Bugey* (mínimo dos meses en botella) y el *Ayze*.

*Método Champenoise o tradicional:* es el más utilizado, en el que la segunda fermentación y envejecimiento del vino tiene lugar en la misma botella. En España, el vino espumoso más famoso elaborado con este método es el Cava, cuyo período de envejecimiento ha de ser como mínimo de 9 meses. En Francia, el *Champagne*, su período de crianza debe ser como mínimo de 15 meses entre el tiraje y el degüelle o el *Champagne Millesimé* con un mínimo de 3 años después de la fecha de vendimia. En Italia, destacan el *Spumante Classico* y el *Astis*.

*Método transfer:* fue inventado en Alemania. El vino base se elabora siguiendo las técnicas tradicionales y la segunda fermentación sucede en una botella, pero no en la que posteriormente se va a comercializar. Una vez ha acabado la segunda fermentación en botella, el vino se transfiere a un tanque para su filtrado y, posteriormente, se trasvasa a otra botella para su taponado y etiquetado final. Para el embotellado de estos formatos, menores a la media botella y superiores al jéroboam (o doble magnum), se utiliza un tanque relleno con vino espumoso obtenido, tras el degüelle, desde botellas estándar. A pesar de ser un método difícil de controlar, aún se realiza en Francia, bajo las denominaciones *Limoux*, *Gaillac*, *Bugey* y *Cerdon* y, sobre todo, en Australia. Las etiquetas de estos vinos deben incluir la frase «fermentado naturalmente en botella».

*Método Granvás o tanque cerrado:* este método se originó en la segunda mitad del siglo XIX y aunque ha sido en varias ocasiones modificado y perfeccionado, se puso a punto en 1907 por Jean-Eugène Charvat. Este método comprende ocho fases sucesivas. En primer lugar, el vino se deposita en un tanque sellado a 20°C de 12 a 16 horas. A

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	28/186



continuación, el vino se trasvasa a otro tanque donde se le añade azúcar y levadura, se deja fermentar durante un intervalo de 10 a 15 días. Por último, el vino se traslada a otro tanque donde se clarifica mediante refrigeración a 2°C, se filtra a contrapresión y se embotella. La segunda fermentación ocurre en grandes tanques antes del filtrado y del embotellamiento a presión. Según este método, han de transcurrir un mínimo de 21 días desde la inoculación de las levaduras hasta su comercialización. Se trata de un método de producción a granel, en el que se usan vinos base de calidad media y se persigue un rendimiento rápido. Esto permite elaborar vinos de precio inferior y aunque pueden poseer una cierta calidad, una vez son servidos pierden rápidamente la espuma. Este método es el utilizado para la elaboración de vinos espumosos dulces como *Asti* y *proseccos* italianos, en los cuales el método se prolonga más días y el vino elaborado se denomina “*charmat lungo*”.

*Método continuo o ruso*: la elaboración del vino base se realiza siguiendo las técnicas clásicas de vinificación de los vinos blancos, rosados o tintos. Emplea una serie de tanques presurizados interconectados por los que se hace circular el vino de forma continua para su fermentación. En el interior de estos tanques hay anillas o virutas de roble, las cuales recogen las células de levadura muertas, el vino queda a su salida efervescente y espumoso y, además, contiene sólo una pequeña cantidad de levaduras muertas. Tras la fase de toma de espuma tiene lugar una fase de enfriamiento y estabilización del CO<sub>2</sub>. Por último, el vino se almacena en un tanque tamponador y se embotella a contrapresión.

*Gasificación*: se trata del método más económico. El vino base se elabora siguiendo las técnicas habituales de vinificación de los vinos blancos. La diferencia es que los vinos elaborados con este método no sufren una segunda fermentación, se le inyecta dióxido de carbono exógeno una vez que el vino ha sido estabilizado y enfriado a -2°C. Estos tipos de vinos son típicos en Francia, en las regiones de Bugey, Cerdon y del valle del Loira. Se denominan vino de aguja en castellano, *vi de perla* en catalán, *vin pétillant* en Francia, *vino frizzente* en Italia, *viho risante* en Portugal, *perl wein* en Alemania y *pearl wine* en inglés.

### 1.3.1 Método tradicional de elaboración

El método tradicional es el más costoso para llevar a cabo la elaboración de vinos espumosos; sin embargo, es el más apreciado y valorado por su calidad. Los vinos espumosos más conocidos elaborados que siguen este método son el *Champagne* y los

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	29/186



diversos *Crémant* de Francia, Cava y Espumosos de La Rioja en España y *Trento* en Italia o *Cap Classique* en Sudáfrica, entre otros.

Así pues, el Cava corresponde a un vino espumoso que se produce a partir de variedades de uva blancas como Macabeo o Viura, Xarel.lo, Parellada, Chardonnay, Malvasía Riojana o Subirat Parent. Mientras que, para la elaboración de vinos espumosos rosados, las variedades de uva autorizadas son Monastrell, Pinot-noir, Garnacha y Trepat.

Para la elaboración del vino base se han de seguir las normas generales establecidas en el B.O.E para la elaboración de vinos blancos o rosados. Estos vinos han de presentar una graduación alcohólica moderada, esto permitirá que la fase de toma de espuma sea adecuada y una acidez relativamente elevada, lo cual proporcionará sensación de frescura en la boca.

La elaboración del Cava según el método tradicional se lleva a cabo en dos fases principales, que incluyen dos procesos de fermentación consecutivos y un posterior envejecimiento en contacto con las lías.

La primera fermentación se realiza en grandes depósitos, donde se obtiene un vino base con un especial control de la temperatura (18 a 20°C), que debe ser baja para evitar que se produzca la fermentación del mosto de manera descontrolada, ya que se perderían aromas y se producirían otros que no son los deseados; y para potenciar el mayor número posible de aromas primarios. A continuación, se realizan los trasiegos, clarificaciones y mezclas adecuadas para la obtención del vino base.

De acuerdo con la legislación vigente, los vinos base para el Cava han de cumplir las siguientes características analíticas (<http://www.doCava.es/>):

- graduación alcohólica comprendida entre 9.5 y 11.5 % (v/v)
- un mínimo de acidez total de 5.5 g/L en ácido tartárico y 3.5-6 g/L en ácido sulfúrico
- una acidez volátil inferior a 0.60 g/L en ácido acético
- una concentración de anhídrido sulfuroso total inferior a 140 mg/L
- un pH comprendido entre 2.8 y 3.3
- extracto seco no reductor en un intervalo comprendido entre 13 y 22 g/L
- cenizas comprendidas entre 0.70 y 2 g/L

Finalizada la elaboración del vino base, se procede a la fase de tiraje o toma de espuma, durante la cual ocurrirá la segunda fermentación y la autólisis de las levaduras. La segunda fermentación se induce por el proceso de *tiraje*, que consiste en el llenado de las botellas con vino base y el denominado *licor de tiraje*, compuesto de 1-2 millones de

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	30/186



células de levadura/mL, 500 g/L de sacarosa y entre 0.1 y 0.2 g/L de bentonita, este compuesto ayuda a que la aglutinación de las lías y sustancias adheridas se dirijan al cuello de la botella durante la fase de removido. Debido a que se añaden aproximadamente entre 40 - 42 mL de licor de tiraje por cada 750 mL de vino base, cada botella recibe entre 21 y 24 g de sacarosa (Flanzy *et al.*, 1999). El grado alcohólico depende de la cantidad de azúcar, así como de la presión de dióxido de carbono que suele estar entre 5-6 atm a 20°C (Buxaderas y Lopez-Tamames, 2012).

Una vez el vino base se introduce en las botellas, ya no se le podrá hacer ningún tratamiento. Por lo que, previamente, deberán estar perfectamente limpios y estabilizados frente a precipitaciones tartáricas y proteicas. El cerrado de las botellas se realiza con un obturador de polietileno asegurado por fuera mediante un tapón corona. Posteriormente, estas botellas se almacenan apiladas de forma horizontal, posición conocida como de *rima*. Es en esta posición como se efectúa la segunda fermentación, la fase conocida como *toma de espuma* y el envejecimiento del vino en contacto con las lías. La toma de espuma se desarrolla durante 2 meses a una temperatura comprendida entre 10 y 15°C mientras que la sobrepresión debida al CO<sub>2</sub> endógeno va aumentando.

La segunda fermentación se continúa por un período prolongado de envejecimiento del vino en contacto con las lías de levadura en una zona oscura y fresca de la bodega. Para que en la Unión Europea se pueda legalmente etiquetar como vino espumoso elaborado por el método tradicional, éste ha de estar al menos 9 meses en contacto con las lías de levaduras. La segunda fermentación y crianza se lleva a cabo en botellas cerradas a bajas temperaturas comprendidas entre 12-16°C (Penacho *et al.*, 2012). Durante el envejecimiento, ocurre la autólisis de las levaduras, se liberan al medio unas sustancias conocidas como manoproteínas que proporcionan al vino unos caracteres sensoriales singulares.

Tras el envejecimiento del vino con las lías, las botellas se someten a un proceso de removido. Con este paso, se pretende conseguir que todo el sedimento formado por levaduras, bentonita y sustancias adheridas, debido a la presión del CO<sub>2</sub> endógeno, se dirijan al cuello de la botella. Tradicionalmente, este removido se hacía manualmente girando un octavo de vuelta durante 15 días a la misma vez que se iban inclinando hasta quedar perpendiculares con respecto al suelo; sin embargo, en la actualidad, este proceso se ha mecanizado con giropalets que permiten manipular un mayor número de botellas al mismo tiempo.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	31/186





Por último, el depósito formado se congela y se expulsa de la botella, proceso conocido como *degüelle*. Consiste en sumergir el cuello de la botella en una solución de agua con anticongelante a menos 20 ó 25°C, esto provoca la formación de un tapón de hielo. Seguidamente, se invierte y se le quita el tapón, con lo cual se expulsa dicho depósito de la botella debido a la presión interna. Una vez eliminados los restos de levadura y sustancias, las botellas se rellenan con *licor de expedición*. Este licor de expedición puede ser el propio vino espumoso o puede contener sacarosa, mosto de uva, mosto de uva parcialmente fermentado, mosto de uva concentrado, vino base o una mezcla de todos estos tipos. Además, este licor de expedición es, en base al azúcar que contiene, el que establece la categoría legal del vino espumoso en función del dulzor, ya que todos los vinos son secos cuando finaliza el proceso de fermentación. Por último, las botellas son sometidas a su taponado y etiquetado final.

Una vez finalizado el proceso de elaboración de vinos espumosos, éstos han de cumplir con una serie de características analíticas, como son:

- Graduación alcohólica entre 10.8 y 12.8 % vol
- Acidez total de 3.5 a 6 g/L en ácido sulfúrico
- Acidez volátil menor de 0.8 g/L
- Extracto seco no reductor entre 12 y 20 g/L
- SO<sub>2</sub> libre menor de 20 mg/L y SO<sub>2</sub> total inferior a 170 mg/L
- Presión de CO<sub>2</sub> a 20 °C superior a 4 atm

Un parámetro de calidad de los vinos espumosos elaborados con este método es el tiempo de envejecimiento del vino en contacto con las lías. Para la denominación de Cava, el período de envejecimiento ha de ser como mínimo de 9 meses, y para que el Cava pueda tener la etiqueta de “Reserva”, al menos de 15 meses. Mientras que un Cava Gran Reserva está restringido al Cava del tipo Brut Nature, Extra Brut y Brut, con un período de envejecimiento de 30 meses en la misma bodega.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	32/186



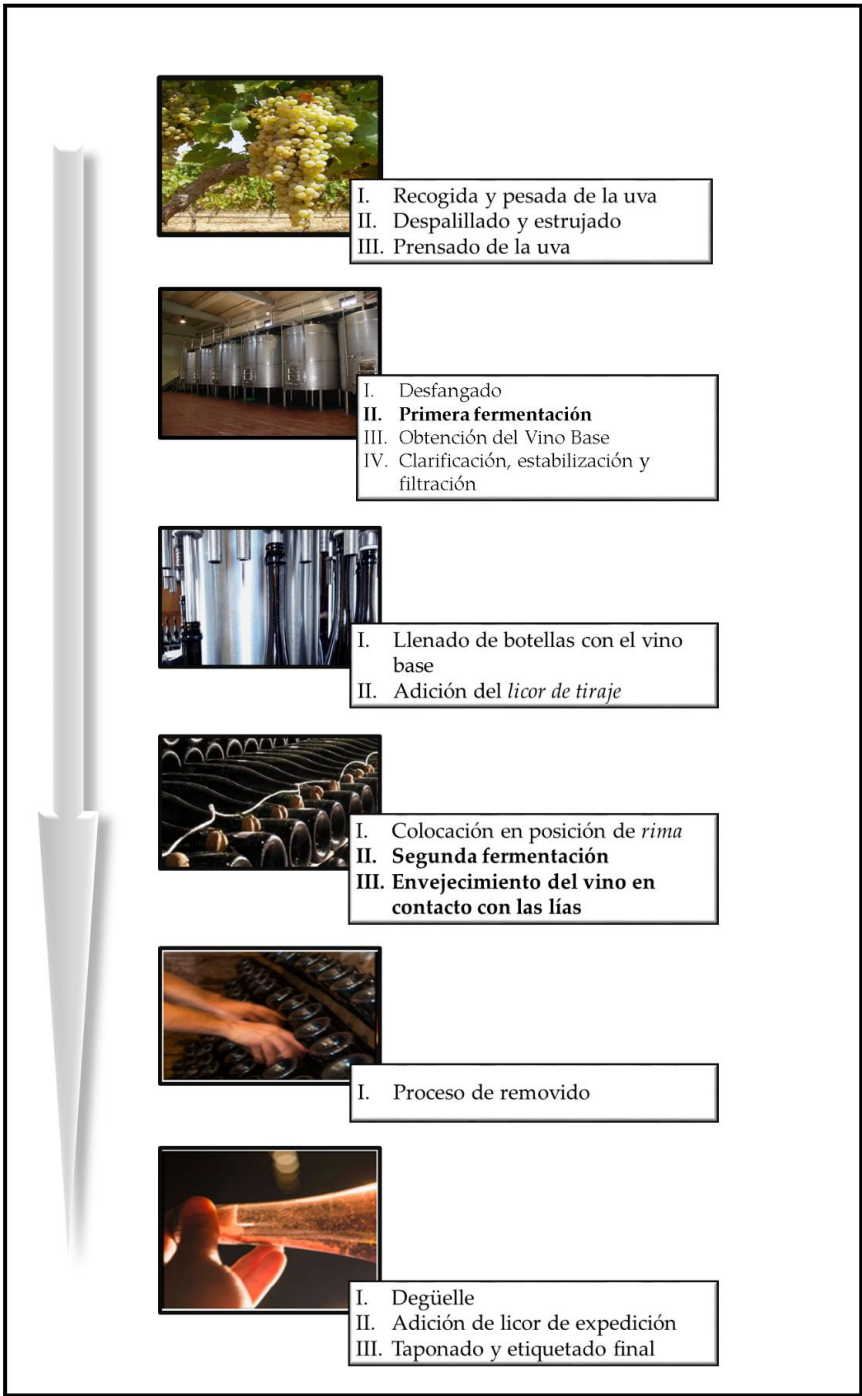


Figura 2. Etapas más relevantes del proceso de elaboración de Cava por el método tradicional.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	33/186



### 1.4 Microbiología del vino espumoso

Desde un punto microbiológico, la fermentación alcohólica es un proceso crucial y complejo que implica numerosos mecanismos físicos, químicos y microbiológicos diferentes. De ahí, que la microbiota del mosto de uva sea heterogénea (Petruzzi *et al.*, 2017), cambia dependiendo de la lluvia, la variedad de uva, la temperatura y otros factores como el suelo, la fertilización, las prácticas vitivinícolas y el riego (Jolly *et al.*, 2014). El mosto de uva está compuesto, principalmente, por levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fugelsang y Edwards, 2007). Sin embargo, los microorganismos principales son las levaduras del género *Saccharomyces*, debido a su elevada eficacia para metabolizar medios con una alta concentración de azúcares y bajo contenido en compuestos nitrogenados (Fugelsang, 1997). Aunque la microbiota mayoritaria sea *Saccharomyces*, no es la única, también han sido aisladas otras especies de levaduras pertenecientes a géneros conocidos como no-*Saccharomyces*, a destacar, *Hanseniaspora* (en la superficie de las uvas), *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, y *Rhodotorula* (Querol y Fleet, 2006). Estas levaduras suelen provocar cambios en las propiedades organolépticas de los vinos causando olores desagradables y turbidez, entre otros.

Todas estas especies tienen éxito secuencialmente durante la fermentación espontánea. Dicha fermentación se inicia por varias especies de levaduras (*Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, entre otras) que se caracterizan por presentar bajo poder alcoholígeno, seguidas de especies de *Candida*, levaduras formadoras de velo como *Pichia*, *Debaryomyces* y, en menor medida, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula minuta* (Fleet, 1993; Pretorius, 2000). Durante los primeros días de fermentación, estas levaduras alcanzan su máximo de población, oscilando entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL. Sin embargo, la mayoría desaparecen durante las siguientes etapas de la fermentación (Fleet *et al.*, 1984; Henick-Kling *et al.*, 1998), y ésta se continúa por levaduras más resistentes y con un mayor poder fermentativo como *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Saccharomyces* (Beltran *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 2006). Durante el transcurso de la fermentación, estos microorganismos se ven afectados por varios estreses como elevadas concentraciones de SO<sub>2</sub> y etanol, pH bajo, deficiencia de oxígeno y nutrientes, o baja capacidad de fermentación, todo ello provoca que el crecimiento de la levadura se ralentice o incluso se llegue a la muerte celular (Granchi *et al.*, 1998; Combina *et al.*, 2005). Por último, la fermentación se termina por distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, convirtiéndose en la especie dominante de levadura y, por tanto, la mayoría

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	34/186



del etanol producido durante la fermentación es debido al metabolismo de dicha levadura (Török *et al.*, 1996). Esta especie fermenta los azúcares para la producción de etanol y otros metabolitos secundarios como glicerol, acetato, succinato, piruvato y varios ésteres, de esta manera contribuyen a las propiedades organolépticas del vino (González-Ramos y González, 2006).

En las últimas décadas, hay una tendencia a la realización de fermentaciones con inóculos de levaduras seleccionadas con el objetivo de obtener los resultados deseados y reproducibles en la calidad de los vinos. Las cepas de levadura que participan en la segunda fermentación se seleccionan de acuerdo con criterios fermentativos, sensoriales y tecnológicos (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001; Suárez-Lepe, 2007).

Criterios fermentativos:

- alta eficiencia fermentativa
- tolerancia a elevadas concentraciones de etanol
- intervalo óptimo de temperatura
- producción de biomasa moderada

Criterios sensoriales:

- baja producción de H<sub>2</sub>S y de acidez volátil
- producción de glicerol y ésteres volátiles
- consumo de ácido málico
- capacidad de realizar el proceso de autólisis para la liberación de manoproteínas

Criterios tecnológicos:

- estabilidad genética y tolerancia al SO<sub>2</sub>
- capacidad de adhesión y floculación
- factor *killer*

#### 1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Se trata de una levadura (hongo unicelular microscópico) responsable de la fermentación alcohólica, proceso mediante el cual el mosto se transforma en vino. Es la especie más conocida y utilizada para la elaboración de vinos, además de ser la responsable de la producción de pan, cerveza, entre otros. De esta gran variedad de aplicaciones surge la selección de cepas o genotipos de *S. cerevisiae* apropiados para diversos tipos de vinificación. También, se considera un organismo modelo, cuyo estudio sirve como base para el desarrollo de diversas disciplinas dentro del ámbito de la Biología.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	35/186



Fue en 1996 cuando se obtuvo la secuencia completa de los 16 cromosomas que componen el genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996). Posee un genoma compacto y relativamente pequeño, ADN repetitivo y unos pocos intrones. Las cepas haploides contienen aproximadamente 12-13 Mb de ADN nuclear, distribuido a lo largo de 16 cromosomas lineales y unos 6600 genes.

Es una levadura anaerobia facultativa perteneciente al filo *Ascomycota* del reino *Fungi*. Se encuentra protegida por dos envolturas celulares, la pared celular y la membrana plasmática. La pared celular proporciona una barrera con el exterior y preserva la integridad osmótica de la célula, modificando su morfología en función de su estado fisiológico y controlando la permeabilidad. En *S. cerevisiae*, estas capas constituyen el 15 % del volumen total de la célula. La pared celular tiene un espesor entre 100 y 200 nm y constituye entre el 15 y el 30 % de la masa seca de la célula en estado vegetativo. Este porcentaje depende de las condiciones de crecimiento, estrés, mutaciones, entre otras (Yin *et al.*, 2007; Backhaus *et al.*, 2010). Está formada por dos constituyentes principalmente, manoproteínas (35 – 40 % peso seco de la pared) y  $\beta$ -glucanos. Los  $\beta$ -glucanos pueden dividirse en dos grupos:  $\beta$ -1,6-glucanos (5 - 10 % peso seco de la pared) y  $\beta$ -1,3-glucanos (50 - 55 % peso seco de la pared). Algunas manoproteínas pueden tener actividad enzimática (hidrolasas o reticulantes) y otras funciones estructurales (aglutininas o floculinas) (Molon *et al.*, 2018). También, aparece en la pared una pequeña cantidad de quitina (1 – 2 %) localizada, principalmente, en las cicatrices que quedan tras la gemación (Normand *et al.*, 2005). Sin embargo, la localización de éstos depende de la etapa de desarrollo, la fase de crecimiento, las condiciones nutricionales y las diversas condiciones de estrés a las que se encuentra sometida. Cuando las levaduras están en fase de crecimiento o logarítmica, la pared celular es más porosa que en fase estacionaria (De Nobel y Barnett, 1991; Kuranda y Robbins, 1991).

La función principal de la pared celular es la de protección, pero en ella, también tiene lugar el reconocimiento molecular, que determinará su interacción con otras células (unión sexual, floculación, el factor *killer*, entre otras).

Existen dos clases principales de proteínas unidas covalentemente a los polisacáridos de la pared celular:

- Proteínas de la pared celular dependientes de GPI (GPI-CWP). La mayoría se encuentran unidas indirectamente a  $\beta$ -1,3-glucano a través de un resto de  $\beta$ -1,6-glucano de conexión. En el genoma de *S. cerevisiae* se han identificado alrededor de 60–70 proteínas GPI (Caro *et al.*, 1997).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	36/186



- Proteínas Pir (Pir-CWP). Estas proteínas están acopladas a  $\beta$ -1,3-glucano a través de un enlace sensible a los álcalis. *S. cerevisiae* posee una familia de cuatro proteínas (Mrša y Tanner, 1999).

Por otro lado, la membrana plasmática constituye una barrera estable e hidrofóbica entre el citoplasma y el medio extracelular, de unos 7 nm de grosor y con algunas invaginaciones hacia el citosol. Está formada, principalmente, por lípidos y proteínas. Entre los lípidos destacan los fosfolípidos como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y pequeñas proporciones de fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiltidilglicerol, además de los esteroides, ergosterol y zimosterol.

En cuanto a las proteínas de la membrana plasmática pueden ser de dos tipos integrales o periféricas. Las proteínas integrales están fuertemente asociadas a la región no polar de la bicapa lipídica, mientras que las periféricas se encuentran unidas a las integrales. Algunas de las funciones de las proteínas de la membrana que se deben resaltar son proporcionar anclaje para el citoesqueleto, transducción de señales, transporte de solutos (permeasas, canales, ATPasas) y facilitadoras del transporte.

El citoplasma se encuentra entre la membrana plasmática y la membrana nuclear. Está formado por el citosol, que consiste en una solución tamponada de pH entre 5 y 6. Principalmente, contiene iones, compuestos orgánicos de bajo y medio peso molecular y macromoléculas solubles; y por un citoesqueleto interno formado por estructuras filamentosas (microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios) y además contiene los orgánulos típicos de eucariotas.

#### 1.4.2 Cinética de crecimiento durante la fermentación alcohólica

Las levaduras son hongos unicelulares que pueden multiplicarse asexualmente por gemación o fisión y sexualmente mediante la formación de esporas, sólo el género *Schizosaccharomyces* se reproduce por fisión binaria. Según el tipo de reproducción, se pueden clasificar en tres grupos morfológicos: *Ascomycetes*, *Basidomycetes* y *Deuteromycetes* (son incapaces de esporular en condiciones de laboratorio). Las levaduras que se pueden encontrar en las superficies de las uvas y en el vino son del tipo *Ascomycetes* y *Deuteromycetes*.

*S. cerevisiae* pertenece a los *Ascomycetes* que se reproduce asexualmente por gemación, si las condiciones son óptimas, y sexualmente formando ascosporas en el interior de un asca o saco si las condiciones ambientales son adversas (algunos ejemplos son carencia de nutrientes, bajo pH y temperatura).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	37/186



En condiciones óptimas, *S. cerevisiae* puede duplicar su población cada 90 minutos, cuyo ciclo de división celular está formado por una fase de replicación del ADN (Fase S) y otra de segregación cromosómica o mitosis (Fase M), ambas fases se encuentran separadas por dos fases G, la G<sub>1</sub>, entre la M del ciclo previo y la S, y la fase G<sub>2</sub>, entre la S y la M, finalizando con la separación citoplásmica o citoquinesis (Figura 3) (Futcher, 1990; Forsburg y Nurse, 1991). Se trata de un proceso asimétrico en el que la célula recién formada es más pequeña que la célula madre. Mientras que esta última puede iniciar inmediatamente un nuevo ciclo de división, la célula hija debe crecer hasta alcanzar un tamaño crítico antes de iniciar su primer proceso de gemación.

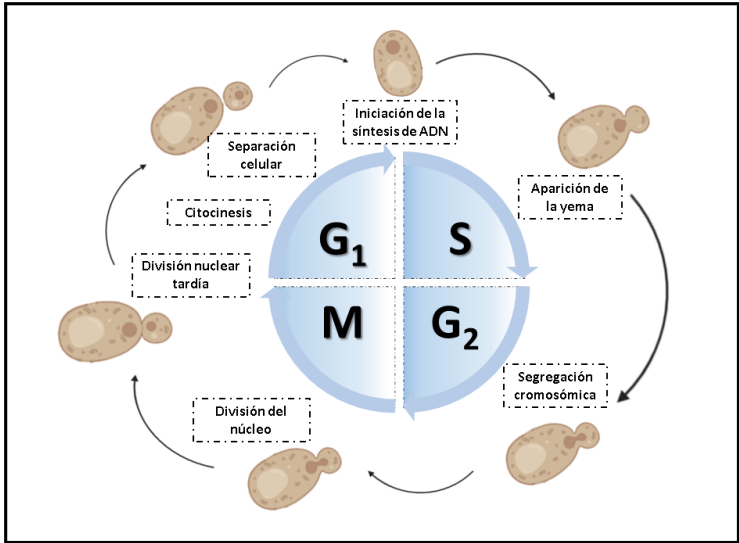


Figura 3. Esquema simplificado del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por el contrario, en condiciones adversas con escasez de nutrientes, las células diploides entran en meiosis, se generan cuatro ascosporas haploides, dos ascosporas de signo sexual MATa y dos MATα, envueltas en un asca. Cuando las ascosporas se liberan del asca y germinan, comienzan a multiplicarse y forman una línea celular haploide.

Al inicio del proceso de elaboración del vino, las levaduras comienzan a metabolizar los azúcares y otros compuestos presentes en el mosto de uva para obtener energía y aumentar su población. La Figura 4 muestra el ciclo clásico de crecimiento de la levadura bajo condiciones estándar. El crecimiento de una población se puede definir como la suma de los ciclos celulares de todos los individuos. Durante cada generación (intervalo de tiempo para la formación de dos células a partir de una) el número de células como de biomasa se duplica (Madigan *et al.*, 2015).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	38/186



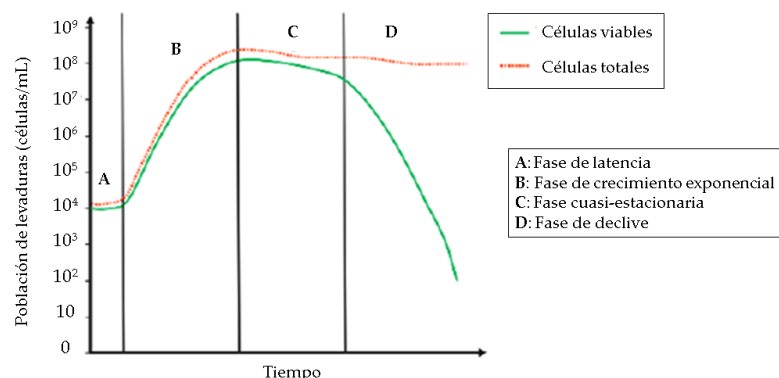
Durante las primeras horas de la fermentación alcohólica, el número de la población de levaduras no aumenta. Durante este período, también llamado fase de latencia o fase lag, es necesario que las células de levadura se adapten a las nuevas condiciones ambientales. La población de la microbiota inicial depende de varios factores. Si no se inoculan levaduras, la población suele ser de alrededor de  $10^4$  células/mL. Sin embargo, esta población inicial de microorganismos puede ser más alta si las uvas han sido atacadas por otras plagas de hongos (Moreno-Arribas y Polo, 2005). Una vez que las levaduras se han adaptado a las condiciones ambientales, comienzan a crecer y, por tanto, a dividirse. Este período, llamado fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica, está muy influenciado por la temperatura, la concentración de amonio y aminoácidos, entre otros nutrientes y por la presencia de oxígeno. Durante la fase de crecimiento exponencial, cuya duración es de 3-6 días, las levaduras aumentan su población hasta  $10^7$ - $10^8$  células/mL. Después, la levadura deja de crecer porque algunos nutrientes son deficientes. Durante esta nueva fase, llamada fase cuasi estacionaria, la población de levaduras permanece casi estable. Esta fase suele prolongarse de 2 a 10 días. Más tarde, comienza la fase de declinación o fase de muerte y la población de levaduras disminuye gradualmente hasta que casi desaparece por completo. Durante este período, las levaduras mueren debido a la escasez de nutrientes y a la toxicidad de algunos compuestos como el etanol producido durante la fermentación alcohólica (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1984; Moreno-Arribas y Polo, 2005). El éxito de una fermentación alcohólica consiste en mantener la población de levaduras viables y activas en niveles suficientes hasta que todos o la mayor parte de los azúcares fermentables se hayan consumido.

Para llevar a cabo la segunda fermentación, las levaduras han de pasar por un período de aclimatación (Tai *et al.*, 2007) a los factores de estrés propios de la segunda fermentación como son elevado contenido en etanol, pH ácido, baja temperatura, concentración de  $\text{SO}_2$  total entre 50 - 80 mg/L y elevada acidez total, en torno a 5 - 7 g/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	39/186







**Figura 4.** Ciclo de crecimiento de las levaduras (Figura adaptada de Moreno-Arribas y Polo, 2009).

La segunda fermentación es muy lenta con respecto a la primera fermentación alcohólica, suele durar de 15 a 30 veces más. Autores como Martínez-Rodríguez y colaboradores (2002) verificaron que a partir de un inóculo de  $10^6$  UFC/mL, *S. cerevisiae* es capaz de alcanzar una población del orden de  $10^7$  UFC/mL. La viabilidad celular durante la segunda fermentación disminuye pasados 15-20 días después del tiraje, de modo que no se encuentran en el vino células de levaduras vivas transcurridos entre 60-90 días (Feuillat y Charpentier, 1982). Además, la morfología de las levaduras se modifica durante la segunda fermentación, incluso se ha evidenciado un cambio en el tamaño de la vacuola, la separación del citoplasma de la pared celular, la existencia o no de yemas de división, entre otros cambios (González *et al.*, 2003; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2004). *S. cerevisiae* fermenta alrededor de 20 g/L de azúcar durante la segunda fermentación entre los primeros 20-30 días, mientras que durante la primera fermentación es capaz de metabolizar alrededor de 175 g/L.

### 1.4.3 Levaduras de velo de flor

Uno de los principales criterios de selección y mejora genética de las levaduras vínicas es la capacidad de adhesión y floculación. La levadura de flor o formadora de velo de flor *S. cerevisiae* cumple con estos requisitos. Estas levaduras están íntimamente asociadas con la fermentación alcohólica y los procesos de envejecimiento biológico, que se llevan a cabo en España (Andalucía), Italia (Cerdeña), Hungría y Francia (Jura) para

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	40/186



producir los vinos de Jerez y de Montilla-Moriles, Vernaccia di Oristano, Szamorodni y Vin Jaune, respectivamente.

La característica principal de estas levaduras es que al final de la fermentación alcohólica, cuando se encuentran con un bajo nivel de azúcares fermentables, baja concentración de oxígeno, bajo pH, presencia de sulfitos (aproximadamente 30 mg/L de SO<sub>2</sub> total) y una alta concentración de etanol de entre 14-16% (v/v) cambian de un metabolismo fermentativo a uno oxidativo (proceso conocido como cambio diaúxico). Esto provoca que emerjan a la superficie del vino para formar agregados multicelulares (Alexandre, 2013). Esta agregación conduce a la formación de una biopelícula, también denominada *biofilm* o velo de flor (Alexandre, 2013; Legras *et al.*, 2014). Esta respuesta se considera como un mecanismo adaptativo que permiten a las células de levadura acceder al oxígeno y crecer en presencia de fuentes de carbono no fermentables como es el etanol (Zara *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae* este velo de flor también puede formarse en otras fuentes reducidas de carbono no fermentable como acetato de etilo o glicerol (Zara *et al.*, 2010). Un buen velo de flor está formado, principalmente, por cepas de *S. cerevisiae*, pero otros tipos de velos se pueden formar por otras levaduras como *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Torulaspora delbrueckii* y algunas bacterias también pueden originar otro tipo de velo (Martínez *et al.*, 1995; Suárez-Lepez e Iñigo-Leal, 2004; Pozo-Bayón y Moreno-Arribas, 2011).

Para que tenga lugar el envejecimiento biológico, el vino resultante después de la fermentación alcohólica se transfiere a barriles dejando un espacio de aire ya que no se rellenan al completo, esto permite a la levadura cambiar de un metabolismo fermentativo a uno oxidativo. En *S. cerevisiae*, se han descrito diferentes proteínas implicadas en la formación de biopelículas, entre las que se incluyen Flo11p (Zara *et al.*, 2005), Hsp12p (Zara *et al.*, 2002) y Ccw14p (Moreno-García *et al.*, 2018). La capacidad de formación de *biofilm* de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* se ha relacionado con el número de secuencias repetidas y con los niveles de transcripción del gen *FLO11* (Zara *et al.*, 2009). Durante el cambio diaúxico, se produce un aumento en la expresión del gen *FLO11*, esto provoca un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular, facilita la agregación de las células y el atrapamiento de dióxido de carbono, de este modo, se permite que el agregado celular ascienda a la superficie del vino y desarrolle una biopelícula (Zara *et al.*, 2005). Los orgánulos y los componentes celulares, así como la pared celular y las mitocondrias juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo de las levaduras

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	41/186



flor y, por lo tanto, en sus mecanismos de defensa antioxidante (Moreno-García *et al.*, 2014). La formación de *biofilm* ocurre cuando la concentración de cualquier fuente de carbono fermentable es imperceptible o nula (Iimura *et al.*, 1980) o en presencia de otras fuentes de carbono, como glicerol y acetato de etilo, que pueden inducir la formación de dicha biopelícula (Zara *et al.*, 2010). Sin embargo, ante la falta de disponibilidad de una fuente de nitrógeno, la levadura de flor es incapaz de formar *biofilm* (Mauricio *et al.*, 2001; Berlanga *et al.*, 2006).

Inicialmente, la capacidad de las levaduras de flor para formar ese *biofilm* sobre la superficie del vino se atribuyó a su alta hidrofobicidad, gracias a una composición específica de sus paredes (Iimura *et al.*, 1980). Sin embargo, se debe a que el genoma de esta levadura cuenta con dos mutaciones, una en el promotor y otra en las regiones codificantes del gen *FLO11*. Este gen codifica una glucoproteína de superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), requerida para la formación de pseudohifas, crecimiento invasivo, floculación y formación de *biofilm* (Guo *et al.*, 2000; Fidalgo *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2012). El resultado de estas mutaciones conlleva una mayor expresión de dicho gen y una mayor adhesión celular. La regulación de la expresión de *FLO11* es altamente compleja e implica varias vías, como las vías Ras/cAMP/PKA y MAP-quinasa, y también dos ARNs no codificantes (ICR1 y PWR1) (Brückner y Mösch, 2011; Kraushaar *et al.*, 2015).

Recientemente, Eldarov y colaboradores (2018) observaron que el polimorfismo genético no solo afecta al gen *FLO11*, sino también a los genes involucrados en la morfología de la levadura, el metabolismo de los carbohidratos, la homeostasis iónica, la respuesta al estrés osmótico, el metabolismo de los lípidos, la reparación del ADN y a la biogénesis de la pared celular. Este polimorfismo genético se debe, principalmente, a la acumulación de SNP/InDel (*Single Nucleotide Polymorphism / Insertion or deletion contraction*). Estos autores, también, observaron la presencia de ciertos genes en la levadura de flor que no se identificaron en la cepa de referencia, como el gen *MPRI* que codifica la N-acetiltransferasa que está implicada en la tolerancia al estrés oxidativo a través del metabolismo de la prolina. Las proteínas Hsp12p, Nrg1p y Btn2p y las proteínas de pared celular, Ccw7p, Pir2p y Hsp150p también están relacionadas en la formación de biopelículas (Zara *et al.*, 2002; Ishigami *et al.*, 2004; Espinazo-Romeu *et al.*, 2008).

La levadura de flor contiene cientos de SNPs, InDels, reordenamientos cromosómicos y alteraciones del contenido genético que difieren del resto de levaduras vínicas (Coi *et al.*, 2017; Eldarov *et al.*, 2018; Legras *et al.*, 2018), ello sugiere su

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	42/186



adaptación fisiológica y metabólica a su entorno (Moreno-García *et al.*, 2014, 2015b, 2017). Una característica muy interesante, además de la formación de *biofilm*, es su tolerancia a elevadas concentraciones de etanol que podría ser explicada por la activación de genes involucrados con la respuesta de proteína desplegada (UPR) y su factor de transcripción Hac1p (Navarro-Tapia *et al.*, 2016).

Actualmente, se intenta ampliar el conocimiento acerca de estas levaduras de flor, tratando de revelar sus características genéticas y su adaptación a las condiciones de envejecimiento biológico (Coi *et al.*, 2017; Eldarov *et al.*, 2018), su diversidad (Marin-Menguiano *et al.*, 2017; David-Vaizant y Alexandre, 2018) o incluso caracterizar su proteoma (Moreno-García *et al.*, 2017; Moreno-García *et al.*, 2019).

#### 1.4.4 Proceso autolítico de las levaduras

El proceso de autólisis de las levaduras en la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional tiene lugar durante el envejecimiento del vino en contacto con las lías y está estrechamente relacionado con la calidad sensorial del vino espumoso resultante.

La autólisis consiste en la autodegradación enzimática de los constituyentes celulares de las levaduras, liberándose aminoácidos, péptidos, nucleótidos, manoproteínas, ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos y lactonas (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000; Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Villamiel *et al.*, 2008; Kemp *et al.*, 2015). El proceso de autólisis se inicia durante la fase estacionaria de crecimiento de las levaduras (Babayan y Bezrukov, 1985). Suele comenzar transcurridos de 2 a 4 meses después del final de la segunda fermentación en botella (Feuillat y Charpentier, 1982; Charpentier y Feuillat, 1993; Todd *et al.*, 2000). Desde el punto de vista enológico, se trata de un proceso lento (Cebollero *et al.*, 2005; Cebollero y González, 2006). Estos compuestos contribuyen de manera significativa a las propiedades organolépticas del vino final, esto justifica que el tiempo mínimo de crianza del Cava oscile desde 9 meses hasta alcanzar los 30 meses en el caso de los Gran reserva.

El proceso autolítico se puede dividir en 4 etapas bien diferenciadas. Comienza con la liberación de una mezcla de polisacáridos y de cadenas cortas de oligosacáridos por parte de las enzimas endo y exo- $\beta$ -(1,3)-glucanasas, constituyentes que hacen inviables la pared celular de la levadura. Una fracción de estos polisacáridos corresponde a las manoproteínas unidas covalentemente al glucano de la pared. A continuación, se produce la hidrólisis parcial del glucano, que provoca la liberación de las manoproteínas

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	43/186



de mayor peso molecular con bajo contenido en glucosa provenientes, principalmente, de la zona periplasmática. Esta hidrólisis se continua con la degradación de los restantes glucanos de la pared y del medio extracelular por las enzimas  $\beta$ -(1,3)-glucanasas. Por último, las  $\alpha$ - $\beta$ -(1,3)-glucanasas, solubilizadas en el medio, degradan el glucano unido a las manoproteínas y éstas a su vez, pueden ser hidrolizadas por  $\alpha$ -manosidasas u otras proteasas, provocando la liberación de peptidomananos de pequeño tamaño (Charpentier y Freyssinet, 1989).

Como consecuencia de este hecho, se produce la liberación al vino de diferentes compuestos procedentes tanto del interior de la célula como de la pared celular de la levadura. Todos estos compuestos resultan fundamentales para las propiedades organolépticas del vino espumoso final. Este fenómeno depende de diferentes factores, como la temperatura, el pH o la presencia de etanol (Martínez *et al.*, 2018). Los compuestos liberados al vino gracias a este proceso son, principalmente, compuestos nitrogenados (aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos), polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos.

Las manoproteínas proporcionan estabilidad al vino y contribuyen de manera importante a sus propiedades organolépticas. Varios estudios afirman que las manoproteínas mejoran la estabilidad tartárica y proteica (Moine-Ledoux y Dubourdieu, 1999; Gonzalez-Ramos *et al.*, 2008), incluso aumenta el cuerpo del vino y consigue mayor redondez en boca, que suaviza la sensación de astringencia y amargor de los taninos (Escot *et al.*, 2001; Pérez-Serradilla y De Castro, 2008). También, contribuyen a la mejora de la estabilidad de la espuma (Nunez *et al.*, 2005; Abdallah *et al.*, 2010) ya que son capaces de unirse a las burbujas de CO<sub>2</sub> por su región hidrofóbica. Esta unión provoca un aumento en la tensión superficial de las burbujas, que produce una mayor estabilidad de la espuma (Coelho *et al.*, 2011). Otro aspecto a destacar de las manoproteínas es su participación en la mejora de la floculación de las levaduras, este hecho facilita la eliminación de las levaduras de la botella durante la fase de degüelle (Escot *et al.*, 2001).

Al tratarse de un período largo y lento requiere una inversión considerable en equipos por parte de las bodegas, lo que conlleva elevados costes de producción e implica la inmovilización de las existencias de la bodega. Por ello, necesitan almacenar gran cantidad de botellas durante largos períodos de tiempo. Además, el almacenamiento de los vinos durante este período de tiempo se ha asociado con una mayor contaminación bacteriana. De ahí la necesidad de que las bodegas precisen estrategias para acelerar este

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	44/186



proceso de autólisis como por ejemplo el uso de ultrasonidos, microondas y homogeneización a alta presión (Martínez *et al.*, 2016).

Recientemente, se ha desarrollado una técnica conocida como Campo eléctrico pulsante, *Pulsed Electric Fields* (PEF), que provoca el incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las células (electroporación) mediante la aplicación de pulsos de alta intensidad de campo eléctrico (kV/cm) y de corta duración ( $\mu$ s-ms). Esto desencadenaría la autólisis de la levadura y la liberación acelerada de manoproteínas al medio (Martínez *et al.*, 2019). Lo que reduciría los tiempos de envejecimientos necesarios para que se produzca la autólisis, además de, una reducción en los costes de producción para la industria enológica.

#### 1.4.5 Fermentación alcohólica

Una de las principales características de *S. cerevisiae* es su capacidad de convertir, rápidamente, azúcares en etanol y dióxido de carbono en condiciones anaerobias y aeróbicas. Puesto que *S. cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo, cuando las levaduras pueden disponer de oxígeno utilizan la vía respiratoria al tratarse de una vía más favorable energéticamente. Este fenómeno de inhibición de la fermentación en presencia de oxígeno fue descubierto por Pasteur, y se conoce como “Efecto Pasteur” (Moreno y Peinado, 2010). Por otro lado, en medios muy bien oxigenados y con elevadas concentraciones de azúcares fermentables (>100 mg/L), la levadura reprime la síntesis y actividad de las enzimas respiratorias y produce etanol por vía fermentativa. A este fenómeno se le conoce como “Efecto Crabtree” o “Anti-Pasteur” (De Deken, 1966). El rendimiento energético del proceso de fermentación es menor que el proceso catabólico de respiración.

La fermentación alcohólica es la conversión de los dos principales azúcares de la uva, la glucosa y la fructosa, en etanol y dióxido de carbono para la obtención de energía, entre otros metabolitos. Se realiza por levaduras del género *Saccharomyces*, principalmente por *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. El desarrollo de la fermentación alcohólica está relacionado con la calidad del vino, ya que se encuentra influenciada por la calidad del mosto, que depende de la variedad de uva y su procedencia, de las prácticas enológicas y de la población microbiana (Longo *et al.*, 1991).

Se considera una fermentación alcohólica exitosa aquella en la que hay un consumo completo de los azúcares del mosto (menos de 2 g/L de azúcares residuales en el medio), de esta manera se evitan problemas futuros como pueden ser las

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	45/186



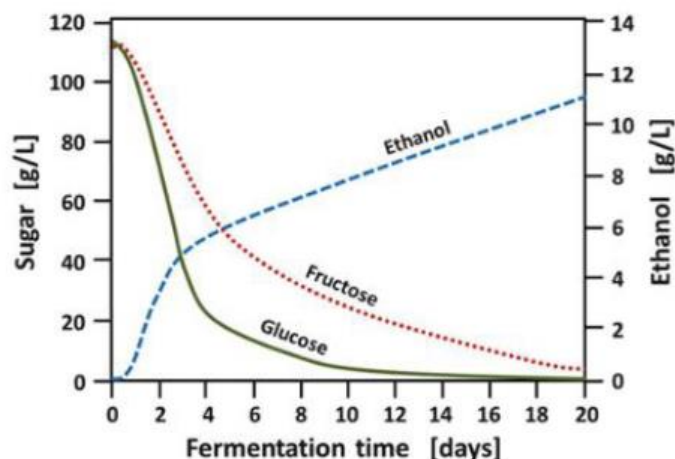
refermentaciones o aumento de la acidez volátil. Una fermentación se considera idónea cuando el 95% del azúcar es convertido en etanol y dióxido de carbono, el 1% en material celular y el 4% en otros productos como glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, butanodiol, alcoholes superiores, ésteres, entre otros (Boulton *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos, suele producirse un aumento de temperatura de 1.3°C por cada grado Brix consumido por litro (Boulton *et al.*, 1999).

Un factor muy importante a tener en cuenta, por tanto, es la temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación, ya que influye en el crecimiento de las levaduras, y esto a su vez, deriva en un cambio en la duración de la fermentación, lo que puede conllevar a un cambio en la composición química y organoléptica del vino (Fleet y Heard, 1993). La duración de la fase de latencia y el retraso en el inicio de la fermentación disminuye a medida que aumenta la temperatura. Igualmente, la velocidad máxima de fermentación aumenta a medida que la temperatura de fermentación aumenta. Un inicio lento de la fermentación puede facilitar el crecimiento de bacterias acéticas y lácticas o de especies de no-*Saccharomyces* mejor adaptadas a las bajas temperaturas (Hierro *et al.*, 2006; Goddard, 2008; Andorrà *et al.*, 2010).

En general, se sabe que durante la fermentación la tasa de catabolismo de azúcar disminuye. Este fenómeno se ha atribuido a la toxicidad del etanol, el transporte decreciente de solutos y a una falta general de nutrientes. En particular, el amonio y los aminoácidos se consumen entre las primeras 24 y 48 h, teniendo lugar el resto de la fermentación bajo la inanición de nitrógeno. Por lo tanto, en etapas posteriores de las fermentaciones, un aumento gradual en las concentraciones de etanol y un lento agotamiento de azúcares (Figura 5) y otros nutrientes están mediados por el metabolismo de las células que no proliferan. La cantidad de azúcar consumida por las levaduras puede variar según el tamaño del inóculo, la temperatura de fermentación y la disponibilidad de nutrientes (Kunkee y Bisson, 1993). Además de la degradación de los azúcares, también, se realiza la transformación de compuestos de nitrógeno y compuestos azufrados esenciales para el mantenimiento de las estructuras celulares y la multiplicación celular (Rodicio y Heinisch, 2017).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	46/186





**Figura 5.** Cinética típica de la degradación de glucosa y fructosa y de la producción de etanol durante la fermentación alcohólica (Rodicio y Heinisch, 2017).

La fermentación alcohólica comienza con la degradación del azúcar por parte de las levaduras mediante la vía respiratoria a través de la ruta de la glucólisis. El piruvato formado se incorpora al ciclo de Krebs para la obtención de energía, lo que permite la rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una elevada biomasa. Esta vía es seguida por las levaduras hasta el agotamiento del oxígeno disuelto en el mosto, una vez agotado el oxígeno, las levaduras continúan la vía fermentativa (Efecto Crabtree).

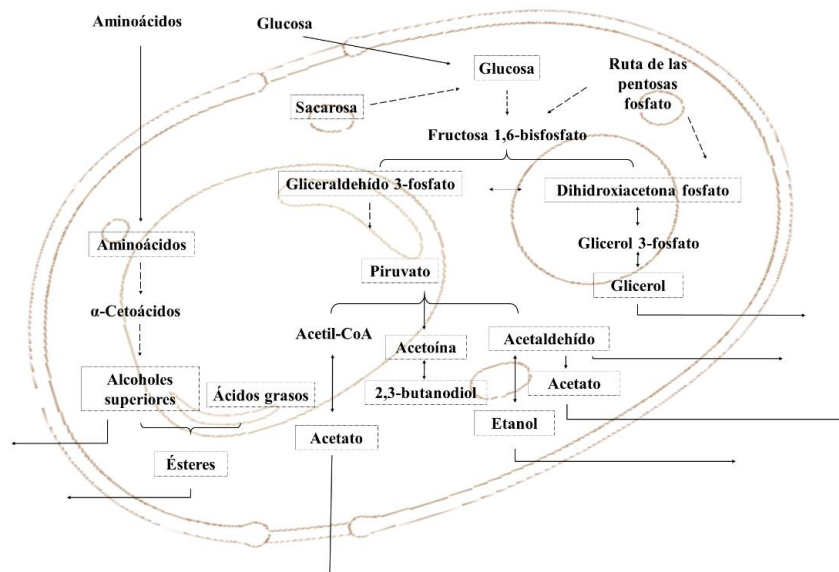
Durante la fermentación alcohólica, el piruvato puede convertirse en muchos metabolitos, siendo el etanol y el dióxido de carbono los productos de fermentación predominantes. El tercer compuesto más abundante que se produce en el vino es el glicerol, que se sintetiza principalmente en las primeras etapas de la fermentación para reoxidar el NADH generado por la falta de acetaldehído. A medida que transcurre la fermentación y se ha producido suficiente acetaldehído, la reoxidación del NADH se realiza fundamentalmente en el paso de acetaldehído a etanol por la alcohol deshidrogenasa. El glicerol también se forma como soluto compatible en situaciones de estrés (Porras-Agüera *et al.*, 2020b).

Además de formar etanol y glicerol, las levaduras liberan al medio pequeñas cantidades de otros productos de fermentación, en particular, ácidos orgánicos como acetato y succinato, pero también alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. Aunque las tasas específicas de formación de estos compuestos son, a menudo, de órdenes de magnitud más bajos que las tasas de formación de etanol, algunos juegan un papel muy importante en las propiedades organolépticas de los vinos (Figura 6).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	47/186







**Figura 6.** Esquema de la fermentación alcohólica y gliceropirúvica. Síntesis de compuestos volátiles que contribuyen a las propiedades organolépticas del vino.

### 1.5 Características organolépticas de los vinos espumosos

La influencia de las levaduras sobre las características organolépticas del vino ha sido un tema estudiado desde los tiempos de Pasteur. Los microorganismos son un factor biótico clave en la composición química del vino, ya que afectan a la calidad de la uva y son capaces de producir gran cantidad de compuestos que contribuyen a las características organolépticas. En general, el mayor porcentaje de la composición aromática total del vino está representado por compuestos volátiles derivados del metabolismo de la levadura. Las características que definen la calidad y la composición química de un vino espumoso son la espuma, el sabor y el aroma.

La calidad de su espuma viene definida por la cantidad de espuma producida (espumabilidad) y su persistencia. La espuma es provocada por la liberación lenta de CO<sub>2</sub> desde el fondo del líquido formando rosarios hasta llegar a la superficie del vino donde forman una corona de pequeñas burbujas (Liger-Belair *et al.*, 2012). Para que una burbuja pueda formarse es necesario un aporte energético que es producido mediante un fenómeno conocido como nucleación. Las burbujas pueden formarse por dos vías, mediante nucleación directa a partir del gas disuelto en el vino o mediante nucleación

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	48/186



inducida a partir del gas absorbido en una partícula sólida. En cualquier caso, la acumulación de una gran cantidad de burbujas da lugar a la formación de la espuma. Su estabilidad depende de varios factores, como son el drenaje de líquido entre las burbujas, que elimina la interfase líquido-gas, la fusión entre burbujas (también denominado coalescencia) y el tamaño de las burbujas. Además, influye la viscosidad del vino (que depende de la composición del vino) y la tensión superficial, que disminuye con la presencia de moléculas tensoactivas.

El sabor de un vino consiste en una percepción sensorial que depende de la persona, del contexto de la experiencia del consumidor y de la composición química del producto. Los factores más destacables que influyen en el sabor de un vino son la variedad de uva, las condiciones geográficas y vitivinícolas de cultivo de uva, la microbiota presente en las uvas y la utilizada para la realización de la fermentación, y el proceso de fermentación. Las levaduras durante su metabolismo producen una serie de compuestos volátiles (alcoholes superiores, ácidos, ésteres, carbonilos, tioles) que determinan el sabor característico de cada vino.

El aroma del vino es otro de los factores más importantes para la determinación de la calidad y depende de un gran número de reacciones químicas y enzimáticas dando lugar a un proceso muy complejo. Las levaduras juegan un papel primordial, ya que contribuyen enormemente al aroma de un vino por su actividad metabólica, produciendo o modificando la liberación de los compuestos derivados de la uva, así se determina la formación de una porción fundamental de sustancias aromatizantes del vino.

En enología, los aromas pueden clasificarse en cuatro grupos atendiendo a la procedencia de los compuestos del aroma presentes en los vinos:

- I. Aromas varietales o primarios: son los que proceden de la uva o de las partes sólidas del racimo. Es específico de cada variedad (Mallouchos *et al.*, 2003). Principalmente, este tipo de aroma se debe a la presencia de monoterpenos, que pasan de la uva al vino sin sufrir modificación alguna. En la uva, la mayoría de los terpenos son glucósidos. Destacan el linalol, geraniol, terpineol, nerol, citroneol y el dinodienol. Proporcionan olor a flores.
- II. Aromas prefermentativos: son los aromas obtenidos a partir de la oxidación e hidrólisis durante la extracción del jugo y durante la maceración (Flanzy, 2000; Hidalgo, 2011). Estos compuestos son, esencialmente, aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono. Aportan aromas herbáceos, pero en concentraciones elevadas son desfavorables para el vino, ya que les proporciona amargor.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	49/186



- III. Aromas fermentativos: son producidos por el metabolismo de la levadura durante la fermentación y dependen de las condiciones en las que ésta transcurra (Gerbaux *et al.*, 2002; Frivik y Ebeler, 2003). Dentro de este grupo de aroma se encuentran los ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes superiores, entre otros. Todos ellos proporcionan el aporte total para el vino (Marais y Pool, 1980). Sin embargo, en ocasiones, estos aromas pueden ser desagradables debido a fermentaciones mal elaboradas, embotellamientos precoces o incluso a levaduras mal seleccionadas (Chatonnet *et al.*, 1992). El pH, la temperatura y la composición del mosto determinan la biosíntesis de los compuestos volátiles por la levadura durante la primera y segunda fermentación.
- IV. Aromas postfermentativos, también denominados “*bouquet*” o terciarios: se producen durante el envejecimiento del vino mediante reacciones químicas y/o enzimáticas (Benítez *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2003). Suponen el equilibrio final del vino y le aportan perfumes delicados y penetrantes. Los compuestos que pertenecen a este grupo de aromas son los ésteres de alto peso molecular. El origen de estos aromas es diverso. Pueden formarse mediante reacciones de esterificación entre ácidos y alcoholes o por reacciones de óxido-reducción entre compuestos aromáticos y fenólicos (Carnacini *et al.*, 1997).

### 1.5.1 Compuestos responsables del aroma en el vino

Las levaduras contribuyen a las características organolépticas del vino mediante la producción de etanol y dióxido de carbono, además de, otros metabolitos importantes de la fermentación (Figura 6), como son glicerol, ácido acético, y cientos de compuestos aromáticos activos, entre los que se incluyen alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, ácidos grasos volátiles o compuestos de carbonilo (Swiegers *et al.*, 2005; Styger *et al.*, 2011). Los alcoholes superiores y los ésteres son los que más contribuyen al aroma de las bebidas alcohólicas (Stribny *et al.*, 2015).

La formación de estos compuestos volátiles está directamente relacionada con el metabolismo de la levadura utilizada para la elaboración del vino (Lambrechts y Pretorius, 2000). Como consecuencia, cada cepa produce un perfil diferente de compuestos volátiles, aun cuando se utilice el mismo mosto de uva (Molina *et al.*, 2009).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	50/186



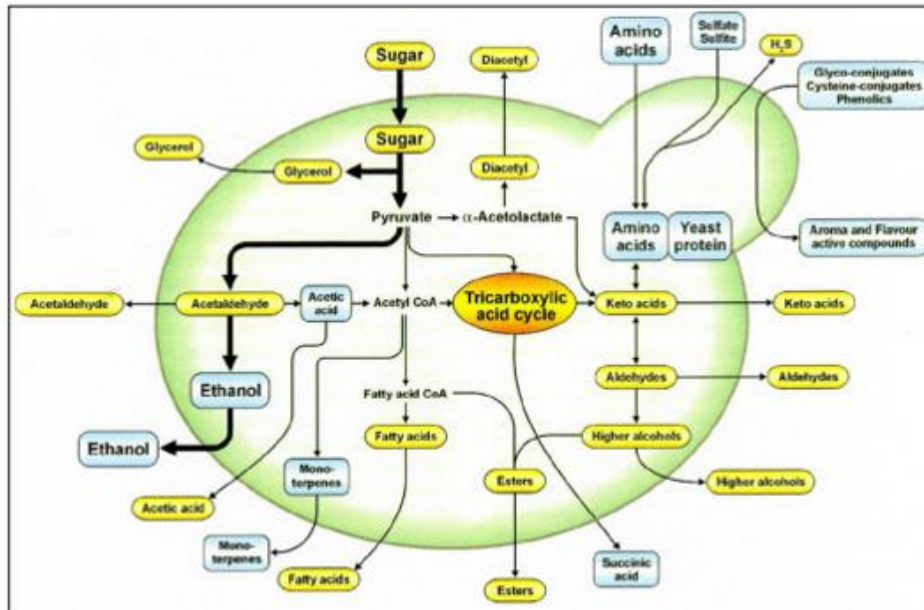


Figura 7. Esquema de la síntesis de compuestos aromáticos por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Bothelo, 2008).

Los compuestos volátiles se pueden clasificar de acuerdo a su concentración en volátiles mayoritarios, aquéllos cuya concentración es superior a 10 mg/L y volátiles minoritarios, su concentración es inferior a ese valor.

### Alcoholes superiores

Representan el grupo de compuestos volátiles más importante formado durante la fermentación y contribuyen a la aportación de aromas y sabores esenciales en el vino (Hazelwood *et al.*, 2008). Se trata de alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono, y que presentan un peso molecular y punto de ebullición mayor que el etanol. Destacan 2-metil butanol, 3-metil butanol, propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol y 2-feniletanol. Dependiendo de la concentración en la que se encuentren en el vino, pueden tener un impacto sensorial positivo o negativo en el vino, si es inferior a 300 mg/L, aportan notas frutales y florales, además de contribuir a la complejidad del aroma. Por el contrario, si ésta es superior a 400 mg/L provoca una disminución de la calidad final del vino espumoso causada por la aparición de notas punzantes y desagradables (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975; Rapp y Versini, 1995).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	51/186



Propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), alcoholes isoamílicos (2 y 3-metil-1-butanol) y 2-feniletanol son los principales alcoholes superiores en vinos, mientras que 1-butanol, 3- y 4-metil- 1-pentanol, alcohol furfurílico, alcohol benéfico y tirosol son algunos de los alcoholes superiores menores. El propanol, el butanol y el isobutanol aportan un olor alcohólico, los alcoholes isoamílicos confieren aroma a mazapán o a plátano, el tirosol contribuye con aromas florales a rosas y 2-feniletanol otorga un aroma dulce como la miel (Lambrechts y Pretorius, 2000).

La producción de alcoholes superiores está estrechamente relacionada con el metabolismo de los aminoácidos, siendo estos últimos la principal fuente de nitrógeno asimilable en el mosto. La levadura puede metabolizarlos de varias maneras, en particular, puede usarlos para la síntesis de proteínas o transformarlos en otros compuestos y usarlos para otros fines y procesos metabólicos (Bauer y Pretorius, 2000). Cuando estos aminoácidos son desaminados, el producto principal de la descomposición es un alcohol superior. La levadura los incorpora del medio, de manera secuencial, a través de transportadores de aminoácidos que tiene ubicados en la membrana (Henschke, 1993). La mayoría de estos transportadores tienen una amplia especificidad de sustrato, como es el caso de la permeasa de aminoácidos de cadena ramificada codificada por el gen *BAP2*, mientras que algunos tienen una especificidad muy alta al transportar solo un aminoácido (Jauniaux y Grenson, 1990). Los aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina se transportan a la célula de levadura a través de varios sistemas de transporte (Grauslund *et al.*, 1995; Beltran *et al.*, 2004). En condiciones de escasez de fuente de nitrógeno, la levadura utiliza estos aminoácidos para la síntesis de otros metabolitos que contienen nitrógeno. La síntesis de los alcoholes superiores puede realizarse mediante dos vías (Figura 8), la ruta anabólica a partir de azúcares mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la vía catabólica a partir de aminoácidos exógenos a través de la denominada vía de Ehrlich, que tiene lugar en las mitocondrias y en el citoplasma (Dickinson *et al.*, 2003). Los alcoholes superiores sintetizados por la vía de Ehrlich se denominan alcoholes de fusel. Ambas vías de síntesis convergen en la formación de un  $\alpha$ -cetoácido que puede descarboxilarse y reducirse para generar un alcohol de fusel. Las proporciones relativas atribuidas a estas dos vías son del 25 % y del 75 %, respectivamente (Baumes, 2000). Estos aminoácidos, junto con el resto de los compuestos de nitrógeno, son liberados por las levaduras durante el envejecimiento del vino (Penacho *et al.*, 2012).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	52/186



La biosíntesis de alcoholes superiores por la vía catabólica comienza con una reacción de transaminación entre un aminoácido y un  $\alpha$ -cetoácido utilizando glutamato/ $\alpha$ -cetoglutarato como donante/aceptor catalizada por las enzimas Bat1p, Bat2p, Aro8p y Aro9p (Prohl *et al.*, 2000; Eden *et al.*, 2001; Hazelwood *et al.*, 2008). Mientras que Bat1p y Bat2p son aminotransferasas de aminoácidos ramificados mitocondriales y citosólicas (BCAATasas), respectivamente. Aro8p y Aro9p se describieron por primera vez como aminotransferasas de aminoácidos aromáticos I y II, respectivamente (Iraqi *et al.*, 1999). Estudios posteriores demostraron que las enzimas codificadas por *ARO8* y *ARO9* tenían una especificidad de sustrato más amplia de lo que se conocía hasta el momento, de modo que la transcripción de ambos genes es activada por fenilalanina, metionina y leucina (Lilly *et al.*, 2006; Boer *et al.*, 2007).

A continuación, tiene lugar la descarboxilación del  $\alpha$ -cetoácido para formar un aldehído, se trata de un punto de no retorno en la ruta de Ehrlich (Jansen *et al.*, 2003). Esta reacción está catalizada por las tres piruvato descarboxilasas (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p), Aro10p y Thi3p (Dickinson *et al.*, 1998; 2000; 2003; Vuralhan *et al.*, 2003; Bolat *et al.*, 2013), siendo Pdc5p y Aro10p las que presentan amplia especificidad de sustrato (Romagnoli *et al.*, 2012).

El aminoácido valina sólo es descarboxilado por alguna de las tres piruvato descarboxilasas; sin embargo, en el caso de la isoleucina, las cinco descarboxilasas de la familia pueden producir alcohol amfílico activo (Dickinson *et al.*, 2000). La enzima Thi3p no puede catalizar la descarboxilación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, pero sí del resto de aminoácidos (Dickinson *et al.*, 2003).

Por último, Dickinson y colaboradores (2003) postularon que la presencia de cualquiera de las cinco enzimas de alcohol deshidrogenasa descritas (Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh4p, Adh5p) y la enzima formaldehído deshidrogenasa (Sfa1p) pueden catalizar el paso final en la formación de alcoholes de fusel derivados de aminoácidos ramificados por la vía de Ehrlich. Por otro lado, las proteínas Adh1p y Adh2p son enzimas citosólicas. La primera, cataliza la reducción del acetaldehído a etanol durante la fermentación (Bennetzen y Hall, 1982) mientras que Adh2p actúa en el sentido opuesto de Adh1p oxidando etanol (Russell *et al.*, 1983; Picotti *et al.*, 2013) y su gen correspondiente se reprime directamente en presencia de glucosa; la Adh3p es responsable de mantener el equilibrio redox durante el crecimiento anaeróbico de la levadura ya que se encarga de reducir el acetaldehído dentro de las mitocondrias (Bakker *et al.*, 2000).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	53/186



Existen varias hipótesis sobre la finalidad de la formación de estos alcoholes superiores:

- mantenimiento de la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y, por lo tanto, del equilibrio redox de la célula (Van Dijken y Scheffers, 1986; Quain, 1988). Sin embargo, autores como Boulton (1995) no están de acuerdo con esta teoría, ya que la levadura produce otros equivalentes redox (etanol, glicerol, acetato, acetaldehído o succinato) capaces de cumplir con esta función.
- ayuda en la eliminación de compuestos aldehídos tóxicos y como una fuente alternativa para que la levadura obtenga nitrógeno (Volbrecht y Radler, 1973; Boulton *et al.*, 1995).

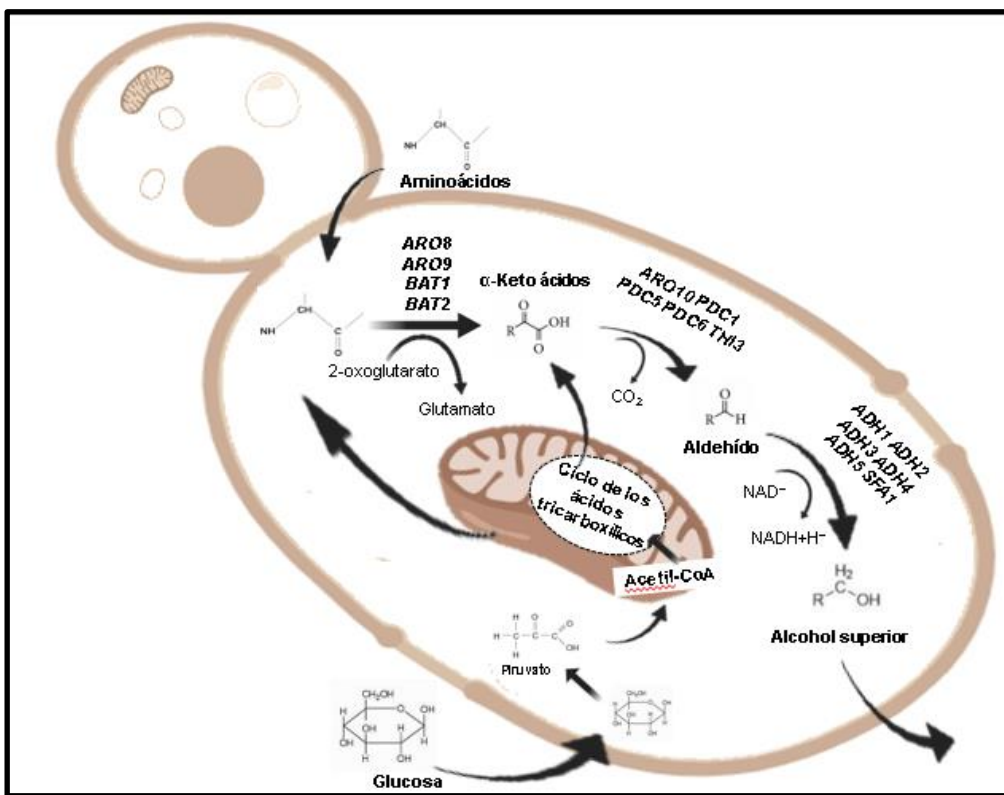


Figura 8. Representación esquemática de las rutas de formación de los alcoholes superiores por *Saccharomyces cerevisiae*.

### Ésteres

Los ésteres volátiles son el conjunto más importante de compuestos activos aromáticos derivados de la levadura, son responsables del carácter afrutado, dulce y

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	54/186




perfumado, cualidades muy deseadas en el vino (Saerens *et al.*, 2010). Sin embargo, en concentraciones superiores a 170 mg/L se consideran indeseables, ya que proporcionan olores a esmalte de uñas, barniz y solvente químico. Los principales grupos de ésteres formados durante la fermentación son los ésteres de acetato y los ésteres etílicos de ácidos grasos, los ésteres de acetato son los más importantes para el aroma del vino. Los ésteres de acetato más destacados son acetato de etilo (aroma a frutas), acetato de isoamilo (aroma a plátano) y acetato de 2-feniletilo (aromas a miel, rosas y floral). Por otra parte, para el grupo de ésteres etílicos de ácidos grasos, los principales son hexanoato de etilo y octanoato de etilo, ambos aportan aroma a manzana.

Los ésteres son menos tóxicos que sus respectivos alcoholes o precursores ácidos, por lo que la levadura los usa como un mecanismo de desintoxicación, y, además, su síntesis representa un mecanismo para la regeneración de la coenzima A libre a partir de sus conjugados.

La síntesis de los ésteres tiene lugar durante la fermentación y está vinculada al metabolismo de los lípidos y al crecimiento de las levaduras. Los ésteres se pueden formar mediante reacción química por esterificación de ácidos grasos; sin embargo, la reacción es demasiado lenta para la cantidad de ésteres presentes en el vino. También, se pueden sintetizar en el citoplasma mediante reacciones catalizadas por las enzimas aciltransferasas (o éster sintasas), en las que se requiere acil-CoA como cosustrato (Mason y Dufour, 2000; Saerens *et al.*, 2008). La reacción requiere energía proporcionada por el enlace tioéster del cosustrato acil-coenzima A (CoA). La mayor parte del acil-CoA requerido se produce por descarboxilación oxidativa del piruvato, dando lugar a acetil-CoA, mientras que el resto del acil-CoA se forma por la acilación entre ácidos grasos y coenzima A (CoA) libre (Procopio *et al.*, 2011).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	55/186





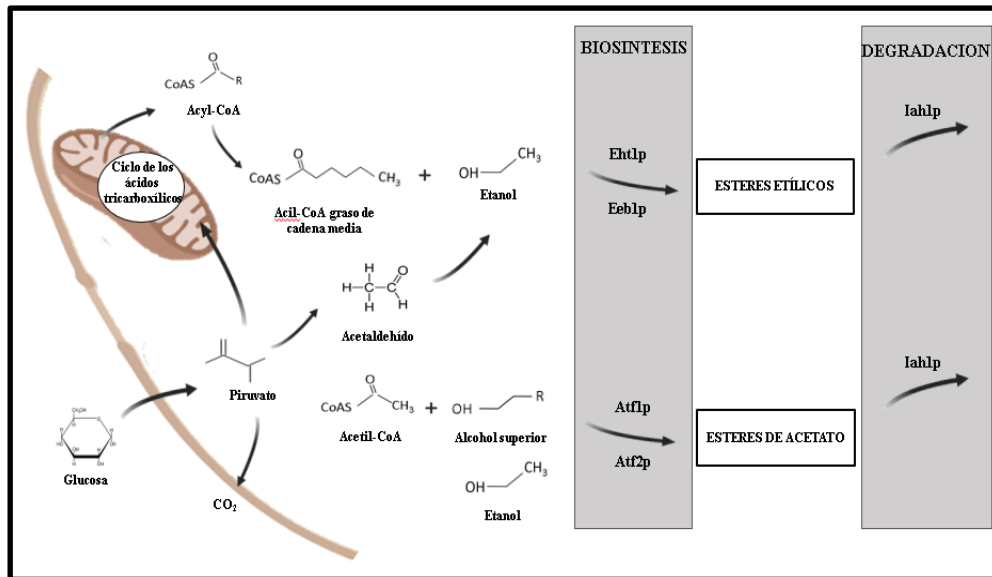


Figura 9. Representación esquemática de las rutas de formación de los ésteres por *Saccharomyces cerevisiae*.

En condiciones de anaerobiosis, la reacción entre acetil-CoA y etanol o alcoholes superiores conduce a la formación de ésteres de acetato como etil acetato, isoamil acetato, isobutil acetato, feniletil acetato, entre otros. Por el contrario, la combinación entre largas cadenas de acil-CoA y etanol produce ésteres etílicos como etil hexanoato, etil octanoato, etil decanoato, entre otros (Procopio *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2014).

Una vez los ésteres son sintetizados, ya pueden difundir a través de la membrana celular y ser excretados al medio. Esto ocurre debido a su carácter lipofílico. A pesar de este hecho, la excreción de los ésteres etílicos depende de su tamaño, de manera que a medida que éste aumenta, disminuye su transferencia al medio, generalmente, los ésteres de acetato se excretan rápidamente y casi en su totalidad (Verstrepen *et al.*, 2003).

Las principales enzimas responsables de la formación de ésteres de acetato son las alcohol acetil transferasas, Atf1p y Atf2p (Plata *et al.*, 1998; Mason y Dufour, 2000), Figura 9. La concentración final de ésteres de acetato, también, está influenciada por la presencia de estererasas, un grupo de enzimas hidrolasas que catalizan la descomposición de los ésteres o impiden su formación (Plata *et al.*, 1998). En particular, la enzima Iah1p juega un papel importante en la hidrólisis de acetato de isoamilo, acetato de etilo, acetato de isobutilo y acetato de feniletilo. La acetil transferasa Atf1p es responsable del 80 % de la síntesis de acetato de isoamilo, el 75 % de la producción de acetato de feniletilo y aproximadamente, el 40 % de la formación de acetato de etilo. También, se ha demostrado

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	56/186



que el gen *ATF1* de *S. cerevisiae* está fuertemente reprimido en condiciones altamente aeróbicas y por la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio (Malcorps *et al.*, 1991; Fujii *et al.*, 1997). Se ha descrito que la sobreexpresión del gen *ATF1* en la levadura aumenta significativamente la concentración de acetato de etilo, acetato de hexilo, acetato de isoamilo y acetato de feniletilo en los vinos (Lilly *et al.*, 2000). Por otro lado, las enzimas que catalizan la formación de ésteres etílicos son las llamadas Acil-CoA/etanol o aciltransferasas, donde se encuentran Eht1p y Eeb1p (Lilly *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2006). El grupo alcohol es etanol y los compuestos de Acil-CoA requeridos resultan del metabolismo de los ácidos grasos y la coenzima A libre bajo la participación de la sintetasa de Acil-CoA. Estas enzimas, a diferencia de las responsables de la formación de ésteres de acetato (Atf1p y Atf2p) no están bien definidas.

Saerens y colaboradores (2006) postularon que los niveles de butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo que se producen durante la fermentación disminuyen en una cepa con el gen *EEB1* delecionado, en comparación con los producidos por la cepa silvestre, cuyos porcentajes obtenidos fueron 36%, 88%, 45% y 40%, respectivamente. Por otro lado, la eliminación del gen *EHT1* no afectó la formación de butanoato de etilo y decanoato de etilo, y dio como resultado solo pequeñas disminuciones en la concentración de hexanoato de etilo (36%) y octanoato de etilo (20%). La doble delección de los genes *EHT1* y *EEB1* produjo niveles similares de butanoato de etilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo a los obtenidos con la cepa de delección simple *eeb1Δ*, y un nivel más bajo de octanoato de etilo, lo que indica que Eht1p juega un papel menor en la síntesis de ésteres etílicos, mientras que Eeb1p es la enzima más importante para la síntesis de estos compuestos volátiles. En base a estos resultados, las células de levadura deben contener una o más enzimas adicionales responsables de la síntesis de ésteres etílicos.

La tasa de formación de ésteres etílicos depende de dos factores: la concentración de los dos sustratos que son el acil-CoA y el etanol, y la actividad total de las enzimas involucradas en la síntesis e hidrólisis de los ésteres etílicos.

Un factor importante para comprender la influencia de los parámetros de fermentación en la producción de ésteres etílicos es la actividad total de las enzimas implicadas en su síntesis. Sin embargo, hay poca información disponible sobre el mecanismo regulador de estas enzimas. Karpichev y colaboradores (1998) descubrieron que los factores de transcripción Oaf1 y Pip2 están involucrados en la regulación transcripcional del gen *EEB1*. Ambos factores de transcripción son claves en la vía por la

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	57/186



cual varios genes de *S. cerevisiae* que codifican proteínas peroxisomales se activan en presencia de ácidos grasos como el oleato. Las dos proteínas forman un complejo heterodímero y se unen a unas secuencias de ADN que contienen tripletes CGG palindrómicos separados por un espaciador de 15 a 18 nucleótidos (Karpichev *et al.*, 1997; Rottensteiner *et al.*, 1997). Karpichev y colaboradores (1998) han demostrado que la expresión del gen *EEBI* se encuentra inducida por el oleato y es regulada por los factores transcripcionales Oaf1 y Pip2 de una manera similar a la que ocurre con los genes que codifican para las enzimas peroxisomales de  $\beta$ -oxidación (Karpichev *et al.*, 1998). Además, la expresión del gen *EEBI* también depende de la concentración de inositol presente en el medio de crecimiento, aunque aún no se conoce el mecanismo por el cual el inositol reprime la expresión *EEBI*.

### Ácidos carboxílicos

Los ácidos carboxílicos en el vino son muy importantes, ya que se utilizan como control del proceso de vinificación. Además, tienen una gran influencia en la estabilidad biológica y en las propiedades organolépticas de los vinos (Marce *et al.*, 1991). Dependiendo de la longitud de su cadena, éstos se encuentran en baja o elevada concentración en el vino, los que presentan de 4 a 6 átomos de carbono presentan baja concentración y los de 6, 8 y 10 átomos están presentes en concentraciones relativamente mayores (Webb *et al.*, 1967; Drawert *et al.*, 1974). La concentración de estos compuestos depende de la especie de levadura (Usseglio-Tomasset, 1967). Entre los ácidos de cadena corta destacan el ácido propiónico, ácido isobutírico y ácido hexanóico (Swiegers *et al.*, 2005; Abbas, 2006). Su concentración en los vinos oscila entre 100 y 500 mg/L, correspondiendo el 90% al ácido acético (Abbas, 2006).

El metabolismo del ácido acético en *S. cerevisiae* es complejo, implica la conversión de piruvato en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa que, posteriormente, se oxida a acetato por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (Remize, 2000; Pigeau Inglis, 2007). La concentración óptima de este ácido es 0.2-0.7 g/L (Corison *et al.*, 1979). En cantidades excesivas, el ácido acético confiere al vino un sabor picante y un aroma a vinagre desagradable (Vilela-Moura *et al.*, 2011). Su concentración se encuentra influenciada por el tipo de levadura, la carencia de algunas vitaminas y aminoácidos en el medio, las elevadas temperaturas de fermentación (25°C a 30°C), y los pH muy bajos inferiores a 3.1 o excesivamente altos superiores a 4.0

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	58/186



(Hidalgo, 2011). Este ácido acético constituye la clave principal para la formación de ácidos grasos, acetil-CoA, a través de la acción de la acetil-CoA sintetasa.

La producción de ácidos grasos de cadena media en los vinos espumosos depende de la cepa de levadura, de las condiciones de crecimiento y de los factores de estrés a los que la levadura se encuentre sometida (Torrens *et al.*, 2008). Sus cambios durante la fermentación pueden explicarse por el mecanismo de adsorción-desorción de las paredes celulares y por la hidrólisis enzimática o química de sus ésteres, relacionado con los fenómenos de autólisis de la levadura (Martínez-García *et al.*, 2017). Son producidos como intermediarios durante la biosíntesis de cadena larga de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos de cadena larga (C16 y C18) son esenciales para la síntesis de componentes lipídicos como mono, di y tri-acilgliceroles, fosfolípidos, esfingolípidos y una variedad de glicolípidos (Lambrechts y Pretorius, 2000). La levadura puede absorberlos e incorporarlos o bien sintetizarlos de *novo*. Su síntesis en la levadura *S. cerevisiae* se inicia con la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico proveniente del catabolismo de los azúcares, obteniéndose acetil-CoA. Comienza con la carboxilación de acetil-CoA mediante la adición de CO<sub>2</sub> y produce malonil-CoA, por la enzima acetil-CoA carboxilasa (codificada por los genes *ACCI* y *HFAI*). A continuación, se van añadiendo de forma secuencial unidades de dos átomos de carbono por la acción de dos sintetetas de ácidos grasos, Fas1p (subunidad β) y Fas2p (subunidad α), ambas localizadas en el citoplasma. El alargamiento de ácidos grasos hasta 26 átomos de carbono tiene lugar en el retículo endoplasmático. Los intermediarios pueden ser liberados en el transcurso de la elongación (C6-C14). En la desaturación de los ácidos grasos interviene un sistema enzimático complejo formado por Ole1p, localizado en el retículo endoplasmático.

### *Compuestos carbonílicos*

Los compuestos de carbonilo que comprenden aldehídos y cetonas representan, también, una fracción muy importante en el aroma de un vino. Se trata de otro grupo de compuestos clave, formados por la levadura durante el metabolismo de azúcares y α-cetoácidos, esenciales para la síntesis de aminoácidos y alcoholes superiores (Lambrechts y Pretorius, 2000). Sin embargo, solo unos pocos contribuyen al aroma de los vinos debido a su bajo umbral de percepción sensorial. Estos son acetaldehído, diacetilo, benzaldehído, 2-furfural y 5-hidroximetil-2-furfural.

El acetaldehído es el componente más importante y contribuye con más del 90% del contenido total de aldehídos en los vinos (Nykanen, 1986). A concentraciones

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	59/186



inferiores a 70 mg/L, el acetaldehído puede proporcionar un sabor afrutado al vino y un aroma agradable y afrutado; sin embargo, a concentraciones más altas de 100 a 120 mg/L puede proporcionar un sabor desagradable y herbáceo (Byrney Howell, 2017).

Este compuesto se produce durante la fermentación alcohólica mediante el metabolismo de los azúcares a través de la acción de la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH), pero el metabolismo de aminoácidos como alanina también contribuye a la formación de acetaldehído. Incluso, se puede producir una vez terminada la fermentación alcohólica a través de la oxidación del etanol. Su acumulación depende del equilibrio entre la enzima alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa (Romano *et al.*, 1994). Se trata de un compuesto extremadamente reactivo por lo que es capaz de unirse a proteínas y aminoácidos individuales generando una amplia variedad de compuestos. Además, es precursor de la síntesis de acetato, acetoína y etanol y alcanza sus valores más elevados de concentración en las primeras etapas de la fermentación.

La formación del acetaldehído se encuentra influenciada por las condiciones de crecimiento y la composición del medio (Lambrechts y Pretorius, 2000). La adición de elevadas concentraciones de dióxido de azufre durante la fermentación provoca un aumento considerable de la concentración de acetaldehído (Cassalone *et al.*, 1992).

Otro compuesto importante formado a partir del acetaldehído es 2,3-butanodiona, también denominado diacetilo. Se caracteriza por ser responsable del aroma y sabor a mantequilla de los vinos. Su concentración es generalmente baja en relación con su umbral de sabor (8 mg/L) (Swiegers *et al.*, 2005). El diacetilo se forma a través de la descarboxilación oxidativa de  $\alpha$ -keto-acetolactato proveniente de la unión de acetaldehído activo y una molécula de piruvato (Boulton *et al.*, 1995). Además, la levadura puede metabolizar este compuesto en acetoína y 2,3-butanodiona. Las levaduras sintetizan diacetilo durante la fermentación; sin embargo, principalmente, es producido por bacterias del ácido láctico (Laurent *et al.*, 1994).

### Lactonas

Las lactonas son otro grupo importante de compuestos aromáticos. Las lactonas son moléculas con un anillo de lactona. Se producen mediante esterificación intramolecular entre el grupo hidroxilo y carboxilo de un ácido graso hidroxilado (Abbas, 2006). Los cuatro-hidroxiácidos dan lugar a  $\gamma$ -lactonas y a partir de los 5-hidroxiácidos se obtienen las  $\delta$ -lactonas. Ambos tipos de lactonas constituyen los dos grupos principales

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	60/186



de lactonas. Aportan aromas a fruta madura (pera, melocotón, coco). Las diferencias estructurales debido al número de carbonos en el anillo y a la cadena lateral, a las insaturaciones y a la quiralidad influyen en la calidad del olor de estos compuestos (Pittet y Klaiber, 1975; Maga, 1976; Mosandl y Günther, 1989; Pickenhagen, 1989).

### *Terpenos*

Se han identificado aproximadamente 70 compuestos terpénicos en uvas y vino. La mayoría corresponden a monoterpenos, los cuales pueden encontrarse como hidrocarburos simples (limoneno, mirceno), aldehídos (linalal, geranial), alcoholes (linalol, geraniol), ácidos (ácido linálico, ácido geránico). Los terpenos producen aromas a rosa, geranio y floral, aunque algunos como  $\alpha$ -terpinene, p-cymene, mirceno y farnesol aportan al vino olores de resina o balsámicos (Swiegers y Pretorius, 2005).

La levadura es capaz de sintetizar los terpenos por la hidrólisis de enlaces glucosídicos, o bien, a través de la vía del ácido mevalónico. A partir de esta ruta se forma el pirofosfato de isopentenilo, también conocido como isopreno activo. La primera molécula terpenoide formada es el geranil pirofosfato (IV), esta molécula es la base para la síntesis de los mono-terpenos.

### *Fenoles volátiles*

Las sustancias fenólicas suelen ser cruciales para el sabor, el color y el olor de los vinos. Los fenoles volátiles presentan umbrales de percepción bajos por lo que pueden ser detectados fácilmente en el vino. Aunque pueden contribuir positivamente al aroma de algunos vinos, generalmente, son conocidos por su contribución negativa ya que se sabe que elevadas concentraciones de los compuestos 4-etilguiacol y 4-etilfenol aportan aromas a establo y cuadra mientras que 4-vinilguiacol y 4-vinilfenol producen aromas farmacéuticos (Swiegers *et al.*, 2005).

Estos compuestos están presentes en el mosto de uva, la levadura los produce durante la fermentación a través de la descarboxilación de ácidos como ácido p-cumárico y ferúlico, que dan lugar a la formación de 4-vinilguiacol y 4-vinilfenol, respectivamente (Swiegers *et al.*, 2005) en concentraciones adecuadas.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	61/186



### *Compuestos azufrados*

Los compuestos de azufre volátiles presentes en el vino otorgan aromas muy particulares, los más destacables son sulfuro de hidrógeno (aroma a huevo podrido), metanetiol y metilmercaptano (aroma a col cocida), dimetilsulfuro, dimetildisulfuro y dimetiltrisulfuro (aromas a col, coliflor y ajo), metiltioésteres (S- metiltioacetato, S- metiltiopropionato y S- metiltiobutanoato (aromas cocidos de coliflor, queso y cebollino) y los tioles volátiles afrutados (aromas de maracuyá, pomelo, grosella, guayaba) (Swiegers y Pretorius, 2005; Swiegers *et al.*, 2005).

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es uno de los principales compuestos azufrados. Se produce durante la fermentación por la reducción de sulfato. La levadura lo incorpora del medio a través de las permeasas de sulfato (Sul1p, Sul2p) y se reduce a sulfito que, posteriormente, se transforma a sulfuro por la acción de Met5p y Met10p (Spiropoulos y Bisson, 2000). Se trata de un compuesto muy reactivo, lo que puede provocar aromas desagradables en el vino. La concentración de este compuesto en el vino depende de la presencia de compuestos de azufre, de la cepa de levadura utilizada para la fermentación y las condiciones de la misma (Henschke y Jiranek, 1991; Rauhut, 1993; Spiropoulos y Bisson, 2000).

A diferencia de otros compuestos de azufre, los tioles volátiles pueden tener características aromáticas beneficiosas. Estos compuestos suelen estar unidos a cisteína o glutatión en las uvas y se liberan durante la fermentación por la acción de las enzimas Irc7p y Str3p que rompen el enlace carbono-azufre existente entre la cisteína y el tiol (Tominaga *et al.*, 1998). Los tres tioles volátiles más importantes son 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, 3-mercaptohexan-1-ol y acetato de 3-mercaptohexilo.

#### **1.6 Disciplinas Biómicas en Enología**

El vino y su estudio son temas bastantes complejos, ya que, actualmente, se calcula que el vino tiene más de 1.000 componentes aromáticos, la mitad de ellos producidos por las levaduras durante la fermentación. Entre los compuestos detectados en el vino, se debe señalar una gran variedad de moléculas de diversa naturaleza y estructura, por ejemplo, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, compuestos fenólicos, componentes volátiles y compuestos inorgánicos, entre otros. Cada uno de estos compuestos está presente en una concentración diferente. Además, la composición química del vino depende de muchos factores, entre los que destacan la variedad de uva,

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	62/186



el clima, las prácticas vitivinícolas, la ubicación geográfica, la cosecha, las cepas de levadura y los procesos de fermentación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

El desarrollo de la Biología Molecular y Celular ha propiciado el perfeccionamiento y desarrollo de nuevas técnicas biológicas y bioinformáticas. Estos avances suponen una visión global de los procesos biológicos. Este concepto de globalización se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como “La era Biómica”.

Las ciencias Biómicas se definen como un grupo de disciplinas cuyo objetivo es caracterizar y cuantificar de forma masiva grupos de moléculas biológicas en un organismo. Todas las disciplinas Biómicas se basan en el análisis de un gran volumen de datos, dependen de la bioinformática y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento. Estas nuevas tecnologías generan y agrupan esta información con el fin de obtener una visión lo más completa posible del sistema en estudio.

Las principales disciplinas Biómicas son la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, todas ellas son las denominadas Biómicas primarias; sin embargo, cuando se refieren a familias específicas, tales como lípidos, glicanos, compuestos exógenos o xenobióticos, incluso productos de su interacción, surgen las disciplinas Biómicas Secundarias (lipidómica, glicómica, xenometabolómica e interactómica, respectivamente), todas ellas derivadas de las Biómicas primarias.

Actualmente, las disciplinas Biómicas se aplican a una amplia variedad de campos de conocimiento, entre los que se encuentra la Enología. El uso de las ciencias Biómicas en el vino ha abierto nuevas oportunidades para la optimización de la producción, la obtención de una huella ambiental mínima, reducir los costos de producción y mejorar la calidad del vino resultante mediante una perspectiva más integral garantizando la calidad y la trazabilidad del vino (Gishen *et al.*, 2005; Fotakis *et al.*, 2013; Dambergs *et al.*, 2015).

En el campo de la Enología, la tendencia actual es integración de estas cuatro disciplinas para establecer relaciones entre las diversas respuestas proteómicas, transcriptómicas y genómicas con la producción de compuestos de sabor y aroma (metabolómica) durante el proceso de elaboración del vino (Rossignol *et al.*, 2009; Rossouw *et al.*, 2009; Rossouw *et al.*, 2010; García-Rios *et al.*, 2014; Moreno-García *et al.*, 2015a; Nadai *et al.*, 2016; Porras-Agüera *et al.*, 2019; Porras-Agüera *et al.*, 2020a y b).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	63/186





### 1.6.1 Genómica

La Genómica consiste en el estudio del contenido, la organización, la función y la evolución de la información molecular del ADN presente en un organismo, es decir, es el estudio del genoma completo. Este conocimiento permite poder identificar los genes contenidos y analizar sus funciones de forma detallada.

La Genómica se puede dividir, principalmente, en dos ramas, la Genómica estructural, que pretende caracterizar y determinar la conformación tridimensional de las proteínas; y la Genómica funcional, orientada hacia la recolección sistemática de información sobre las funciones de los genes. Trata de explicar el origen de un fenotipo determinado a partir de los cambios generados a partir de genes, proteínas y metabolitos mediante técnicas de análisis masivo.

Debido al enorme progreso en los métodos de secuenciación de próxima generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), la genómica comparativa se convirtió en un poderoso instrumento para estudiar el origen, la diversidad, la estructura de la población y la historia natural de *S. cerevisiae* y levadura relacionada (Marsit y Dequin, 2015; Borneman *et al.*, 2016; Gallone *et al.*, 2016). La secuenciación de genomas de levadura de vino es la principal herramienta contemporánea para dilucidar la naturaleza de las diferencias genéticas causales que sustentan la variación fenotípica observada de las cepas de levadura, para comparar los datos genéticos moleculares con las características industriales de las cepas de levadura, y para estudiar los mecanismos de la evolución del genoma de la levadura en condiciones de selección artificial (Bergström *et al.*, 2014).

### 1.6.2 Transcriptómica

La transcriptómica es la ciencia que estudia el conjunto de ARN existente en un sistema biológico, por lo que el transcriptoma es el conjunto completo de transcritos de un organismo o célula. Los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando bajo una determinada condición en un momento concreto. Comprender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los constituyentes moleculares de las células.

Los objetivos de la transcriptómica son catalogar todos los transcritos (ARNm, ARN no codificante y ARN pequeños), determinar la estructura transcripcional de los genes, los patrones de empalme y las modificaciones post-transcripcionales y cuantificar

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	64/186



los niveles de expresión cambiante de cada transcrito durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones.

Se han desarrollado varias tecnologías para deducir y cuantificar el transcriptoma basadas en la hibridación como los microchips de ADN (*microarrays*), métodos basados en secuencias (secuenciación por Sanger) o la secuenciación masiva (NGS) como RNA-seq (Rossouw *et al.*, 2008, Rossouw y Bauer, 2009, Rossouw *et al.*, 2010).

### 1.6.3 Proteómica

El objetivo de la proteómica es analizar los proteomas y su variabilidad. El proteoma es el conjunto de proteínas presentes en un organismo, en un estado de desarrollo específico y bajo ciertas condiciones ambientales. Este término fue propuesto por Marc Wilkins en 1994 durante la realización de su tesis doctoral (Wilkins *et al.*, 1995).

Los principales problemas a los que la proteómica ha tenido que hacer frente es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes en un sistema biológico y cómo hacer frente a la gran cantidad de información que genera esta tecnología, lo que complica la selección e interpretación de los resultados obtenidos. Sin embargo, los estudios proteómicos han experimentado un aumento en las últimas décadas debido al desarrollo de técnicas analíticas y bioinformáticas que permiten la separación de una gran cantidad de proteínas, su identificación y cuantificación. De esta manera, para alcanzar la máxima resolución en los resultados, las muestras deben ser fraccionadas antes de su identificación por espectrometría de masas. La espectrometría de masas (MS) resulta indispensable para la caracterización del proteoma por su velocidad, precisión y sensibilidad. El éxito de los análisis proteómicos depende, en gran medida, de la calidad del fraccionamiento de la muestra empleado antes del análisis por MS. Los métodos más utilizados para el fraccionamiento de proteínas son la electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE) y la cromatografía líquida multidimensional (MDLC). Más recientemente, la técnica libre de geles (OFFGEL).

- La electroforesis bidimensional fue desarrollada en la década de los 70 por varios grupos (Klose, 1975; O'Farrell, 1975; Scheele, 1975); sin embargo, su uso no se generalizó hasta los años 80 cuando se introdujo la técnica para generar gradientes de pH inmovilizados (IPG) que permitió aumentar la reproducibilidad entre geles y la creación de bases de datos de geles bidimensionales (Bjellqvist *et al.*, 1982). Consiste en la sucesión de dos electroforesis distintas realizadas sobre la misma

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	65/186



muestra: i) separación de las proteínas por carga eléctrica (isoelectroenfoque, IEF) de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) en un gradiente continuo de pH; ii) la separación proteica según su peso molecular en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). La visualización de las proteínas en el gel se realiza de acuerdo a varios métodos de tinción de geles como son tinción con nitrato de plata o azul de Coomassie, fluorescentes (SYPRO) o radiactivos. Resultando un mapa de manchas o *spots* distribuidos en dos dimensiones, permitiendo de esta manera un análisis cuantitativo basado en la intensidad de la señal de los *spots*.

- La cromatografía multidimensional de identificación de proteínas (*MudPIT*, *multidimensional protein identification technology*) se basa en la combinación de distintas columnas de cromatografía, dispuestas de manera secuencial. Se trata de una técnica más rápida, más sensible y con una elevada reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes tipos de muestras y condiciones (Florens y Washburn, 2006).
- La electroforesis OFFGEL es un avance reciente en la tecnología de separación de la primera dimensión para fraccionar proteínas según su punto isoeléctrico (pI) (Michel *et al.*, 2003; Heller *et al.*, 2005). El valor de pI de cada proteína o péptido proporcionado se utiliza como una herramienta independiente de validación y filtrado durante la búsqueda en la base de datos para la identificación de secuencias de péptidos MS/MS (*Tandem mass spectrometry* - Espectrometría de masas en tándem) (Cargile *et al.*, 2004). Esta técnica logra la misma alta resolución que las técnicas 2D, pero proporciona fracciones con mayor riqueza de proteína (gran capacidad de carga desde 50 µg a 5 mg de muestra para aplicaciones analíticas y proporciona un máximo enriquecimiento de proteínas de baja abundancia), un mayor rendimiento (hasta 16 muestras en paralelo en dos bandejas) y permite la recuperación de la muestra en fase líquida (Essader *et al.*, 2005; Horth *et al.*, 2006). Además, todos los aditivos pueden eliminarse fácilmente después del fraccionamiento, con el fin de evitar la interferencia con otras técnicas como nanoelectrospray y detección MS.

### Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) se desarrolló en los años 70 por la aparición de diversas técnicas de ionización suave (desorción por campo eléctrico, desorción por

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	66/186



plasma o ionización por bombardeo con átomos rápidos) (Karas y Hillenkamp, 1988). En los años 90, surgió dos nuevos métodos de ionización suave, el electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) y la ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), ambos constituyen los pilares básicos de la espectrometría de masas en la proteómica.

En la espectrometría de masas, los analitos son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), ello permite calcular su masa molecular con gran precisión. En primer lugar, las moléculas son convertidas en iones en fase gaseosa para, posteriormente, ser introducidos al analizador de masas. Existen varios métodos de ionización, pero sólo los métodos de ionización suave permiten el análisis (MALDI y ESI).

- MALDI: el compuesto se mezcla en una matriz orgánica ionizable en presencia de un disolvente orgánico. Posteriormente, el compuesto o analito se deposita sobre una placa metálica, la cual se introducirá en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Una vez la muestra es ionizada, el haz de iones es enfocado y dirigido hacia el analizador de masas, que los separará de acuerdo a su relación  $m/z$ . En muchos casos, MALDI tiene acoplado analizadores de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*).
- Una variante tecnológica de MALDI es la desorción/ionización mediante láser de superficie (SELDI, *Surface-enhanced laser desorption/ionization*). En ella, los péptidos interaccionan con diferentes soportes cromatográficos antes de ser ionizados por el láser.
- ESI: consiste en una técnica de ionización a presión atmosférica en la que la muestra está en solución y se hace pasar a través de un fino capilar metálico. Al salir se produce una nebulización por la aplicación de un fuerte campo eléctrico. La liberación de los péptidos y/o proteínas protonados a la fase gaseosa tiene lugar al evaporarse, por desorción del campo eléctrico o por evaporación del solvente, esas microgotas que salen del capilar. A continuación, los iones generados son acelerados en un campo eléctrico hacia el analizador de masas.

Una vez obtenidos los iones, entran en el analizador de masas donde son sometidos a campos magnéticos y/o eléctricos cuya finalidad es su superación de acuerdo a su relación  $m/z$ . Destacan:

- TOF: los iones acelerados adquieren diferentes velocidades según su  $m/z$  por lo que presentan distintos tiempos de vuelo para recorrer una determinada distancia. Este tiempo de vuelo es medido por un reloj que se activa por el pulso del láser.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	67/186



- Cuadrupolo: se trata de un analizador con cuatro barras paralelas de sección hiperbólica en la cara interna (de 15-20 cm de largo y 0.5 cm de radio), separadas entre sí, aproximadamente 2 cm. A estas barras se le aplica un potencial de corriente continua y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto, creando en su interior un campo cuadrupolar. Los iones son sometidos a este campo cuadrupolar haciéndolos oscilar y desviándolos en función de su relación  $m/z$ .
- Trampa iónica: permite el aislamiento de iones dentro de una pequeña cámara debido al uso de campos eléctricos (Orbitrap) o magnéticos (Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR). Dependiendo del voltaje de los electrodos presentes en la trampa iónica, los iones de una determinada  $m/z$  quedarán retenidos en el electrodo central y ajustando el voltaje se permite la expulsión selectiva de los iones hacia el detector.

Los métodos más utilizados para la identificación proteica son la huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*) y la secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

#### 1.6.4 Metabolómica

El metaboloma es el conjunto de metabolitos sintetizados por un organismo, fue definido por primera vez en 1998 (Oliver *et al.*, 1998). El metaboloma está influido por diversos factores intrínsecos y extrínsecos, por lo que es necesario conocer el metaboloma para comprender el estado del organismo y cómo le afecta su entorno. Por lo tanto, podría definirse la metabolómica como la ciencia que identifica y cuantifica el conjunto de metabolitos tanto intracelulares como extracelulares de un organismo.

La metabolómica presenta importantes ventajas para el estudio de un organismo con respecto al resto de las Biómicas, la existencia de plataformas analíticas robustas, estables y precisas para el análisis de un número importante de metabolitos y los bajos costes de los análisis en comparación con los realizados en las otras disciplinas Biómicas. Además, el tiempo de análisis puede ser más corto, dependiendo del análisis realizado. Estas ventajas permiten llevar a cabo estudios a gran escala y extensos proporcionando gran cantidad de información.

A pesar de ello, no deja de ser una disciplina compleja debido a que los metabolitos son moléculas muy diferentes químicamente y están presentes en el organismo en un amplio intervalo de concentraciones muy variadas (de picomoles a milimoles), por lo que es necesario la aplicación de técnicas muy diversas tanto para la

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	68/186



preparación de la muestra como para el análisis de los metabolitos en cuestión, distinguiéndose diferentes estrategias analíticas (Fiehn, 2002; Kell *et al.*, 2005):

- Análisis diana o dirigido (*targeted analysis*): va dirigida exclusivamente a un metabolito en concreto cuando existe un conocimiento previo de dicho compuesto.
- Perfil metabólico (*untargeted analysis*): consiste en la detección, identificación y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible presentes en un sistema biológico bajo unas condiciones de estudio, para obtener una visión global. La detección de estos metabolitos puede hacerse mediante resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) o espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS), junto con cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC), cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*, LC) o electroforesis capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE).
- Huella dactilar metabólica (*metabolomics fingerprinting*): se emplea para la clasificación de forma rápida según el origen o la relevancia de los metabolitos.
- Huella pedicular metabólica (*metabolomics footprinting*): estudia los metabolitos presentes en el medio extracelular.

En metabolómica, las técnicas más utilizadas son la espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. La NMR está basada en las diferencias de contraste que producen los espacios vecinos a los núcleos atómicos dentro de un intenso campo magnético, mientras que la espectrometría de masas está basada en la ionización y posterior fragmentación y detección de los iones formados por los analitos de interés. Generalmente, estas técnicas suelen ir acompañadas por técnicas de separación analíticas como cromatografía de gases o de líquidos.

### *Espectroscopía de RMN*

La espectroscopía de RMN se utiliza, particularmente, para llevar a cabo análisis de metabolitos en vino ya que se trata de una técnica muy rápida y no destructiva y proporciona un método de alto rendimiento que requiere una preparación mínima de la muestra (Gougeon *et al.*, 2019). Las muestras de vino se someten directamente a análisis

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	69/186



de RMN con la adición de disolvente deuterado, o bien, se liofilizan para eliminar el agua y luego se diluyen en disolvente de RMN (Alañón *et al.*, 2015).

Los espectros obtenidos por RMN son complejos y contienen miles de señales relacionadas con los metabolitos, lo que dificulta la identificación de compuestos distintos en aquellas muestras que contienen gran cantidad de metabolitos debido a que los picos se superponen o las constantes de acoplamiento son similares. Para hacer frente a este desafío surgió la RMN bidimensional (RMN-2D). La agregación de una nueva dimensión proporciona datos complementarios para interpretar los espectros de una manera más fácil y completa (Alañón *et al.*, 2015).

### *Cromatografía líquida*

La cromatografía de líquidos es una técnica de fraccionamiento que permite separar los componentes de una muestra según sus propiedades físicas y/o químicas.

Los solutos son arrastrados por una fase móvil líquida que fluye a través de una columna cromatográfica, que contiene una fase estacionaria. Consiste en introducir la muestra en la corriente de la fase móvil y según la afinidad de cada componente, éste eluye a un tiempo diferente (los que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria presentan un tiempo de retención mayor frente a los que son retenidos más débilmente). Dependiendo de la fase estacionaria, existen diferentes tipos de cromatografía líquida, siendo las más habituales la cromatografía de absorción, de intercambio iónico, de fase reversa y de exclusión molecular. Se trata de una técnica más versátil que la GC, ya que el intervalo de metabolitos detectados es más amplio puesto que no se requiere la volatilidad de los compuestos y no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra, como en el caso de la cromatografía de gases.

La cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) fue desarrollada para aumentar la eficacia de la separación e incrementar la resolución de la cromatografía líquida. En esta técnica, la fase móvil es impulsada por un sistema de bombeo de alta presión, lo que permite el uso de una fase estacionaria más compacta y con un tamaño de partícula más pequeño (2 - 5  $\mu\text{m}$ ).

Alternativamente, la aplicación de un sistema ultra-HPLC (UHPLC) mejora la resolución cromatográfica y la capacidad máxima simultáneamente, mientras que el tiempo de análisis se reduce gracias al uso de partículas más pequeñas en la fase estacionaria.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	70/186



La principal aplicación de HPLC en los estudios de vinos es el análisis de compuestos fenólicos con fines de discriminación, caracterización o monitoreo (Bustos *et al.*, 2012; Tasev *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017).


### *Cromatografía de gases*

A diferencia del resto de cromatografías, en la cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución de los compuestos se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, el cual no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Estos analitos deben ser suficientemente volátiles y térmicamente estables.

Es una de las técnicas más utilizadas debido a su alto poder de separación y reproducibilidad. Sin embargo, su principal inconveniente es el manejo previo de la muestra antes del análisis, para mejorar la volatilidad y la estabilidad térmica de los metabolitos.

Se utilizan varias técnicas para garantizar la caracterización completa de los compuestos volátiles presentes en uvas y vinos: i) muestreo dinámico del espacio superior (Ríos-Reina *et al.*, 2018); ii) extracción en fase líquida (Liu *et al.*, 2020); iii) extracción en fase sólida (Fontana y Bottini, 2017); iv) la extracción sorptiva de la barra agitadora (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) que permite la extracción directa del analito (Ubeda *et al.*, 2016; Picard *et al.*, 2018).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	71/186





# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	72/186



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación de la Tesis Doctoral

La levadura *S. cerevisiae* tiene una amplia aplicación en diferentes áreas de la Biotecnología, se considera el microorganismo principal asociado a procesos fermentativos como la fermentación alcohólica y es, además, uno de los organismos modelo utilizados en Biología Molecular. Al ser el organismo eucariota que mejor se conoce actualmente, se dispone de mucha información sobre la expresión génica, esto ha favorecido la postulación de modelos globales de regulación génica y metabólica. Sin embargo, la mayor parte de esa información disponible hace referencia únicamente al estudio de cepas de laboratorio. Un conocimiento más extenso del metabolismo de *S. cerevisiae* en condiciones de fermentación puede ser inmensamente útil en vías de diseñar estrategias para mejorar la calidad de los vinos elaborados.

Los avances en el campo de las técnicas analíticas conllevan cada vez de forma más precisa la obtención de una gran cantidad de datos en poco tiempo y sin la necesidad de manipular las muestras en exceso. Con ello, también ha adquirido una enorme importancia la aplicación de herramientas estadísticas potentes para tratar los datos obtenidos en dichos análisis. De este modo, han surgido diversas aplicaciones quimiométricas que han permitido establecer perfiles de aromas o huellas (huella digital metabólica) para cada tipo de vino. Entre ellas, destaca la aplicación de técnicas de análisis potentes en la identificación y cuantificación de muchos compuestos volátiles y no volátiles en el vino. Consecuentemente, también, se aplican aquéllas que se encargan de la interpretación de resultados, incluyendo el origen biológico y bioquímico de dichos compuestos. Todas estas técnicas se engloban dentro del ámbito denominado estudio metabólico del vino o eno-metabólica, que constituye un área emergente de estudio. La aplicación de las ciencias Biómicas en Enología y, en particular, de la metabólica y de la proteómica, han supuesto un gran avance con mucho interés para la comprensión del funcionamiento de las levaduras en diferentes medios fermentativos y de los metabolitos que aportan al vino.

La identificación de proteínas, así como de las moléculas producidas y excretadas al medio por la levadura constituyen un progreso importante para la detección de problemas relacionados con la calidad y seguridad. Por tanto, el conocimiento exhaustivo del comportamiento metabólico y proteómico de las levaduras fermentativas es

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	73/186



fundamental, y puede contribuir a la mejora ostensiblemente de las características organolépticas necesarias para la obtención de un producto de alta calidad. Indudablemente, las interacciones funcionales entre proteoma y exo-metaboloma de las levaduras conducirán en un futuro muy próximo a diseñar estrategias para perfeccionar la calidad de las bebidas fermentadas, además de identificar nuevas aplicaciones de las levaduras.

Por dichas razones, este proyecto de Tesis Doctoral basa su hipótesis de partida en el empleo de dos cepas de *S. cerevisiae*, una convencional y otra no convencional para la elaboración de cava, así como comparar y estudiar el efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub> a nivel proteómico y metabolómico durante la etapa de “*prise de mousse*” en la producción de vinos espumosos.

Se aborda un proyecto innovador sobre un tema de estudio hasta el momento desconocido y cuya originalidad reside en la utilización de una levadura no convencional para producir un tipo nuevo de vino espumoso y el establecimiento de relaciones entre los metabolitos presentes en los vinos espumosos con el proteoma de la levadura. Además de proporcionar una plataforma de conocimiento para futuras investigaciones que contemplen estudios genéticos y actividad enzimática, así como estudios transcriptómicos y sensoriales. Este conocimiento surge de la necesidad de seleccionar levaduras capaces de realizar la segunda fermentación y de tolerar los diversos estreses a los que están sometidas. Creemos que la tolerancia al estrés es un buen criterio para seleccionar levaduras de interés enológico. Una mejor comprensión del metabolismo de la levadura, su adaptación y su comportamiento en las condiciones típicas de la segunda fermentación es necesaria para el proceso de selección de cepas y la mejora de su aplicación en la industria del vino, y puede ser interesante para el control de calidad y mejora del proceso de vinificación.

## 2.2 Objetivos

### *Objetivo general*

El objetivo general del proyecto de Tesis Doctoral es estudiar los procesos biológicos y las rutas metabólicas más importantes de levaduras vínicas durante la producción de cava que conducen a la producción de metabolitos que afectan a la calidad de los vinos espumosos, concretamente el Cava.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	74/186



A partir del estudio metabólico y proteómico será posible conocer en mayor profundidad el flujo del carbono y del nitrógeno de la levadura, así como los exometabolitos excretados al medio. Con ello, se pretende añadir un aporte científico interesante al diseño de nuevas estrategias para el perfeccionamiento de la producción de vinos espumosos, además de la mejora genética de levaduras vínicas.

### **Objetivos específicos**

Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar el flujo de los compuestos del carbono de levaduras y de las enzimas implicadas durante la producción de cava.
- II. Identificar las proteínas implicadas en el metabolismo de los compuestos del aroma, en especial los ésteres, durante la producción de cava que afectan a la calidad de estos vinos.
- III. Analizar los procesos biológicos más importantes afectados por la presión de CO<sub>2</sub> durante la segunda fermentación en botella.

### *Artículos correspondientes a cada objetivo:*

- Objetivo 1. “Comparative study of the proteins involved in the fermentation-derived compounds in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* during sparkling wine second fermentation”. González-Jiménez et al., (2020). *Microorganisms*, 8, 1209. Doi: 10.3390/microorganisms8081209. Rango de categoría JCR: 37/134 (Q2) en “Microbiología”.
- Objetivo 2. “Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration”. González-Jiménez et al., (2020). *Microorganisms*, 8, 403. Doi: 10.3390/microorganisms8030403. Rango de categoría JCR: 37/134 (Q2) en “Microbiología”.
- Objetivo 3. “Biological processes highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the sparkling wines elaboration”. Este artículo está publicado en la

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	75/186



revista científica *Microorganisms*. González-Jiménez et al., 2020. *Microorganisms*, 8, 1216. Doi: 10.3390/microorganisms8081216. Rango de categoría JCR: 37/134 (Q2) en “Microbiología”.


Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten confirmar la hipótesis de partida, así pues, se podría utilizar una levadura no convencional, en este caso una levadura formadora de velo de flor para la elaboración de vinos espumosos, en particular, cava. El uso de una levadura flor para la producción de vino espumoso sería interesante debido a su alta tolerancia al etanol y a sus propiedades adhesivas que facilitan su mejor recuperación en la fase "degüelle", lo que hace que la levadura de flor sea adecuada para una segunda fermentación en botella. Esto significaría, no solo una reducción en los costos y tiempo de producción, sino también un aumento en la biodiversidad de las cepas de levadura para la producción de vinos espumosos.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	76/186



# MATERIALES Y MÉTODOS

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	77/186



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos

Se usaron dos cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: la P29 (CECT11770) es típica de vino espumoso utilizada para la segunda fermentación en botella cerrada, aislada de la denominación de origen protegida (DOP) de Vilafranca del Penedès, Barcelona (España) por el Instituto Catalán de la Viña y el Vino (INCAVI). Y la cepa G1 (ATCC: MYA-2451), se trata de una levadura formadora de velo, aislada a partir de un velo de vino fino de la DOP de Montilla-Moriles en Córdoba (España) por miembros del Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba (UCO).

#### 3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento, aclimatación, viabilidad celular, así como para la realización de los diferentes experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo utilizados.

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Composición</i>	<i>Descripción</i>
<i>Agar Sabouraud-cloranfenicol</i>	4% (p/v) glucosa, 1% (p/v) pluripeptona, 1.5% (p/v) agar, 0.005% (v/v) cloranfenicol, pH 5.6	Test de viabilidad
<i>Mosto pasteurizado</i>	variedad de uva Macabeo, 174.9 g/L glucosa, 3.6 g/L acidez total, pH 3.4	Aclimatación de levaduras
<i>Vino base comercial estandarizado</i>	Chardonnay (6:4), 0.3 g/L glucosa, 10.21 % (v/v) etanol, 5.4 g/L acidez total, 0.21 g/L acidez volátil, pH 3.29	Segunda fermentación
<i>YPD</i>	1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) dextrosa, 2% (p/v) agar	Crecimiento de levaduras

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	78/186



Todos los experimentos se realizaron por triplicado y, previamente, el material se esterilizó por calor húmedo a 120°C durante 20 min en autoclave a 1 atm, excepto aquellos medios que contenían etanol, el cual se añadió, con posterioridad, mediante filtración.

### 3.3 Experimentación y condiciones de estudio

El preinóculo de cada cepa de levadura de *S. cerevisiae* (P29 y G1) se realizó en matraces que contenían 50 mL de medio a 21 °C durante 48 h. A partir del preinóculo, se midió la concentración celular mediante un contador electrónico de partículas Beckman Coulter Z2 (USA), para ello se tomó 0.1 mL de cada muestra, previamente diluida, y se mezcló con 39.9 mL de solución de isotón, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de Beckman Coulter. A continuación, las células de levadura procedentes de los medios de YPD del preinóculo se centrifugaron a 4600 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Rotina 38R (Kirchleugern, Germany) y se lavaron con agua destilada estéril, para inocular  $1 \times 10^6$  células/mL en matraces que contenían 300 mL de mosto pasteurizado (variedad de uva Macabeo, 174.9 g/L glucosa, 3.6 g/L acidez total, pH 3.4). Las cepas se inocularon por triplicado en el mosto. Seguidamente, estos medios se incubaron en un agitador-incubador Infors AG durante 5 días a 21 °C y a una agitación suave de 100 rpm, teniendo lugar así, la aclimatación de las levaduras para la segunda fermentación. Una vez alcanzados unos valores elevados de concentración celular (P29:  $144 \times 10^6$  células/mL; G1:  $104 \times 10^6$  células/mL) y una viabilidad del 97% en la cepa P29 y del 90% en la cepa G1, se realizó el conteo de células viables en placas en medio YPD incubadas a 28 °C durante 48 h, mediante la técnica de diluciones seriadas. Además, se procedió a la medición de las concentraciones de azúcar y etanol presentes en el medio, mediante el uso de kits enzimáticos (kit D-Glucosa/D-Fructosa No. 10139106035; kit etanol No. 10176290035) Boehringer Mannheim/R-Biopharm. Cuando se alcanzó un contenido en etanol de 10.39 % (v/v), se procedió al llenado de las botellas para la etapa de tiraje. Las botellas de 750 mL se inocularon con  $1.5 \times 10^6$  células/mL, junto con un vino base comercial estandarizado (Macabeo-Chardonnay, 6:4) y 21 g/L de sacarosa. La segunda fermentación se realizó en una cámara termostaticada a 14 °C en botellas con un volumen de 750 mL.

Para estudiar el efecto del CO<sub>2</sub> liberado por las levaduras durante este proceso de fermentación, las botellas se dividieron en grupos. Se usaron tres botellas para los análisis

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	79/186





proteómicos y metabolómicos en cinco puntos de muestreo, con un total de 15 botellas para cada cepa.

Para la condición de sobrepresión de CO<sub>2</sub>, denominada P (+), las botellas se sellaron herméticamente con un tapón de plástico y una cápsula de corona metálica. Mientras que las botellas pertenecientes a la condición sin sobrepresión de CO<sub>2</sub>, denominada P (-), se cerraron con un obturador perforado evitando de este modo la acumulación de gas CO<sub>2</sub> en el interior de la botella.

Durante el proceso de fermentación, se tomaron los siguientes puntos de muestreo para la condición con sobrepresión de CO<sub>2</sub>: (a) al comienzo de la inoculación en el vino base, BW; (b) a mitad de la segunda fermentación, MF (presión de 3 atm); (c) al final de la segunda fermentación, EF (6,5 atm). Al mismo tiempo, se tomaron muestras de la condición sin sobrepresión de CO<sub>2</sub>, cuando se obtuvo un contenido de azúcar consumido y etanol producido similar para ambas condiciones: consumo de azúcar (MF: 9.07 ± 0.26 g/L y EF: 0.3 ± 0.0 g/L) y contenido en etanol (MF: 10.74 ± 0.03 % (v/v) y EF: 11.56 ± 0.04 % (v/v)). La presión se midió con un afrómetro (Oenotilus, Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France) acoplado a las botellas.

La viabilidad celular se realizó por triplicado, en tres botellas elegidas al azar de cada tiempo y tras homogenizar el contenido, se efectuaron las correspondientes diluciones seriadas con solución Ringer. A continuación, se dispensó volúmenes de 100µL de cada suspensión diluida en cajas de Petri con Agar Sabouraud-cloranfenicol y se contaron las colonias después de 48 h a 28 °C.

### 3.4 Análisis proteómico

#### 3.4.1 Extracción de proteínas

Se utilizó un total de 2x10<sup>9</sup> células/mL de cada condición contadas con el contador de partículas Beckman Coulter Z2 (USA) para la extracción de proteínas. Las células se recogieron de cada botella mediante centrifugación a 4500 x g durante 10 minutos mediante una centrífuga Rotina-38 (Kirchleugern, Germany), se lavó el sedimento dos veces con abundante agua destilada fría y estéril. Y se resuspendieron en 1mL de tampón de extracción compuesto por 100 mM Tris-HCl a pH 8, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT y 1

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	80/186



mM PMSF, suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas proporcionado por Roche, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células de levadura se rompieron por una técnica mecánica en Vibrogen Cell Mill V6 (Edmund Bühler, Alemania) usando bolas de vidrio de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sigma-Aldrich). Consistió en someter a las células a pulsos de 1 minuto intercalados con 30 segundos en hielo. Las bolas de vidrio junto con los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4 °C. Para la precipitación de las proteínas, las muestras se incubaron toda la noche a -20 °C tras la adición de cuatro volúmenes de acetona fría y de 10 % (p/v) de ácido tricloroacético al sobrenadante. Una vez terminada la incubación, las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 30 min a 4 °C, se recogieron los sedimentos, y se concentraron y secaron al vacío en un evaporador centrífugo o SpeedVac (Eppendorf), que se resuspendieron en tampón de solubilización, compuesto por 8M urea, 2M tiourea, 4% (p/v) CHAPS (3-[(3-Cholamidopropil) dimetilammonio]-1-propanesulfonato) y 1% (p/v) ditiotreitól. La estimación de la concentración proteica se llevó a cabo mediante el ensayo de Bradford (1976). Previamente a la realización de dicho análisis, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 3.4.2 Separación e identificación de proteínas

La técnica usada para la separación de proteínas según su punto isoeléctrico en solución se realizó utilizando el fraccionador de alta resolución OFFGEL Kit de pH 3-10 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Para ello, las muestras de proteínas se solubilizaron en tampón de fraccionamiento Protein OFFGEL que contiene urea, tiourea, DTT, glicerol y tampón con anfólitos (Agilent Technologies, No 5188-6444). Las alícuotas se distribuyeron en el fraccionador OFFGEL 3100 también de Agilent Technologies, de acuerdo con las instrucciones del proveedor, en una bandeja con 12 pocillos, donde se cargaron 500 $\mu\text{g}$  de proteína total. Los límites de separación del programa OG12PR00 que se utilizaron fueron: 4500 V, 200 mW y 50  $\mu\text{A}$ ; comenzando con un voltaje de 200-1500 V; el voltaje de finalización 5000-8000 V; y un voltaje constante para las zonas de separación de proteínas después de la aplicación de 20 kVh.

Previamente al análisis de las proteínas, éstas se digirieron con tripsina, peptidasa que digieren específicamente en residuos de lisina y arginina. Para ello, se añadió a la

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	81/186



muestra ditiotreitól 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio (AB) incubado durante 20 min a 55 °C para trabajar en condiciones reductoras, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La alquilación de los tioles libres se realizó añadiendo 40 mM de yodoacetamida en 25 mM de AB en oscuridad durante 20 min. La digestión proteolítica se llevó a cabo mediante la adición de 12.5 µg/L de tripsina (Promega) en 25 mM de AB, finalmente, se dejó incubando toda la noche a 37 °C. La digestión trípica se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético a una concentración final de 1% (v/v) y las muestras digeridas, finalmente, se secaron al vacío en un SpeedVac (Eppendorf).

A continuación, las proteínas se analizaron en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipado con un sistema nano LC Ultimate 3000 (Dionex, Germering, Alemania). La tensión de electrospray se fijó a 1300 V y la tensión capilar a 50 V a 190 °C. El LTQ Orbitrap se hizo funcionar en modo paralelo, lo que permitió una medición precisa del ion precursor (400-1500 m/z) en la selección Orbitrap y proporcionó 60.000 de ancho completo en una resolución media máxima (FWHM) m/z 400 concurrente con la adquisición de tres CID dependiente de los datos escaneados de MS/MS en la LIT para la secuencia del péptido, seguido de tres datos escaneados HCD MS/MS (100-2000 m/z) con resolución 7500 FWHM m/z 400 para la secuenciación de péptidos y cuantificación.

La energía de colisión normalizada que se utilizó fue 40% para HCD y 35% para CID. Los tiempos máximos de inyección para MS y MS/MS fueron 50 y 500 ms, respectivamente. El ancho de aislamiento del precursor fue 3 Da y el ancho de masas de exclusión se estableció a 5 ppm. Se permitió la selección del precursor monoisotópico y se excluyeron las especies que tenían una sola carga. El umbral mínimo de intensidad para MS/MS fue de 500 cuentas para la trampa de iones lineal y 8000 para el Orbitrap.

Se realizó una búsqueda en la base de datos Proteoma Descubridor v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific Software, San Jose, California, USA.) frente a la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y se incluyó la modificación fija de carbamidometilación en el aminoácido cisteína y los resultados del proteoma se analizaron estadísticamente mediante el mismo *software*.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	82/186



### 3.4.3 Contenido proteico

La concentración de todas las proteínas obtenidas en las condiciones de estudio se comparó mediante el índice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente (emPAI) (Ishihama *et al.*, 2005). Su valor se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula matemática:

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

El valor PAI (índice de abundancia de proteínas) se obtiene de la división del número de péptidos observados, proporcionado por la fragmentación MS/MS, entre el número de péptidos observables, proporcionado por el *software* MS Digest desde la página web: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>

$$\text{PAI} = \frac{\text{número de péptidos observados}}{\text{número de péptidos observables por proteína}}$$

Los espectros de fragmentación que coinciden con la misma secuencia de péptidos, con un estado de carga o modificación diferente, o que contienen un máximo de tres sitios de escisión perdidos se contaron por separado. Los contenidos relativos de proteínas en cada condición se calcularon a partir de:

$$\text{Contenido proteico (mol\%)} = \frac{\text{EmPAI}}{\sum \text{EmPAI}} \times 100$$

### 3.4.4 Tratamiento proteómico. Filtrados en distintas bases de datos

Para llevar a cabo una selección más confiable de las proteínas totales, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección (Dasari *et al.*, 2010): i) *Score* > 2; ii) Número de péptidos observados  $\geq 2$ .

Después de la identificación y cuantificación de las proteínas se realizó una selección de proteínas dependiendo del objetivo del trabajo de acuerdo con la terminología Gene Ontology (GO) de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* o SGD (<http://www.yeastgenome.org>) y de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

Para la clasificación de proteínas de acuerdo a su implicación en cada tipo de proceso biológico se llevó a cabo utilizando la herramienta “GO Slim Mapper” proporcionada por la base de datos SGD. Esta herramienta asigna anotaciones de un grupo

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	83/186



de genes a términos más generales y/o los agrupa en categorías amplias, es decir, términos de GO Slim, en este caso, GO Slim genéricos. Consisten en términos GO amplios y de alto nivel del proceso biológico, la función molecular y las ontologías de componentes celulares seleccionados y mantenidos por el Consorcio de Ontología Genética (GOC). Los ‘Términos GO’ son términos descriptivos que permiten relacionar cada producto genético con un contexto de proceso molecular, celular y biológico, proporcionando un valor estadístico ( $p$ -value). Este parámetro estadístico se basa en la probabilidad o posibilidad de encontrar al menos “x” número de marcos de lectura abierto u ORF (*open reading frame*) del total “n” ORFs en la lista anotados a un término GO particular, dada la proporción de genes en todo el genoma que están anotados a ese término GO. Por otro lado, se empleó la herramienta “*GO Term Finder*” de SGD para la clasificación y filtrado de proteínas mediante términos GO. Este estudio estadístico se realizó con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.01.

### 3.5 Análisis metabólico

#### 3.5.1 Determinaciones de parámetros enológicos y de color

Los parámetros enológicos, generalmente, usados en la caracterización del vino (etanol, azúcar residual, acidez total, acidez volátil, dióxido de azufre libre y total) se efectuaron utilizando los métodos de la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV, 2012). La presión del gas CO<sub>2</sub> se midió mediante un afrómetro acoplado a las botellas selladas. El sistema mosalux se usó para evaluar las propiedades de formación de espuma, se cuantificó la altura máxima de la espuma o espumabilidad y la estabilidad o persistencia de la espuma (Poinsaut, 1991). Estos parámetros generales se cuantificaron por el INCAVI, (Barcelona, España). Estos parámetros generales se cuantificaron por el INCAVI.

#### 3.5.2 Análisis de metabolitos volátiles

Los reactivos usados en la metodología expuesta son de calidad analítica y los compuestos usados como estándares en la identificación, confirmación y preparación de disoluciones patrón se adquirieron a Merck, Sigma-Aldrich, Riedel de Haën y Fluka. El agua pura se obtuvo a partir de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	84/186



### 3.5.2.1 Determinación de compuestos volátiles mayoritarios y polioles

Los volátiles mayoritarios son aquéllos cuya concentración es mayor o igual a 10 mg/L. Para la determinación de estos compuestos se empleó el método de inyección directa del vino y las condiciones cromatográficas descritas por Peinado y colaboradores (2004), usando como patrón interno una disolución de 1 g/L de 4-metil-2-pentanol en etanol puro. Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 Series II (Palo Alto, California, USA), equipado con una columna capilar de sílice fundida CP-WAX 57 CB (60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.4 µm de espesor de película) de Varian (Palo Alto, California, USA) y un detector de ionización de llama (*Flame ionization detector*, FID). El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: 50 °C durante 15 min y luego elevado a 190 °C a 4 °C/min durante 35 min. La velocidad de flujo del gas portador (helio) se mantuvo a 0.7 mL/min durante 16 minutos y luego se elevó a 0.2 mL/min 1.1 mL/min durante 52 minutos. La temperatura del detector de ionización de llama fue de 300 °C, y las velocidades de flujo de hidrógeno y aire fueron de 40 y 400 mL/min, respectivamente. Se usó un programa de purga posterior a la ejecución a 200 °C durante 35 minutos y una velocidad de flujo de helio de 1.3 mL/min después de eluir los picos cromatográficos de interés.

La identificación y cuantificación de esta fracción se llevó a cabo con las rectas de calibrado obtenidas previamente mediante disoluciones patrón de concentración conocida analizadas en condiciones iguales que las muestras. La identificación de los volátiles mayoritarios se confirmó también a través de espectrometría de masas usando el mismo cromatógrafo de fases conectado a un detector HP-5973 MS.

### 3.5.2.2 Determinación de compuestos volátiles minoritarios

Los compuestos volátiles minoritarios, cuya concentración es inferior a 10 mg/L se determinaron mediante extracción por sorción de barra magnética agitadora, seguido de desorción térmica y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (SBSE-TD-GC-MS, *Stir Bar Sorptive Extraction - Thermal Desorption - Gas Chromatography - Mass Spectrometry*). Esta plataforma analítica incluye un cromatógrafo Agilent-7890A (Agilent Technologies, USA), un detector selectivo de masas MSD 5975 de Agilent Technologies (USA) y la unidad térmica de desorción

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	85/186



(TDU) de Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemania) acoplada a un sistema de inyección CIS-4 de Agilent Technologies (USA) y una columna capilar HP-5 de 30 m de longitud, 0.25mm diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. Todo se llevó a cabo a través del *software* Chemstation (Agilent Technologies) y Maestro (Gerstel).

El procedimiento consistió en introducir 1 mL de muestra en un vial de 10 mL y se diluyó al 1:10 con una disolución hidroalcohólica al 12% (v/v) en etanol tamponada a pH 3.5 y se añadió 0.1 mL de nonanoato de etilo (estándar interno, 0.446 mg/L de nonanoato de etilo en etanol). Seguidamente, las muestras se agitaron mediante agitador magnético Variomag Multipoint 15 de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) a 1200 rpm durante 100 min a 20 °C con una barra de agitación (*twister*) recubierta de polidimetilsiloxano (PDMS) de 0.5 mm de espesor de película y 10 mm de longitud, de Gerstel (GmbH, Mülheim an der Ruhr, Alemania). El *twister* se retiró del vial, se enjuagó con agua destilada, se secó y, finalmente, se transfirió a una unidad de desorción térmica (TDU) de Gerstel para su análisis por CG/MS. Las condiciones de desorción e inyección, flujo de gas portador y temperatura del horno y del detector de masas se han descrito según Vararu y colaboradores, (2016).

Los compuestos volátiles se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los de las bibliotecas de espectro de masas NIST08 y Wiley7N y se corroboraron calculando sus índices de retención lineal (LRI) aplicando la ecuación de Van Den Dool y Kratz, (1963) y comparándolos con los índices estándares que aparecen en la base de datos “National Institute of Standards and Technology” (<https://www.nist.gov/>).

Algunos compuestos se confirmaron comparando sus espectros de masas y su tiempo de retención con los de compuestos puros de la colección de patrones del grupo de investigación Vitenol de la Universidad de Córdoba. La seguridad en la identificación de un compuesto se evaluó a través del *Q-value* con el *software* Chemstation (Agilent Technologies, USA). Este valor de *Q-value* debe estar entre 90-100, lo que indica una correcta identificación, por debajo de estos valores pueden cometerse errores debidos a una deficiente asignación o por coeluciones de otros analitos (Debonneville *et al.*, 2004).

Los compuestos volátiles minoritarios se cuantificaron elaborando con posterioridad tablas de calibrado con disoluciones patrón de concentración conocida analizada en las mismas condiciones que las muestras. La selección de los iones para la

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	86/186



cuantificación y los cualificadores de cada analito se efectuó mediante el *software* Chemstation de Hewlett-Packard (Palo Alto, California, USA).

### 3.5.2.3 Determinación y cuantificación de aminoácidos

La determinación de aminoácidos (ANEXO III.2) presentes en el vino espumoso se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, en fase inversa mediante reacción de derivatización previa a la columna con ortoftaldehído (OPA) en presencia de mercaptoetanol (Pripis-Nicolau *et al.*, 2001).

Se utilizó el cromatógrafo, que consta de un sistema de bomba 1525 (aguas), un detector de fluorescencia 2475 de Waters (Sardañola del Vallés, Barcelona, España), excitación  $\lambda$  356 nm y emisión  $\lambda$  445 nm, un inyector automático 717 (Waters). El control del equipo y la adquisición y procesamiento de los datos se realizó a través del programa Breeze de Waters (Sardañola del Vallés, Barcelona, España). Las separaciones se llevaron a cabo utilizando una columna Nova-Pack C18 (3.9x150 mm) de Waters. Se usó OPA como reactivo derivatizante, se disolvieron 750 mg de OPA en 5 ml de metanol y se añadieron 0.5 ml de 2-mercaptoetanol. Se utilizaron dos eluyentes, eluyente A, compuesto por acetato de sodio/metanol/tetrahidrofurano (96:2:2) a pH 7.2 y eluyente B, formado por una mezcla de metanol/agua (65:35).

Las muestras se filtraron antes de inyectarse con filtros de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore). Los estándares se prepararon a partir de una solución madre de 100 mM en 0.1 N HCl para cada aminoácido. Se prepararon patrones de trabajo de concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM en HCl 0.1N. Se inyectaron 10  $\mu$ L de OPA y entre 10 y 50  $\mu$ L de la muestra. La reacción de derivatización previa a la columna se realizó automáticamente. El programa de gradiente utilizado en la separación de los aminoácidos se mostró en la Tabla 2. El flujo fue de 0,6 ml / min (ANEXO III.2).

**Tabla 2.** Programa de gradiente empleado en el HPLC para la detección de aminoácidos en el vino.

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	100	0
2.5	100	0
5	80	20
10	70	30

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	87/186





15	55	45
18	40	60
30	28	72
40	20	80
45	0	100
48	0	100
55	100	0

### 3.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado ( $n = 3$ ). Los datos se normalizaron previamente con la raíz cuadrada y, posteriormente, se escalaron por el método de Pareto, para evitar las diferencias introducidas por las unidades de medida (Seisonen *et al.*, 2016).

El tratamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II, de Scientific Time Sharing Corporation (STSC) (Rockville, Maryland, USA). Las metodologías aplicadas fueron ANOVA y la prueba de Fisher para el establecimiento de grupos homogéneos (HG) a un nivel de significancia  $p\text{-value} \leq 0.05$ . Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para encontrar aquellas variables que establecen diferencias entre los dos tipos de cepas estudiadas.

Mediante el empleo de la base de datos Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) se realizó un mapa de calor (Heatmap) y un análisis de correlación, “r”. La matriz de correlación muestra las relaciones entre todas las variables y las compara una por una, lo que da como resultado un conjunto de datos cuyo coeficiente de correlación,  $r$ , está en un rango de -1 a 1. Un valor de “r” cercano a -1 indica que hay una relación lineal fuerte e inversa entre las variables; mientras que un valor “r” cercano a 1 indica una relación lineal fuerte y directa entre las variables. Los valores de “r” cercanos a 0 son valores no significativos y, por lo tanto, no existe una relación lineal entre las variables.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	88/186



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	89/186



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados de acuerdo a la estructura planteada en la memoria de esta Tesis Doctoral en el apartado 3 “Justificación y Objetivos”. De modo que se incluyen los resultados de tres artículos publicados en la revista científica ya indicada como copias completas, según el orden secuencial establecido en los tres capítulos propuestos. Los resultados pendientes de su publicación recogidos en dos manuscritos se muestran en el ANEXO III.

### 4.1 Capítulo I. Estudio del flujo de los compuestos del carbono en levaduras vínicas y de las enzimas implicadas durante la producción de cava.

Durante la segunda fermentación las células de levadura se encuentran sometidas a diferentes factores de estrés que afectan a su metabolismo, y además durante este proceso, las levaduras liberan una serie de compuestos que contribuyen a las propiedades organolépticas del vino. En este trabajo se desarrollan los resultados obtenidos con respecto al metabolismo central del carbono mediante el estudio de las proteínas responsables de la producción de los compuestos volátiles liberados a partir de la degradación de glucosa durante la segunda fermentación en la elaboración del vino espumoso en dos cepas de *S. cerevisiae*. Una levadura típica usada en la elaboración de este tipo de vinos, la cepa P29, utilizada como referencia en todo momento, y una levadura no convencional, la cepa G1, que se caracteriza por formar velo de flor y es utilizada en la elaboración de vino fino. Una de las nuevas tendencias en la elaboración del vino espumoso es la mejora de la diversidad organoléptica mediante el uso de levaduras no convencionales, ya que son capaces de aportar características deseables para la industria. El motivo de utilizar este tipo de levadura no convencional para la elaboración de vino espumosos se debe a las cualidades que este tipo de levaduras presenta entre las que destacan su elevada tolerancia a altas concentraciones de etanol, así como su capacidad de adherencia, lo que facilitaría la clarificación del vino reduciendo el tiempo y los costos de producción haciéndolas candidatas idóneas para su uso en la producción de vinos espumosos.

Se identificaron 50 y 43 proteínas relacionadas con los compuestos del carbono en la levadura flor y en la levadura convencional, respectivamente. Sin embargo, los

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	90/186




perfiles proteómicos no mostraron diferencias notables entre las cepas, excepto para las proteínas Adh1p, Fba1p, Tdh1p, Tdh2p, Tdh3p y Pgc1p, que presentaron mayor contenido proteico en la levadura de flor frente a la levadura convencional.

Estos resultados han sido publicados en la revista científica *Microorganisms* cuyo título es el siguiente: Comparative study of the proteins involved in the fermentation-derived compounds in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* during sparkling wine second fermentation.

*Microorganisms* 2020, 8(8), 1209; doi:10.3390/microorganisms8081209.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	91/186



Article

# Comparative Study of the Proteins Involved in the Fermentation-Derived Compounds in Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* during Sparkling Wine Second Fermentation

María del Carmen González-Jiménez <sup>1</sup>, Teresa García-Martínez <sup>1</sup> , Juan Carlos Mauricio <sup>1,\*</sup> ,  
Irene Sánchez-León <sup>1</sup>, Anna Puig-Pujol <sup>2</sup>, Juan Moreno <sup>1</sup>  and Jaime Moreno-García <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Agricultural Chemistry, Edaphology and Microbiology, Microbiology Area, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; b02gojim@uco.es (M.d.C.G.-J.); mi2gamam@uco.es (T.G.-M.); b32salei@uco.es (I.S.-L.); qe1movij@uco.es (J.M.); b62mogaj@uco.es (J.M.-G.)

<sup>2</sup> Department of Enological Research, Institute of Agrifood Research and Technology-Catalan Institute of Vine and wine (IRTA-INCAVI), 08720 Barcelona, Spain; anna.puig@irta.cat

\* Correspondence: mi1gamaj@uco.es; Tel.: +34-957-218-640; Fax: +34-957-218-650

Received: 13 July 2020; Accepted: 6 August 2020; Published: 8 August 2020



**Abstract:** Sparkling wine is a distinctive wine. *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts is innovative and ideal for the sparkling wine industry due to the yeasts' resistance to high ethanol concentrations, surface adhesion properties that ease wine clarification, and the ability to provide a characteristic volatilome and odorant profile. The objective of this work is to study the proteins in a flor yeast and a conventional yeast that are responsible for the production of the volatile compounds released during sparkling wine elaboration. The proteins were identified using the OFFGEL fractionator and LTQ Orbitrap. We identified 50 and 43 proteins in the flor yeast and the conventional yeast, respectively. Proteomic profiles did not show remarkable differences between strains except for Adh1p, Fba1p, Tdh1p, Tdh2p, Tdh3p, and Pgk1p, which showed higher concentrations in the flor yeast versus the conventional yeast. The higher concentration of these proteins could explain the fuller body in less alcoholic wines obtained when using flor yeasts. The data presented here can be thought of as a proteomic map for either flor or conventional yeasts which can be useful to understand how these strains metabolize the sugars and release pleasant volatiles under sparkling wine elaboration conditions.

**Keywords:** sparkling wine; second fermentation; fermentation by-products; *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast; proteins

## 1. Introduction

Sparkling wine is a very distinctive wine with a unique winemaking process. Its peculiarity is mainly due to a second fermentation performed in closed bottles, where wines acquire an effervescent characteristic. This is followed by a long aging process, in which the wine is in contact with the yeast lees and thereby affecting its organoleptic properties. Its production, despite being lower compared to that of still wines, has an extensive economic impact on the enology industry. This is due to the relatively high economic value of most sparkling wines [1].

Sparkling wine elaboration by the *champenoise* or traditional method (like champagne in France and cava in Spain) involves two main steps. First, a fermentation where the grape must be converted to wine and second, a process called “*prise de mousse*” [2]. The latter consists of a secondary fermentation

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	92/186



process in sealed bottles after adding sugar and yeast, followed by at least nine months of aging on lees at low temperature (12–16 °C). During the “*prise de mousse*”, yeasts are subjected to several stress factors, such as high ethanol content, nitrogen deficiency, low pH values, low temperature and CO<sub>2</sub> overpressure [3]. These affect yeast metabolism and contribute to important modifications of sparkling wine organoleptic properties [4]. During fermentation, the yeast produces ethanol and carbon dioxide, among others, which, despite being toxic, the yeasts are able to cope with. It is during the aging of the wine in contact with the lees when mannoproteins are released as well as compounds derived from autolysis and enzymes involved in reactions that affect some aroma precursors [5,6].

A large number of studies have reported the metabolic/enzymatic potential of certain non-conventional yeasts and their role in improving some technological and sensory aspects of wine [7–10], such as the positive effect on aroma, glycerol, polysaccharides, mannoproteins, and volatile acid [11,12]. Therefore, the use of non-conventional yeasts in wine fermentations has become a current trend in the wine industry. These unconventional yeast species are used in winemaking with objectives such as (i) control the acidity [11], (ii) improve color extraction and mouthfeel [13], (iii) reduce the ethanol content [8,14]; and, more recently, and (iv) improve foam properties in sparkling wines [15].

Due to the capacity of this yeast to support high concentrations of ethanol, the use of a non-conventional yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast strains for sparkling wine elaboration is suitable and is a possible advantage for the industry of wine. Further, flor yeast strains possess distinctive characteristics compared to other fermentative *S. cerevisiae* strains, such as their capacity to form a biofilm on the air-liquid interface of the wine for the elaboration of Sherry wines [16]. These cell adhesive properties allow the winemakers to easily remove yeasts and sediment in the “*degüelle*” phase during the production of cava by the traditional method. Moreover, previous studies have demonstrated that flor yeast is a good candidate for sparkling wine elaboration because they produce volatile compounds, such as higher alcohols, aldehydes, esters and ketones, and its influence on the wine final aroma [17,18]. The use of flor yeast could reduce production cost and time, marking a significant step forward in the sparkling wine industry. At the same time, it mitigates the current situation of low diversity of commercially available yeasts for winemaking, in this particular case for the production of sparkling wines by the traditional method.

Here, we aim to reveal the yeast proteins responsible for the production of fermentation compounds released in the second fermentation during the elaboration of cava by a flor *S. cerevisiae*, and compare it with a conventional strain used in the production of this type of wine. The data presented can be seen as a proteomic map of either the flor or conventional yeasts which can be useful to understand how these strains metabolize the sugars and release pleasant volatiles under *prise de mousse* conditions. This knowledge can shed light on the molecular mechanism behind the production of characteristic volatile compounds that will determine the odorant profiles of this type of wine.

## 2. Materials and Methods

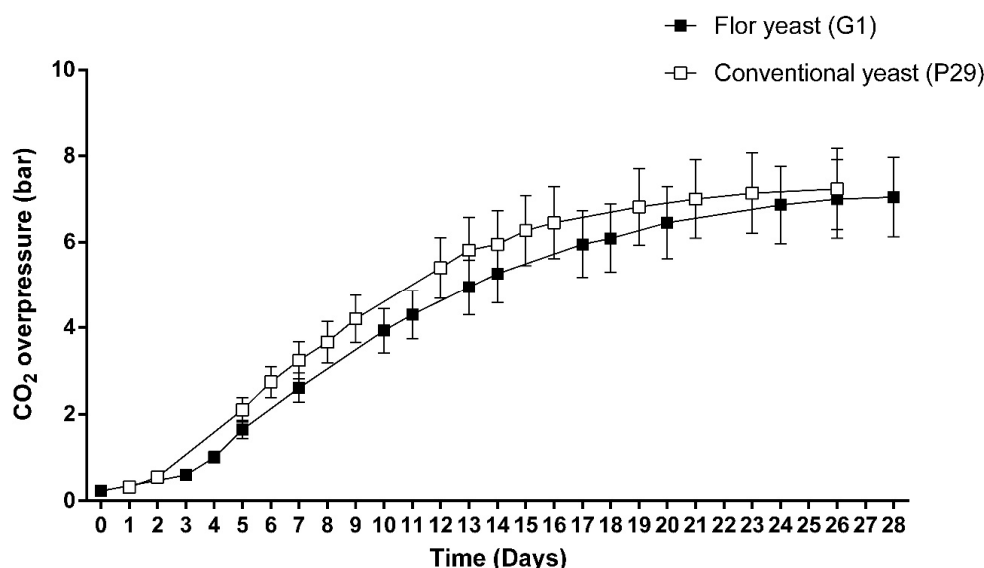
### 2.1. Microorganism and Experimental Conditions

The microorganisms used were two strains of *S. cerevisiae*. The first strain, *S. cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451), is an industrial flor wine yeast from the collection of the Department of Microbiology of the University of Cordoba (Spain). It was isolated from Fine Sherry wine of Montilla-Moriles designation of origin (DO) (Spain). This strain forms a thick biofilm (velum) about 30 days after inoculation with a cell viability higher than 90% [19]. The second strain, *S. cerevisiae* P29 (CECT 11770), was used as the control strain and isolated in the Penedès grape-growing area (Spain) by the Catalan Institute of Vines and Wines (INCAVI). INCAVI recommends P29 for the elaboration of “cava” Spanish sparkling wine. A standardized commercial base wine, obtained by fermenting musts from Macabeo and Chardonnay grapes in a proportion 6:4, was used for the second fermentation. After settling, the base wine was subjected to a second fermentation inside 750 mL bottles at 14 °C. Sucrose and yeast cells were added to the base wine to reach 22 g/L per bottle and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	93/186



The changes caused by yeast during the second fermentation were monitored at three sampling times: (i) the base wine (T0) (ii) at the middle of fermentation stage, when CO<sub>2</sub> pressure reached 3 bar (MF); and (iii) at the end of the second fermentation (EF) one month after when CO<sub>2</sub> pressure reached 6.5 bar. Data shown in Figure 1. All the samples were analyzed in triplicate.



**Figure 1.** Evolution of endogenous CO<sub>2</sub> released by flor yeast and conventional yeast during the second fermentation in Spanish sparkling wine (cava) elaboration (Porrás-Agüera et al., 2019) [20].

## 2.2. Proteome Analysis

The cells were collected from each bottle by centrifugation at 4500× g for 10 min by a centrifuge (Hettich® ROTINA 38/38R, Kirchleugern, Germany) and the sediment was washed twice with sterile distilled cold water. Afterwards, cells were broken by a mechanical technique in Vibrogen Cell Mill V6 (Edmund Bühler, Bodelshausen, Germany) using 500 μm diameter glass balls (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Once the cells were broken, the protein pull was extracted. For this purpose, extraction buffer and protease inhibitors cocktails were used. A total of 500 μg of protein of each condition and replica was loaded. The OFFGEL high-resolution kit, pH 3–10 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for protein preparative isoelectric focusing (IEF) in solution. Protein samples were solubilized in protein OFFGEL fractionation buffer (Agilent Technologies, Part number 5188–6444, Santa Clara, CA, USA), and aliquots evenly distributed in 12-well 3100 OFFGEL fractionator trays according to the supplier’s instructions. Proteins from each well were scanned and fragmented on an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nano LC Ultimate 3000 system (Dionex, Germering, Germany). To obtain the concentration of a protein in the sample, Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) was used [21]. These procedures and methods are described in more detail by Moreno-García et al. (2015) [22] and Porrás-Agüera et al. (2020) [23].

The quantified aroma compounds were related to proteins directly involved in their metabolism using the following databases: YMDB (yeast metabolome database; <http://www.ymdb.ca/>), SGD (*Saccharomyces* genome database; <http://www.yeastgenome.org/>), and Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

## 2.3. Statistical Analysis

The software package Statgraphics Centurion XVI.II, (STSC, Inc., Rockville, MD, USA) was used for statistical analysis of the proteins. A multiple-sample comparison procedure (MSC) was used to

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	94/186



compare two or more independent samples via ANOVA and Fisher's test to establish homogenous groups at a level of significance of 95% ( $p$ -value < 0.05). Data were previously normalized according to root square and Pareto scaling, to avoid the differences introduced by the measurement units [24]. All treatments were evaluated in triplicate.

In addition, a correlation analysis to establish significant relationships between metabolites and proteins were carried out according to Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

### 3. Results and Discussion

A total of 50 proteins and 43 proteins related to the metabolism of fermentation metabolites (ethanol, glycerol, acetic acid, acetaldehyde, acetoin, and 2,3-butanediol) have been identified in flor yeast and conventional yeast, respectively (Table 1, Supplementary Table S1). The fermentation related proteins have been sorted in subpathways. Each subpathway is commented and discussed separately.

**Table 1.** Composition of the base wine (T0) and the Spanish sparkling wine at the middle of the second fermentation (MF) and at the end of the second fermentation (EF) in flor yeast and conventional yeast strains. Data provided by Martínez-García et al. (2017) and (2020) [17,25].

	Flor Yeast			Conventional Yeast		
	T0	MF	EF	T0	MF	EF
Ethanol (% v/v)	10.23 ± 0.02	10.76 ± 0.04	11.4 ± 0.1	10.23 ± 0.02	10.85 ± 0.04	11.60 ± 0.03
Acetaldehyde (mg/L)	87 ± 1	132 ± 1	87 ± 16	87.2 ± 1.1	133.9 ± 7.3	85.2 ± 0.2
Acetoin (mg/L)	19 ± 1	61 ± 1	31 ± 2	19.3 ± 1.3	127.5 ± 11.8	24.5 ± 6.3
2,3-butanediol (mg/L)	171 ± 7	221 ± 4	200 ± 33	171 ± 6	166 ± 4	192 ± 12
Acetic acid (g/L)	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.00	0.28 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.00	0.22 ± 0.00
Glycerol (mg/L)	4020 ± 656	4493 ± 164	4227 ± 297	4019 ± 655	4557 ± 212	3513 ± 163

#### 3.1. Glycolysis/Gluconeogenesis Proteome

A total of 25 and 23 proteins involved with the glycolysis/gluconeogenesis pathway out of a total of 38 proteins currently documented in *S. cerevisiae*, were identified in the flor yeast and conventional strain, respectively. The contents of the different proteins were analyzed at different times in the second fermentation in the production of sparkling wine (T0, MF, and EF).

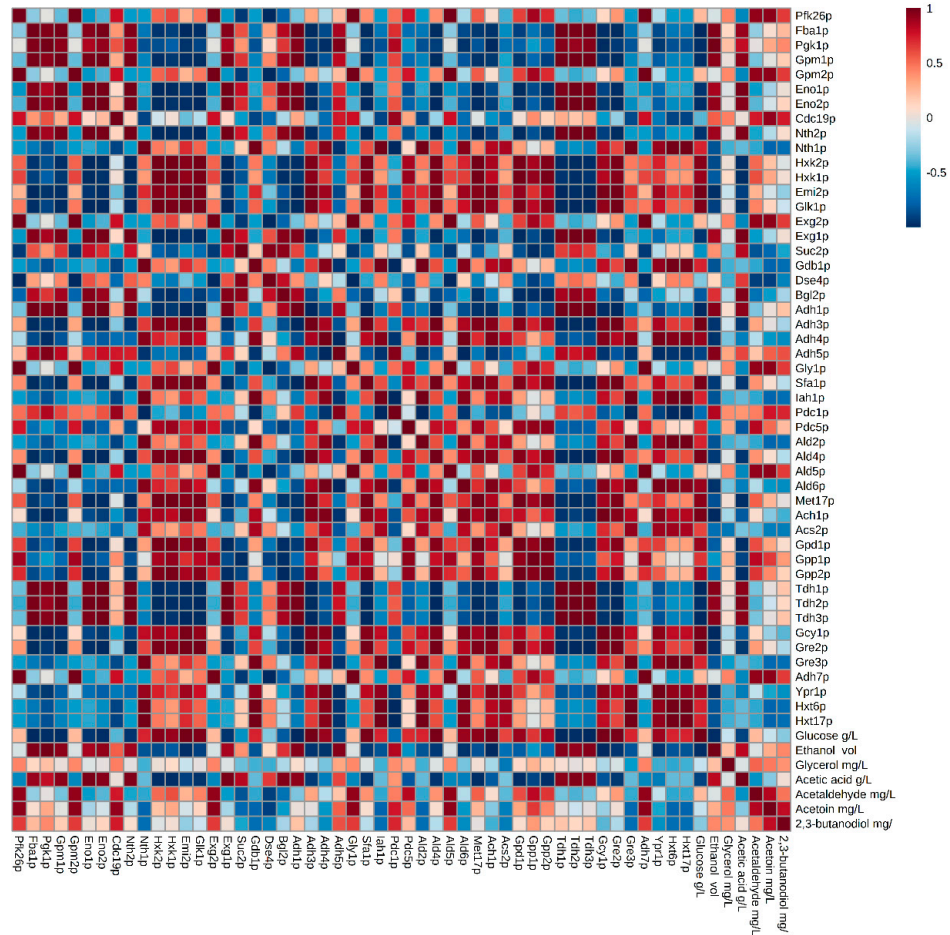
In general, the proteomic profiles obtained in both strains for the proteins involved in these pathways were not remarkably different. Content of proteins like glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (Tdh1p, Tdh2p and Tdh3p), Pgc1p and enolases (Eno1p and Eno2p), progressively increased during the second fermentation in both strains but the increase was more abrupt in the flor yeast (Supplementary Table S1). These proteins catalyze the reversible steps 1, 2, and 4 of the subpathway that synthesizes pyruvate from D-glyceraldehyde 3-phosphate, steps shared by glycolysis and gluconeogenesis pathways. An increased synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases during the second fermentation could be related to the recycling of NAD<sup>+</sup>/NADH for the continuation of glycolysis; otherwise, the glycolytic flow would decrease, which could lead to exhaustion of the ATP energy charge, making it lethal for yeast [26]. Most of the NADH produced during glycolysis is used by yeast for the formation of ethanol from acetaldehyde. Figures 2 and 3 prove a significant inverse correlation between glycolysis/gluconeogenesis protein content and glucose concentration, indicating that enzymes are degrading glucose. However, at EF, when fermentable carbon sources are depleted (~0.3 g/L) and the major carbon sources are ethanol or glycerol, yeast Tdhps, Pgc1p and Enops can catalyze for gluconeogenesis [16,22]. Recently, Porras-Agüera et al. (2019) postulated that the increase in Tdhps content could be related to cell death or stress response, and

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	95/186

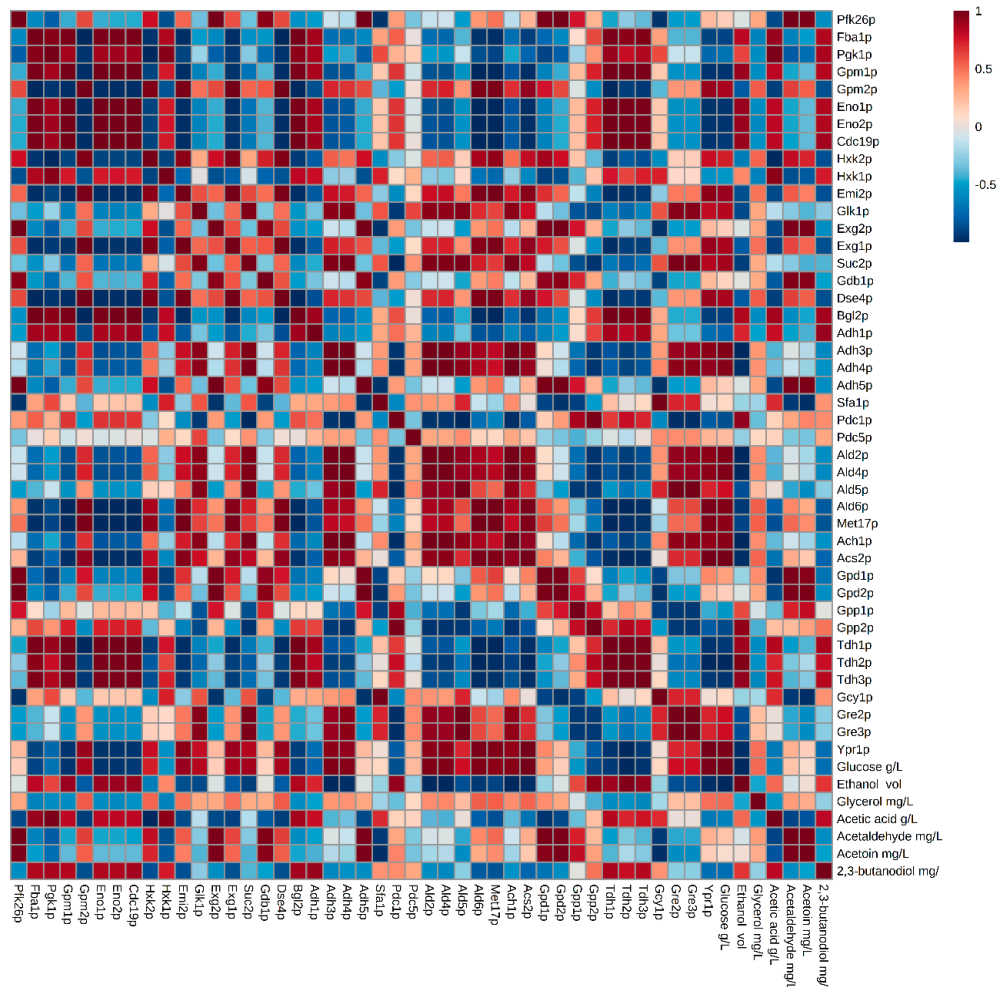




thus proposing them as possible cell death biomarkers during the second fermentation [20]. A higher abundance of gluconeogenesis-related proteins in the flor yeast versus the conventional sparkling yeast may be related to an evolutionary adaptation of the first strain to media with high concentrations of non-carbon sources where flor yeasts are predominant [27].



**Figure 2.** Matrix of correlations established between proteins and compounds released in the second fermentation in the flor yeast G1 strain. Metabolome data extracted from Martínez-García et al. (2020) [17].



**Figure 3.** Matrix of correlations established between proteins and compounds released in the second fermentation in the conventional yeast P29 strain. Metabolome data extracted from Martínez-García et al. (2017) [25].

Cell wall proteins glucanases Exg1p, Exg2p, and Bgl2p that hydrolyze  $\beta$ -glucan chains in the cell wall leading to the release of glucose, were also reported in higher concentrations in the flor yeast. The presence of these proteins at early stages of the fermentation may be related to cell expansion during growth while at the end of fermentation can be involved in cell wall degradation [5]. One more protein that reported an increase in its concentration at EF in flor yeast is Suc2p, which was found 5-fold higher than in the conventional strain. This protein is capable of transforming sucrose into glucose and fructose. Its non-glycosylated form is expressed constitutively, while its glycosylated form is regulated by the repression of glucose [28]. The absence of glucose in the medium at the end of the second fermentation causes the yeasts to synthesize the non-glycosylated form. This enzyme is excreted into the periplasmic space, where the hydrolysis occurs, and letting the monosaccharide products of the reaction, glucose and fructose, be transported into the cell. Higher Suc2p contents at EF in the flor yeast may be associated to a higher cell wall degradation that correlates with higher autolysis proteins compared to the conventional strain [18,23].

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	97/186



### 3.2. Proteins Related to the Metabolism of Pyruvate to Ethanol and Acetic Acid

A total of 16 and 12 proteins involved in the formation of ethanol from pyruvate (out of a total of 22 proteins currently documented in *S. cerevisiae*) were identified in the flor yeast and conventional strain, respectively (Supplementary Table S1).

Adh1p stood out by ranging in content from 0.4 to 1.8 (mol%) with a positive trend towards EF. Adh1p and Adh5p contents were reported two-fold more in concentration for the flor yeast compared to the conventional strain in MF and EF; where EF > MF. These enzymes are responsible for reversible exchange of acetaldehyde and ethanol during glucose fermentation. This increase is related to the drastic decrease in the amount of acetaldehyde quantified at the end of the second fermentation and the increase in the amount of ethanol produced, indicating a reaction direction towards ethanol (Figures 2 and 3). At concentrations below 70 mg/L, acetaldehyde can provide a fruity flavor to wine, which often occurs in freshly fermented wines. However, it can be pungent and negative over 100 mg/L and is often associated with bruised apple, Sherry, walnut and oxidation [29]. In this study, both the flor yeast and the conventional yeast presented concentrations lower than 100 mg/L at the end of the second fermentation [17,25] supporting the use of flor yeast in sparkling wine second fermentation. Furthermore, pyruvate decarboxylases Pdc1p and Pdc5p highlighted in MF for high protein content in flor yeast compared to the conventional strain. Both pyruvate decarboxylases are key enzymes in alcoholic fermentation and are responsible for the decarboxylation of pyruvate to acetaldehyde. Pdc1p is the main active form during glucose catabolism, while Pdc5p is a secondary form that is only expressed under thiamine starvation [30]. This higher protein content was reflected in an increased acetaldehyde concentration in the middle of the second fermentation in flor yeast (Figure 2). High concentration of Adhps in flor yeast at EF, when no sugars remain, may be related to an adaptive proteomic response of these yeasts to environments with only non-fermentable carbon sources [16,31]. However, the anoxia inside the bottles does not allow ethanol consumption so the alcohol dehydrogenases, although abundant, may remain inactive.

The metabolism of acetic acid in *S. cerevisiae* is primarily synthesized as an intermediate by cytosolic pyruvate dehydrogenase bypass. This involves the conversion of pyruvate to acetaldehyde by pyruvate decarboxylase, which is subsequently oxidized to acetate by the action of aldehyde dehydrogenase (*ALD*) [32–34]. This acetic acid is key for the formation of fatty acids, acetyl-CoA, through the action of acetyl-CoA synthetase (*ACS*), so there must be a balance between *ALD* and *ACS* activity. The optimal concentration in wine is less than 0.20 g/L [35]. In excessive amounts, acetic acid gives wine a pungent taste and an unpleasant aroma of vinegar [36].

A total of seven proteins related to the acetic acid metabolism were identified in both strains, out of a total of 14 documented proteins in *S. cerevisiae*. However, in quantitative terms, the proteomic profile obtained for each strain was different (Supplementary Table S1). At T0, Ald4p stands out for higher protein content in conventional strain versus flor yeast, however in MF, this protein was two-fold more in protein content in flor yeast. As mentioned above, Ald4p together with Ald5p, participate in a pathway of mitochondrial pyruvate dehydrogenase, in which pyruvate is first decarboxylated to acetaldehyde in the cytosol by pyruvate decarboxylase and then converted to acetate by mitochondrial acetaldehyde dehydrogenases [37]. In general, the protein content of Acs2p reported was lower compared to Ald4p. According to Verduyn et al. (1990) [38] less acetic acid is produced if *ALD* activity is lower than *ACS* activity. This can explain the significant increase in acetic acid during the course of the second fermentation in flor yeast [17].

Even though no protein was identified at the end of the second fermentation in flor yeast and almost not quantifiable in the conventional yeast, the amount of acetic acid produced was higher at this sampling time. This fact could be correlated to the decrease in the amount of acetaldehyde, previously described [17,25]. This conversion could have taken place when the cells are still performing the alcoholic fermentation when the proteins were detectable, and the acetic acid remains until the sampling time.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	98/186



### 3.3. Proteins Related to the Metabolism of Pyruvate-Acetoin-2,3-Butanediol

Acetoin and 2,3-butanediol are by-products generated by *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation that confer buttery and cream aromas, when present over concentrations of 0.03 and 0.67 g/L, respectively. Acetoin can also be a precursor of some off-odor compounds, such as diacetyl. High fermentative wine yeasts generally produce low acetoin levels [39]. In this study, the conventional strain produced less acetoin than the flor yeast, however, the differences were not significant. The acetoin/2,3-butanediol pathway in yeasts contributes to detoxification of acetaldehyde because acetoin is a weaker inhibitor than acetaldehyde [40]. Out of the five proteins documented in *S. cerevisiae* (Bdh1p, Bdh2p, Pdc1p, Pdc5p, and Pdc6p) involved in the formation of 2,3-butanediol, only two were identified (Pdc1p and Pdc5p) in both strains (Supplementary Table S1). In MF, higher contents were observed for Pdc1p and Pdc5p in flor yeast. In both cases a direct correlation could be established between the quantity of acetoin quantified and Pdc1p and Pdc5p, and this correlation was stronger for flor yeast except for the conventional yeast Pdc5p (Figures 2 and 3).

On the other hand, Bdh1p and Bdh2p were not reported in any of the strains involved in the reversible oxidation of acetoin to 2,3-butanediol and the irreversible reduction of 2,3-butanediol to (S)-acetoin, respectively. 2,3-Butanediol represents an important source of aroma [41] although it has a very high odor threshold value (~150 mg/L). In wine, its concentration varies from approximately 0.2 to 3 g/L, with an average value of approximately 0.57 g/L. This high content can have some effect on the wine bouquet due to its slightly bitter taste and also on the body of the wine due to its viscosity [41]. The changes in 2,3-butanediol and the absence of Bdh1p and Bdh2p could be attributed to limitation in the detection method that could not quantify very low protein content or to a potential activity of another enzyme that catalyzes the same reaction or another reaction known to produce this compound.

### 3.4. Proteins Related to the Metabolism of Dihydroxyacetone Phosphate-Glycerol.

Glycerol is quantitatively the most important fermentation product after ethanol and carbon dioxide, its concentration depends on environmental factors, such as temperature, aeration, sulfite level, and yeast strain [42]. Glycerol contributes positively to the sensory quality of the wine, providing smoothness and viscosity [43]. In *S. cerevisiae*, this polyol plays two main roles in physiological processes: it fights osmotic stress and controls intracellular redox balance, and [44–46] converts excess NADH generated during biomass formation to NAD<sup>+</sup>. Glycerol is synthesized by reducing dihydroxyacetone phosphate to glycerol 3-phosphate and is catalyzed by an NAD-dependent cytosolic G3P dehydrogenase (*GPD*), followed by dephosphorylation of glycerol 3-phosphate by a specific phosphatase (*GPP*).

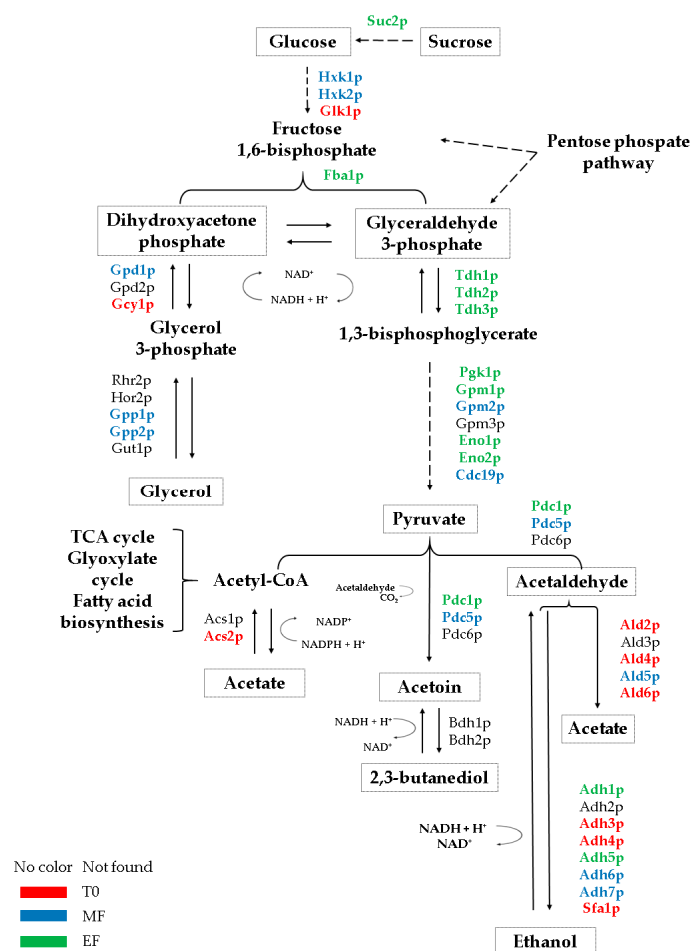
In this work, 11 proteins have been identified (out of 19 documented proteins in *S. cerevisiae*) related to glycerol metabolism in both strains (Supplementary Table S1). In general, the proteomic profile obtained for each sampling time was similar in both strains, but a higher protein content was reported in the case of flor yeast. Gpd1p, Gpp1p, and Gpp2p almost doubled in quantity in T0 and MF in the conventional yeast versus flor yeast. Remize et al. (2003) detected that Gpd1p increases during the growth phase. The beginning of the second fermentation in sparkling wine involves anaerobiosis and osmotic stress that influence the expression of *GPD* genes [47]. Under these conditions, the respiratory chain does not function and the production of glycerol is the only possible mechanism of re-oxidation of NADH. Gpd1p, Gpd2p (not identified), Gpp1p and Gpp2p play a major role in glycerol formation. Depending on the way in which they are combined, they have been related to the production of glycerol during osmotic stress (Gpd1p-Gpp2p combination) or to the adjustment of the NADH-NAD<sup>+</sup> redox balance under anaerobic conditions (Gpd2p-Gpp1p combination) [47]. In this work, the first combination (Gpd1p-Gpp2p) has been reported for both yeast strains. Both yeasts increased the synthesis of both proteins at T0 and MF which would promote the accumulation of glycerol inside the cell to withstand the osmotic stress. However, in flor yeast these two proteins were not identified at EF. Further, no significant differences were obtained in the extracellular glycerol concentration in flor yeast while in conventional yeast there was a significant

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	99/186



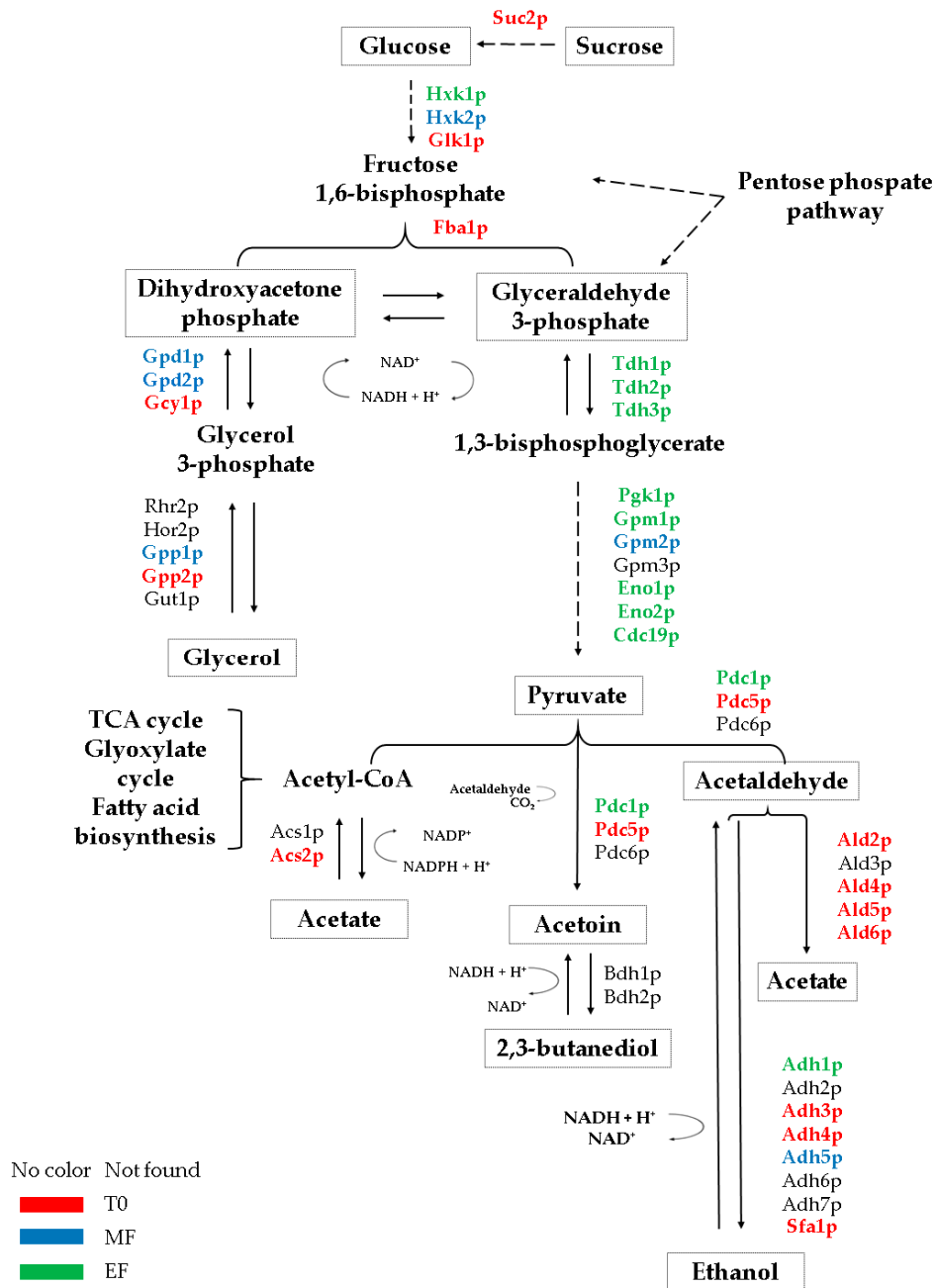
decrease in concentration from MF to EF [17,25]. It was not possible to establish any significant correlation between the concentration of this metabolite and the content of the proteins involved in any of the strains (Figures 2 and 3). Also, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases, previously commented, can influence the glycerol concentration (maybe producing at MF and consuming at EF). These results suggest that there is a prevalence of the metabolic pathway of ethanol production versus that of glycerol formation since considerable increase in the ethanol concentration was obtained while the glycerol concentration remained stable, possibly due to an accumulation of this compound inside the cell. Another possible explanation for this fact is that these proteins have not been activated by yeast, causing a change in the coenzyme requirement during the synthesis of glutamate from NADPH to NADH, and decreasing the availability of NADH for the synthesis of glycerol and an increase in the yield of ethanol [48]. The balance between the concentration of ethanol and glycerol results in pleasant and stable wines.

The metabolites and proteins that displayed the highest concentration in each strain are highlighted in a schematic figure (Figures 4 and 5) to provide a better understanding of the results obtained in this work.



**Figure 4.** Summary of the scheme of proteins involved in the compounds derived from *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast fermentation during the second fermentation in the production of sparkling wine. The color of the protein names represents the condition in which the highest protein content of the proteins was identified. Each condition is represented by a color: red for the base wine, T0; blue for the middle of the fermentation, MF; green for the end of the second fermentation, EF.





**Figure 5.** Summary of the scheme of proteins involved in the compounds derived from fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* conventional yeast during the second fermentation in the production of sparkling wine. The color of the protein names represents the condition in which the highest protein content of the proteins was identified. Each condition is represented by a color: red for the base wine, T0; blue for the middle of the fermentation, MF; green for the end of the second fermentation, EF.

#### 4. Conclusions

This work is focused on the use of an unconventional flor yeast to produce sparkling wine by comparing with a typical wine yeast strain. The relationship of the yeast proteome with the

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	101/186



exo-metabolites excreted in the medium during the second fermentation in the production of sparkling wine has been established.

Fifty proteins and 43 proteins related to the metabolism and transport of fermentation metabolites (ethanol, glycerol, acetic acid, acetaldehyde, acetoin, and 2,3-butanediol) have been identified in flor yeast and conventional yeast, respectively. Not remarkable differences were found among the tested strains, but a lower concentration of most proteins was reported in the conventional yeast. Consequently, the concentration of the related metabolites was different in each strain and all above their odor threshold.

This study highlights that flor yeasts generally used to produce Sherry wine, can perform autolysis at high levels during the second fermentation and improve the quality and diversity of sparkling wine. In view of the results obtained, the use of this type of flor yeast is suggested for the production of sparkling wine. In addition, this type of yeast can resist high content of ethanol and has high adhesion properties. These characteristics make it an ideal candidate for the production of sparkling wines.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1209/s1>, Table S1: List of the proteins involved in the fermentation-derived compounds identified in *Saccharomyces cerevisiae* G1 and P29 under typical second fermentation conditions in three sampling times (T0: base wine; MF: middle of the second fermentation; EF: end of the second fermentation).

**Author Contributions:** All authors designed the research; M.d.C.G.-J., I.S.-L., J.M.-G., J.M., J.C.M. and T.G.-M. read and approved the final manuscript. M.d.C.G.-J. conducted the study, analyzed the experimental data, and drafted the manuscript. I.S.-L. helped analyze the experimental data. J.M. helped analyze and review the experimental data. J.C.M., J.M.-G. and T.G.-M. participated in the coordination of the study and carried out the experimental part. A.P.-P. crafted the methodology. All authors reviewed the drafts and contributed to writing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study 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), and by 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 from the staff at the Central Research Support Service (SCAI) of the University of Cordoba (Spain) with the protein analyses is gratefully acknowledged and Minami Ogawa for the language revision of this paper.

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

## References

- Pozo-Bayón, M.Á.; Martínez-Rodríguez, A.; Pueyo, E.; Moreno-Arribas, M.V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 289–299. [[CrossRef](#)]
- Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Sparkling wines: Features and trends from tradition. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2012; Volume 66, pp. 1–45.
- Penacho, V.; Valero, E.; González, R. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garofalo, C.; Arena, P.M.; Laddomada, B.; Cappello, S.M.; Bleve, G.; Grieco, F.; Beneduce, L.; Berbegal, C.; Spano, G.; Capozzi, V. Starter cultures for sparkling wine. *Fermentation* **2016**, *2*, 21. [[CrossRef](#)]
- Alexandre, H.; Guilloux-Nematier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127. [[CrossRef](#)]
- Sartor, S.; Toaldo, I.M.; Panceri, C.P.; Caliarì, V.; Luna, A.S.; de Gois, J.S.; Bordignon-Luiz, M.T. Changes in organic acids, polyphenolic and elemental composition of rosé sparkling wines treated with mannoproteins during over-lees aging. *Food Res. Int.* **2019**, *124*, 34–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ruiz, J.; Ortega, N.; Martín-Santamaría, M.; Acedo, A.; Marquina, D.; Pascual, O.; Rozès, N.; Zamora, F.; Santos, A.; Belda, I. Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *305*, 108255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	102/186



8. Moreno, J.; Moreno-García, J.; López-Muñoz, B.; Mauricio, J.C.; García-Martínez, T. Use of a flor velum yeast for modulating colour, ethanol and major aroma compound contents in red wine. *Food Chem.* **2016**, *213*, 90–97. [[CrossRef](#)]
9. Quincozes, L.; Santos, P.; Vieira, L.; Gabbardo, M.; Eckhardt, D.P.; Cunha, W.; Costa, V.; Zigiotta, L.; Schumacher, R. Influence of yeasts of the genus *Saccharomyces* and not *Saccharomyces* in elaboration of white wines. *BIO Web Conf.* **2019**, *12*, 02014. [[CrossRef](#)]
10. Alonso-del-Real, J.; Lairón-Peris, M.; Barrio, E.; Querol, A. Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 150. [[CrossRef](#)]
11. Ciani, M.; Comitini, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 25–32. [[CrossRef](#)]
12. Nuñez-Guerrero, M.A.; Paez-Lerma, J.B.; Rutiaga-Quiñones, O.M.; González-Herrera, S.M.; Soto-Cruz, N.O. Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. *Food Microbiol.* **2016**, *54*, 91–97. [[CrossRef](#)]
13. Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* **2012**, *23*, 39–50. [[CrossRef](#)]
14. Ciani, M.; Morales, P.; Comitini, F.; Tronchoni, J.; Canonico, L.; Curiel, J.A.; Oro, L.; Rodrigues, A.J.; Gonzalez, R. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Medina-Trujillo, L.; González-Royo, E.; Sieczkowski, N.; Heras, J.; Canals, J.M.; Zamora, F. Effect of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 681–688. [[CrossRef](#)]
16. Alexandre, H. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 269–275. [[CrossRef](#)]
17. Martínez-García, R.; Roldán-Romero, 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**, *308*, 125555. [[CrossRef](#)]
18. González-Jiménez, M.C.; Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.J.; Puig-Pujol, A.; Capdevilla, F.; Mauricio, J.C. Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration. *Microorganisms* **2020**, *8*, 403. [[CrossRef](#)]
19. Mauricio, J.C.; Moreno, J.J.; Ortega, J.M. *In vitro* specific activities of alcohol and aldehyde dehydrogenases from two flor yeast during controlled wine ageing. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1967–1971. [[CrossRef](#)]
20. Porras-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](#)]
21. 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. Proteomics* **2005**, *4*, 1265–1272. [[CrossRef](#)]
22. 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](#)] [[PubMed](#)]
23. Porras-Agüera, J.A.; Moreno-García, J.; González-Jiménez, M.C.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. Autophagic proteome in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during second fermentation for sparkling wine elaboration. *Microorganisms* **2020**, *8*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Seisonen, S.; Vene, K.; Koppel, K. The current practice in the application of chemometrics for correlation of sensory and gas chromatography data. *Food Chem.* **2016**, *210*, 530–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. 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](#)]
26. Valadi, H.; Valadi, Å.; Ansell, R.; Gustafsson, L.; Adler, L.; Norbeck, J.; Blomberg, A. NADH-reductive stress in *Saccharomyces cerevisiae* induces the expression of the minor isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*TDH1*). *Curr. Genet.* **2004**, *45*, 90–95. [[PubMed](#)]
27. Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Torán, M.J.; Garcia-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microb.* **2001**, *67*, 2056–2061. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	103/186





28. Carlson, M.; Botstein, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **1982**, *28*, 145–154. [[CrossRef](#)]
29. Byrne, S.; Howell, G. *Acetaldehyde: How to Limit its Formation during Fermentation*; Aust, N.Z., Ed.; Grapegrower Winemaker: Sydney, NSW, Australia, 2017; pp. 68–69.
30. Mojzita, D.; Hohmann, S. Pdc2 coordinates expression of the *THI* regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genom.* **2006**, *276*, 147–161. [[CrossRef](#)]
31. Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Millán, M.C.; Mauricio, J.C.; Moreno, J. Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. *Food Microbiol.* **2015**, *51*, 1–9. [[CrossRef](#)]
32. Ugliano, M.; Henschke, P.A. Yeasts and Wine Flavour. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp. 313–392.
33. Remize, F.; Andrieu, E.; Dequin, S. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic Mg<sup>2+</sup> and mitochondrial K<sup>+</sup> acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3151–3159. [[CrossRef](#)]
34. Pigeau, G.M.; Inglis, D.L. Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1576–1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. González, V.F. Aroma, aromas y olores del vino. In *Análisis Sensorial y Cata de los Vinos de España*; Dialnet: Logroño, Spain, 2001; pp. 207–233.
36. Vilela-Moura, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Silva, R.D.; Chaves, S.R.; Sousa, M.J.; Corte-Real, M. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: Reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 271–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Boubekeur, S.; Camougrand, N.; Bunoust, O.; Rigoulet, M.; Guérin, B. Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5057–5065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W.A.; Van Dijken, J.P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 395–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Romano, P.; Suzzi, G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 309–315. [[CrossRef](#)]
40. Michnick, S.; Roustan, J.L.; Remize, F.; Barre, P.; Dequin, S. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **1997**, *13*, 783–793. [[CrossRef](#)]
41. Romano, P.; Brandolini, V.; Ansaloni, C.; Menziani, E. The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 649–653. [[CrossRef](#)]
42. Borrull, A.; Poblet, M.; Rozès, N. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiol.* **2015**, *48*, 41–48. [[CrossRef](#)]
43. Kemp, B.; Alexandre, H.; Robillard, B.; Marchal, R. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 19–38. [[CrossRef](#)]
44. Goold, H.D.; Kroukamp, H.; Williams, T.C.; Paulsen, I.T.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 264–278. [[CrossRef](#)]
45. Hohmann, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* **2015**, *61*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. García-Mauricio, J.C.; García-Martínez, T. Role of Yeasts in Sweet Wines. In *Book Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013.
47. Remize, F.; Cambon, B.; Barnavon, L.; Dequin, S. Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway. *Yeast* **2003**, *20*, 1243–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nissen, T.L.; Kielland Brandt, M.C.; Nielsen, J.; Villadsen, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metab. Eng.* **2000**, *2*, 69–77. [[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	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	104/186



#### 4.2 Capítulo II. Identificación de las proteínas implicadas en el metabolismo de los compuestos del aroma durante la producción de cava.

Los compuestos aromáticos derivados del metabolismo de las levaduras contribuyen en gran medida a las características de aroma y sabor en los vinos, por lo que son considerados de gran interés industrial. De todos los compuestos aromáticos presentes en el vino destacan, por su influencia en las propiedades organolépticas, los ésteres volátiles y los alcoholes superiores. La red metabólica responsable de la producción de estos compuestos durante la segunda fermentación en botella y su relación con el proteoma de la levadura *S. cerevisiae* es compleja.

Este capítulo está enfocado en el estudio del metabolismo de los ésteres debido a su impacto positivo en las propiedades organolépticas del vino resultante mediante la identificación de las proteínas implicadas en su metabolismo y el establecimiento de relaciones metaboloma-proteoma durante la segunda fermentación en la producción de vinos espumosos por dos cepas de levadura de *S. cerevisiae*, la cepa P29 y la cepa G1. La identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el fraccionador OFFGEL y el LTQ Orbitrap. La detección y cuantificación de los ésteres se realizó con un cromatógrafo de gases acoplado a detector de ionización de llama (GC-FID) y extracción por sorción de barra magnética agitadora, seguido de desorción térmica y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (SBSE-TD-GC-MS). En este estudio se identificó y cuantificó un total de 20 ésteres, siendo 15 comunes a ambas cepas; sin embargo, el hexanoato de etilo y el lactato de etilo solo se identificaron en la levadura de flor (cepa G1), y el acetato de isobutilo, el 2-metilbutanoato de etilo, el 3-metilbutanoato de etilo, en la cepa P29. Además, estos compuestos se relacionaron con 5 proteínas responsables de la formación y degradación de los mismos (Atf1p, Atf2p, Eht1p, Eeb1p y Iah1p). Además, en la levadura de flor se estableció un número mayor de correlaciones significativas entre los metabolitos y las proteínas.

Estos resultados han sido publicados en la revista científica *Microorganisms*, cuyo título es “Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration”.

*Microorganisms*, 8(3), 403. doi:10.3390/microorganisms8030403.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	105/186



Article

# Differential Analysis of Proteins Involved in Ester Metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* Strains during the Second Fermentation in Sparkling Wine Elaboration

Maria del Carmen González-Jiménez <sup>1</sup>, Jaime Moreno-García <sup>1</sup> , Teresa García-Martínez <sup>1,\*</sup> , Juan José Moreno <sup>2</sup> , Anna Puig-Pujol <sup>3</sup>, Fina Capdevilla <sup>3</sup> and Juan Carlos Mauricio <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Microbiology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; b02gojim@uco.es (M.d.C.G.-J.); b62mogaj@uco.es (J.M.-G.); mi1gamaj@uco.es (J.C.M.)

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

<sup>3</sup> Department of Enological Research, Institute of Agrifood Research and Technology-Catalan Institute of Vine and wine (IRTA-INCAVI), 08720 Barcelona, Spain; anna.puig@irta.cat (A.P.-P.); fcapdevila@gencat.cat (F.C.)

\* Correspondence: mi2gamam@uco.es; Tel.: +34 957218640; Fax: +34 957218650

Received: 29 January 2020; Accepted: 11 March 2020; Published: 13 March 2020



**Abstract:** The aromatic metabolites derived from yeast metabolism determine the characteristics of aroma and taste in wines, so they are considered of great industrial interest. Volatile esters represent the most important group and therefore, their presence is extremely important for the flavor profile of the wine. In this work, we use and compare two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: P29, typical of sparkling wines resulting of second fermentation in a closed bottle; G1, a flor yeast responsible for the biological aging of Sherry wines. We aimed to analyze and compare the effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on esters metabolism with the proteins related in these yeast strains, to understand the yeast fermentation process in sparkling wines. For this purpose, protein identification was carried out using the OFFGEL fractionator and the LTQ Orbitrap, following the detection and quantification of esters with gas chromatograph coupled to flame ionization detector (GC-FID) and stir-bar sorptive extraction, followed by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS). Six acetate esters, fourteen ethyl esters, and five proteins involved in esters metabolism were identified. Moreover, significant correlations were established between esters and proteins. Both strains showed similar behavior. According to these results, the use of this flor yeast may be proposed for the sparkling wine production and enhance the diversity and the typicity of sparkling wine yeasts.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; sparkling wine; second fermentation; esters; proteins; CO<sub>2</sub> overpressure; flor yeast1

## 1. Introduction

Sparkling wine is an ancient beverage appreciated for its unique and pleasant taste. This is attributed to aroma compounds that are produced during fermentation, highlighting the higher alcohols and esters. Esters are the primary source of fruity aromas and extremely important for the flavor profile of the wine. The main pathway that leads to the formation of aroma compounds that contribute to the wine organoleptic properties are the Ehrlich pathway for higher alcohols or the enzymes responsible for the formation of esters. These biochemical pathways were studied mainly in yeast species [1] that include more than 2000 yeast species; some of them have different and potentially interesting yeast species for the food and beverage industries [2].

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	106/186



Over the years, attempts have been performed to determine the biochemical mechanisms of formation of volatile sparkling wine compounds during the first and second fermentation [3–5]. The formation of esters during fermentation is a dynamic process [6]. Particularly, the concentration of esters produced depend on the yeast strain [7–12], fermentation temperature [13,14], the material insoluble in the must [11,15], winemaking methods [16–19], pH [20], the amount of SO<sub>2</sub> [11,21], the amino acids present in the must [11,22,23], the glucose and dissolved oxygen [24], malolactic fermentation [25,26], and the presence of lees in the wine [27,28]. The maximum concentration of esters is obtained when yeasts reach the stationary growth phase [6]. Esters can be divided into two main groups. The first group is constituted by acetate esters, in which acetate is the acid group and ethanol or an alcohol complex derived from the metabolism of the amino acids, are the alcohol group. Some compounds of this group are ethyl acetate (solvent-similar aroma), isoamyl acetate (banana aroma), and phenyl ethyl acetate (roses or honey aroma) [29]. The second group of esters is formed by the ethyl esters. In this one, the alcohol group is ethanol and the acid group is a medium-chain fatty acid. Ethyl hexanoate (anise seed), ethyl octanoate (acid apple aroma), ethyl decanoate (floral aroma), and ethyl lactate (milk, soapy, buttery, fruity) are included in this group [27]. Aroma thresholds (mg/L) are described in Sumby et al. (2010) [30].

The enzymatic accumulation of esters is the result of the balance of synthesis and hydrolysis enzymatic reactions. These enzymatic activities are very low during the fermentation of grape must [8,24,31]. *S. cerevisiae* genome encodes five known genes (*ATF1*, *ATF2*, *EHT1*, *EEB1*, and *IAH1*) that are involved in ester synthesis and hydrolysis. *Atf1p*, *Atf2p*, *Eht1p*, and *Eeb1p* are proteins implied in ester synthesis and *Iah1p* is, primarily, involved in acetate esters hydrolysis [30]. The role of *Atf1p* and *Atf2p* in acetate ester synthesis is clear, however, the role of *Eht1p* and *Eeb1p* in ethyl ester synthesis needs to be more accurately defined. The synthesis of acetate esters in *S. cerevisiae* occurs during the fermentation and it is highly associated with lipid metabolism and yeast growth. These compounds are synthesized in the cytoplasm as result of reactions catalyzed by acyl transferase enzymes, in which Acyl-CoA is required as a co-substrate. Most of the required Acyl-CoA is generated by oxidative decarboxylation of pyruvate, giving rise to Acetyl-CoA, while the rest of Acyl-CoA is formed by the acylation between fatty acids and free coenzyme A (CoA). In the absence of oxygen, the reaction between Acetyl-CoA and alcohol (ethanol or higher alcohols) allows the formation of acetate esters, while the combination between the long chains of Acyl-CoA and ethanol produce ethyl esters. Once synthesized within the cell, by their lipophilic nature, the esters can diffuse through the cell membrane to be released into the fermentation medium [29].

The final concentration of acetate esters is also influenced by the presence of esterases, a group of hydrolase enzymes that catalyze the breakdown of esters or prevent their formation [8,29]. Particularly, the *Iah1p* enzyme plays an important role in the hydrolysis of isoamyl acetate, ethyl acetate, isobutyl acetate, and phenylethyl acetate. As it was previously reported, esters are extremely important in the taste of wines. It is known that these metabolites are in very low concentrations, close to their threshold values [30]. The fact that most esters are present in such concentrations implies that small changes in the concentration could have a relevant effect on the taste of the wine.

This study is based on previous works by our research group [32,33] aimed to study the general aroma compound profile of P29 and G1. Specifically, we focused on the esters because of their positive impact on the organoleptic properties and provide, for the first time, the proteins involved in their metabolism and a metabolome–proteome relation during the second fermentation in the production of sparkling wine (cava wine). The use of unconventional yeast strains to produce new or improved fermented beverages, such as sparkling wines, is an interesting approach according to several authors [12,34–36]. The use of a flor yeast for the production of sparkling wine would be interesting due to its high tolerance to ethanol or its adhesive properties that facilitate its better recovery in the “degüelle” phase, making the flor yeast ideal for a second fermentation in the bottle. This would mean a reduction in production costs and manufacturing time, an increase in the biodiversity of yeast strains in the production of sparkling wine and typicity elaborated wines with an own flor yeast strain from DO

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	107/186



Montilla-Moriles (south of Spain). Furthermore, this study helps to understand how endogenous CO<sub>2</sub> overpressure can affect the sensory characteristics of sparkling wines during the second fermentation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganisms and Conditions Studied

Two strains of *S. cerevisiae* were used: G1 strain (ATCC: MYA-2451) is a wine flor yeast isolated from a flor velum in a barrel under biological aging of “Fino” Sherry wine of the designation of origin (DO) Montilla-Moriles in Cordoba (Spain). The other one is the P29 strain (CECT11770), typical of sparkling wines resulting of second fermentation in a closed bottle. It was isolated from Penedès designation of origin (DO) Barcelona (Spain).

For the inoculum, a total of  $1 \times 10^6$  yeast cells/mL, which were previously grown in medium YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) at 21 °C for 48 h, were incubated for 5 days at 21 °C using gentle agitation of 100 rpm for their growth in a pasteurized must of Macabeo grape variety (174.9 g/L of sugar, 18.5 °Bx, 3.6 g/L of total acidity, and 3.43 pH). When ethanol content of 10.39 % (v/v) was reached, the yeast cells were inoculated into bottles for the run along with a standardized commercial base wine, 21 g/L sucrose, and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL. This base wine is composed of Macabeo:Chardonnay (6:4), 10.21 % (v/v) of ethanol, 0.3 g/L of sugar, pH 3.29, 5.4 g/L of total acidity, and 0.21 g/L of volatile acidity. The second fermentation was carried out in a thermostatic chamber at 14 °C in bottles with a volume of 750 mL. In order to study the effect of CO<sub>2</sub> released by yeasts during this fermentative process, the bottles were divided into groups for the study of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure. Three bottles were used for proteomic and metabolomic analyses at each sampling time: BW, MFP (+), EFP (+), MFP (−), and EFP (−), with a total of 15 bottles for each strain. Therefore, a total of 30 bottles were used.

For the condition with CO<sub>2</sub> pressure, the bottles were hermetically sealed with a plug and with a metal crown capsule, hereinafter referred to as a pressure condition, P (+); the bottles belonging to the condition without pressure were closed with a perforated shutter, constituting the condition without CO<sub>2</sub> pressure, P (−). During the process, the following samples were taken: (a) at the beginning of the inoculation in the base wine, BW; (b) in the middle of the second fermentation, MF (3 atm pressure); (c) at the end of the second fermentation, EF (6.5 atm). At the same time, samples of the condition without CO<sub>2</sub> pressure were taken, obtaining a content of sugar consumed and ethanol produced similar for both conditions: sugar consumption (MF:  $9.07 \pm 0.26$  g/L and EF:  $0.3 \pm 0.0$  g/L) and ethanol content (MF:  $10.74 \pm 0.03\%$  v/v and EF:  $11.56 \pm 0.04\%$  v/v).

Cell viability was determined by spreading 100 µL volumes of diluted suspension on YPD (yeast extract, peptone, dextrose) agar plates and counting colonies after 48 h at 28 °C.

### 2.2. Analysis of Volatile Metabolites

The detection of volatile compounds in wine is based on the different physico-chemical properties such as volatility or solubility in different organic phases. Majority compounds do not need to be pre-concentrated beforehand, since they have a high enough concentration to be detected. Ethyl acetate and ethyl lactate were detected using the direct injection method in an Agilent 6890 Series II gas chromatograph equipped with a fused silica capillary column CP-WAX 57 CB (60 m long, 0.25 mm internal diameter, and 0.4 µm film thickness) attached to a FID detector. The temperature program was as it follows: 50 °C for 15 min and then raised to 190 °C at 4 °C/min for 35 min. The flow rate of the carrier gas (helium) was held at 0.7 mL/min for 16 min and then raised at 0.2 to 1.1 mL/min for 52 min. The flame ionization detector temperature was 300 °C, and the hydrogen and air flow rates were 40 and 400 mL/min, respectively. A post run purge program at 200 °C for 35 min and a helium flow rate of 1.3 mL/min were used after the chromatographic peaks of interest were eluted. A solution of 1 g/L of 4-methyl-2-pentanol in pure ethanol was used as internal standard. These chromatographic conditions are described in Peinado et al. (2004) [37].

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	108/186



The other group of volatile compounds analyzed was those found in low concentrations, less than 10 mg/L, that need to be extracted and concentrated in order to detect them. These volatile compounds are called minority compounds and were identified using the SBSE (stir bar sorptive extraction), followed by thermal desorption and gas chromatography coupled to a mass spectrometer (SBSE-TD-GC-MS). The SBSE-TDU-GC-MS analytical platform consisted of an Agilent-7890<sup>o</sup> chromatograph, a MSD 5975 mass detector (Agilent Technologies), and the Gerstel thermal desorption unit (TDU) coupled to a CIS-4 injection system. Agilent and an HP-5 capillary column 30 m long, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 µm film thickness. This technique uses a magnetic stirring bar, called Twister (0.5 mm thick coated and 10 mm long) packed with polydimethylsiloxane (PDMS). A 10 mL vial was filled with 0.5 mL of sample and 0.1 mL of an internal standard solution (0.4464 mg/L ethyl nonanoate in pure ethanol plus a solution of 12% (v/v) ethanol adjusted to pH 3.5 with 2.6 g/L tartaric acid and 2.2 g/L potassium bitartrate). The final volume was 10 mL. Compounds were thermally desorbed at an initial temperature of 35 °C for 0.1 s, using a 120 °C/min ramp to 280 °C for 10 min and a helium stream at 16 mL/min in the splitless mode into a cooled injection system (CIS-4) from Agilent Technologies. The 7890A GC instrument was equipped with an HP5MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm) from Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA). The oven initial temperature was set at 50 °C for 2 min and then increased with 4 °C/min to a final temperature of 190 °C that was maintained for 10 min. The MSD was used at 70 eV in the electron impact mode (EI), using the mass range from 35 to 550 Da at 150 °C. More detailed information is described in other publications [38,39].

### 2.3. Proteomic Analysis

#### Extraction, Identification, and Quantification of Proteins

The cells were collected from each bottle (data shown in Table 1) by centrifugation at 4500× g for 10 min by a centrifuge (Rotina-38), washing the sediment twice with sterile distilled cold water. Afterwards, a total of  $2 \times 10^9$  cells of each condition counted with Beckman Coulter Z2 Particle Counter were used for protein extraction. This amount of yeast cells was broken by a mechanical technique in Vibrogen Cell Mill V6 (Edmund Bühler) using 500 µm diameter glass balls. Once the cells were broken, the protein pull was extracted. For this purpose, extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, and 1 mM PMSF) and a protease inhibitor cocktail were used.

**Table 1.** Amount of viable cells in the studied conditions (CFU/mL).

	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)
<b>G1 strain</b>	$1.5 \times 10^6 \pm 0$	$3.71 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^5$	$7.12 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	$2.87 \times 10^6 \pm 4.9 \times 10^5$	$3.5 \times 10^3 \pm 7.07 \times 10^2$
<b>P29 strain</b>	$1.5 \times 10^6 \pm 0$	$5.53 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^6$	$1.14 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^5$	$8.02 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^6$	$3.33 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$

\* BW: base wine; MFP (+): middle of fermentation with pressure; MFP (-): middle of fermentation without pressure; EFP (+): end of fermentation with pressure; EFP (-): end of fermentation without pressure.

Later, the protein concentration was estimated by the Bradford test (1976) [40] to subsequently proceed to protein analysis. To perform this analysis, 500 µg of total protein from each condition and replica was loaded into the tray of the well of the OFFGEL 3100 fractionator from Agilent Technologies. Previously the protein samples were solubilized in Protein OFFGEL fractionation buffer containing urea, thiourea, DTT, glycerol, and buffer with ampholytes. The aliquots were distributed in the OFFGEL 3100 fractionator from Agilent Technologies, in a tray with wells. The separation limits of the OG12PR00 program that were used were: 4500 V, 200 mW, and 50 µA; starting with a voltage of 200–1500 V; the termination voltage 5000–8000 V; and a constant voltage for the protein separation zones after the application of 20 kWh.

Once the proteins were separated according to their isoelectric point, the fractions of each well were collected, and their identification was carried out. For identification, protein fractions were analyzed on a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer equipped with a nano LC Ultimate 3000 system

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	109/186



at the Central Research Support Service (SCAI) of the University of Cordoba. Proteins have to be digested with trypsin, previously. For this, 20 mM dithiothreitol in 25 mM ammonium bicarbonate (AB) incubated for 20 min at 55 °C was added to the sample to work under reducing conditions. The mixture was cooled to room temperature and the free thiols were alkylated by adding 40 mM iodoacetamide in 25 mM AB in the dark for 20 min. Proteolytic digestion was performed by adding 12.5 ng/μL trypsin (Promega) in 25 mM AB and incubation at 37 °C overnight. The tryptic digestion was stopped by the addition of trifluoroacetic acid at a final concentration of 1% and the digested samples were finally dried in Speedvac. Then, the sample was introduced into the LTQ Orbitrap XL mass spectrometer equipped with a nano LC Ultimate 3000 system for analysis. The electrospray voltage was set at 1300 V and the capillary voltage at 50 V at 190 °C. The LTQ Orbitrap was operated in parallel mode, which allowed an accurate measurement of the precursor ion (400–1500 m/z) in the Orbitrap selection and provided 60,000 full widths at a maximum average resolution with the acquisition of three CIDs dependent on the MS/MS scanned data in the LIT for the peptide sequence, followed by three scanned HCD MS/MS data (100–2000 m/z) with resolution 7500 FWHM m/z 400 for peptide sequencing and quantification. Conditions are described more in detail in an article published previously by Moreno-García et al. (2015) [41]. For the identification of proteins, a search was made in the Proteoma Discoverer V database. 1.0 (Thermo Fisher Scientific Software, San Jose, CA, USA) against the Uniprot database and the fixed modification of carbamidomethylation in the amino acid cysteine was included and the proteome results were statistically analyzed using the same software.

Finally, the proteins identified were quantified following the Exponentially Modified Protein Abundance Index, EmpAI, a method described by Ishihama et al. (2005) [42].

#### 2.4. Statistical Analysis

All tests were performed in triplicate (n = 3). The data was previously normalized with the square root and then scaled by the Pareto method, to avoid the differences introduced by the units of measurement [43].

The data was processed using the Statgraphics Centurion XVI.II statistical package, from STSC, Inc. (Rockville, MD). The methodologies applied were ANOVA and Fisher's test for the establishment of homogeneous groups (HG), whose objective is to establish differences between the samples, with a level of significance  $p \leq 0.05$ . In addition, a principal component analysis (PCA) was performed to find those variables that establish differences between the two types of strains studied.

In addition, a heat map was made for a quick visualization of the changes in concentration of the analyzed compounds and a correlation analysis to establish significant relationships between metabolites and proteins. Both analyses were performed with the help of the Metaboanalyst database (<https://www.metaboanalyst.ca/>). The correlation matrix shows the relationships between all the variables and compares them one by one, which results in a set of data whose Pearson correlation coefficient (r) is in a range of -1 to 1. A value of correlation coefficient closes to -1 indicates that there is a strong and inverse linear relationship between the variables, while a correlation coefficient value close to 1 indicates a strong and direct linear relationship between the variables. Correlation coefficient values close to 0 are non-significant values and, therefore, it is assumed that there is no linear relationship between the variables.

### 3. Results and Discussion

A total of 20 esters were identified; 15 were identified in both strains, however, the ethyl hexanoate and ethyl lactate were only identified in the flor yeast while isobutyl acetate, ethyl 2-methyl butanoate, ethyl 3-methyl butanoate in the P29 strain (Table 2 and Supplementary Materials). The five proteins involved in the ester metabolism were identified in this study at low concentrations [8,30,44–49]. These proteins were Atf1p, Atf2p, Iah1p, Eeb1p, and Eht1p. Besides, Atf2p was not found in the P29 strain and Eeb1p in the G1 strain. Iah1p was the most abundant protein and it was found in most conditions (Table 3 and Supplementary Materials).

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	110/186



**Table 2.** Determination of the concentration (mg/L) of esters by gas chromatograph coupled to flame ionization detector (GC-FID) and stir-bar sorptive extraction, followed by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-TD-GC-MS).

	P29 Strain									
	G1 Strain					Concentration (mg/L)				
	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)
Methyl acetate	0.071 <sup>a</sup> ±0.008	0.132 <sup>b</sup> ±0.004	0.257 <sup>d</sup> ±0.006	0.140 <sup>b</sup> ±0.001	0.18 <sup>c</sup> ±0.03	0.071 <sup>a</sup> ±0.008	0.23 <sup>b</sup> ±0.09	0.22 <sup>b</sup> ±0.03	0.32 <sup>b</sup> ±0.05	0.30 <sup>b</sup> ±0.03
Hexyl acetate	0.256 <sup>d</sup> ±0.007	0.124 <sup>ab</sup> ±0.003	0.102 <sup>a</sup> ±0.004	0.144 <sup>c</sup> ±0.003	0.122 <sup>bc</sup> ±0.002	0.256 <sup>d</sup> ±0.007	0.23 <sup>ab</sup> ±0.02	0.22 <sup>b</sup> ±0.01	0.20 <sup>a</sup> ±0.04	0.22 <sup>a</sup> ±0.02
Phenylethyl acetate	0.76 <sup>c</sup> ±0.02	0.41 <sup>a</sup> ±0.03	0.411 <sup>a</sup> ±0.009	0.51 <sup>b</sup> ±0.04	0.49 <sup>b</sup> ±0.03	0.76 <sup>rs</sup> ±0.02	0.84 <sup>rs</sup> ±0.06	0.82 <sup>rs</sup> ±0.05	0.79 <sup>rs</sup> ±0.08	0.81 <sup>rs</sup> ±0.07
Ethyl acetate	19.9 <sup>b</sup> ±0.8	12 <sup>a</sup> ±3	20.2 <sup>b</sup> ±0.9	13.9 <sup>a</sup> ±0.4	14 <sup>b</sup> ±4	19.9 <sup>rs</sup> ±0.8	21 <sup>rs</sup> ±3	21.69 <sup>rs</sup> ±0.02	21.4 <sup>rs</sup> ±0.7	22 <sup>rs</sup> ±5
Isoamyl acetate	6.1 <sup>c</sup> ±0.7	2.50 <sup>a</sup> ±0.01	2.4 <sup>a</sup> ±0.4	2.23 <sup>a</sup> ±0.02	2.2 <sup>b</sup> ±0.8	6.1 <sup>b</sup> ±0.7	5.8 <sup>b</sup> ±0.4	4.7 <sup>b</sup> ±0.4	5.1 <sup>ab</sup> ±0.3	5.1 <sup>ab</sup> ±0.5
Isobutyl acetate	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f. <sup>a</sup>	0.010 <sup>b</sup> ±0.002	0.011 <sup>b</sup> ±0.001	0.009 <sup>b</sup> ±0.001	0.009 <sup>b</sup> ±0.002
Ethyl isobutanoate	0.0032 <sup>d</sup> ±0.0004	0.0013 <sup>b</sup> ±0.0001	0.0010 <sup>a</sup> ±0.0004	0.0009 <sup>a</sup> ±0.0002	0.0026 <sup>c</sup> ±0.0001	0.0032 <sup>c</sup> ±0.0004	0.0015 <sup>b</sup> ±0.0002	0.0004 <sup>a</sup> ±0.0005	0.0014 <sup>b</sup> ±0.0001	0.0016 <sup>b</sup> ±0.0005
Ethyl dodecanoate	0.0005 <sup>a</sup> ±0.0001	0.0183 <sup>c</sup> ±0.0008	0.0017 <sup>b</sup> ±0.0003	0.021 <sup>c</sup> ±0.001	0.0004 <sup>a</sup> ±0.0002	0.0005 <sup>a</sup> ±0.0001	0.053 <sup>c</sup> ±0.002	0.031 <sup>d</sup> ±0.003	0.0061 <sup>b</sup> ±0.0006	0.008 <sup>c</sup> ±0.001
Ethyl tetradecanoate	n.f. <sup>a</sup>	0.00174 <sup>d</sup> ±0.0003	n.f. <sup>a</sup>	0.0003 <sup>c</sup> ±0.0006	0.0002 <sup>b</sup> ±0.0009	n.f. <sup>a</sup>	0.0012 <sup>cd</sup> ±0.0001	0.0013 <sup>d</sup> ±0.0001	0.0007 <sup>b</sup> ±0.0001	0.0012 <sup>b</sup> ±0.0001
Ethyl hexadecanoate	0.0021 <sup>a</sup> ±0.0003	0.0077 <sup>e</sup> ±0.0002	0.0051 <sup>b</sup> ±0.0002	0.0065 <sup>d</sup> ±0.0002	0.0059 <sup>c</sup> ±0.0002	0.0021 <sup>a</sup> ±0.0003	0.0027 <sup>b</sup> ±0.0001	0.007 <sup>c</sup> ±0.004	0.0030 <sup>b</sup> ±0.0006	0.0035 <sup>b</sup> ±0.0006
Ethyl heptanoate	n.f. <sup>a</sup>	0.006 <sup>c</sup> ±0.001	0.006 <sup>c</sup> ±0.002	0.007 <sup>d</sup> ±0.001	0.002 <sup>b</sup> ±0.001	n.f. <sup>a</sup>	0.009 <sup>b</sup> ±0.002	0.008 <sup>b</sup> ±0.003	0.028 <sup>c</sup> ±0.003	0.0094 <sup>b</sup> ±0.00004
Ethyl 2-methyl octanoate	0.0031 <sup>a</sup> ±0.0002	0.0041 <sup>b</sup> ±0.0003	0.0035 <sup>ab</sup> ±0.0003	0.0048 <sup>b</sup> ±0.0004	0.0048 <sup>b</sup> ±0.0006	0.0031 <sup>a</sup> ±0.0002	0.0044 <sup>b</sup> ±0.0002	0.0045 <sup>ab</sup> ±0.0001	0.0046 <sup>b</sup> ±0.0003	0.00370 <sup>a</sup> ±0.00002
propanoate	0.187 <sup>c</sup> ±0.005	0.129 <sup>b</sup> ±0.003	0.173 <sup>c</sup> ±0.004	0.0687 <sup>a</sup> ±0.0002	0.130 <sup>b</sup> ±0.001	0.187 <sup>rs</sup> ±0.005	0.17 <sup>rs</sup> ±0.03	0.19 <sup>rs</sup> ±0.01	0.21 <sup>rs</sup> ±0.06	0.20 <sup>rs</sup> ±0.01
Ethyl decanoate	0.66 <sup>d</sup> ±0.01	0.56 <sup>c</sup> ±0.03	0.35 <sup>b</sup> ±0.02	0.67 <sup>d</sup> ±0.02	0.23 <sup>b</sup> ±0.01	0.66 <sup>rs</sup> ±0.01	0.65 <sup>rs</sup> ±0.02	0.64 <sup>rs</sup> ±0.03	0.69 <sup>rs</sup> ±0.01	0.5 <sup>rs</sup> ±0.2
Ethyl butanoate	2.18 <sup>d</sup> ±0.01	0.201 <sup>a</sup> ±0.002	0.32 <sup>b</sup> ±0.01	0.202 <sup>a</sup> ±0.002	0.41 <sup>c</sup> ±0.01	2.18 <sup>a</sup> ±0.01	0.26 <sup>b</sup> ±0.01	0.25 <sup>bc</sup> ±0.02	0.30 <sup>c</sup> ±0.01	0.29 <sup>bc</sup> ±0.01
Ethyl hexanoate	n.f. <sup>a</sup>	0.771 <sup>b</sup> ±0.002	0.86 <sup>c</sup> ±0.03	0.78 <sup>b</sup> ±0.01	0.85 <sup>c</sup> ±0.03	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Ethyl lactate	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	45 <sup>c</sup> ±2	n.f. <sup>a</sup>	31 <sup>b</sup> ±5	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Ethyl octanoate	2.799 <sup>d</sup> ±0.001	1.621 <sup>b</sup> ±0.002	1.5 <sup>b</sup> ±0.01	1.99 <sup>c</sup> ±0.03	1.26 <sup>b</sup> ±0.04	2.799 <sup>b</sup> ±0.001	2.2 <sup>a</sup> ±0.2	2.45 <sup>ab</sup> ±0.03	2.6 <sup>b</sup> ±0.2	2.1 <sup>a</sup> ±0.1
Ethyl 2-methyl butanoate	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f. <sup>a</sup>	0.0161 <sup>b</sup> ±0.0001	0.0158 <sup>b</sup> ±0.0001	0.0163 <sup>b</sup> ±0.001	0.0221 <sup>c</sup> ±0.0002
Ethyl 3-methyl butanoate	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f. <sup>a</sup>	0.028 <sup>b</sup> ±0.001	0.026 <sup>b</sup> ±0.002	0.034 <sup>c</sup> ±0.001	0.036 <sup>c</sup> ±0.002

\* Different letters (a-b) in the same row are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) according to Fisher's test, ns = non-significant. BW: base wine; MFP (+): middle of fermentation with pressure; MFP (-): middle of fermentation without pressure; EFP (+): end of fermentation with pressure; EFP (-): end of fermentation without pressure. \*\* n.f.—not found





**Table 3.** Determination of protein content (mol%) by the abundance index (EmPAI) of the proteins identified in each condition related to the esters metabolism.

	G1 Strain					P29 Strain				
	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)
Atf1p	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	0.032 <sup>b</sup> ±0.005	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	0.004 <sup>b</sup> ±0.002	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>
Atf2p	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	0.011 <sup>b</sup> ±0.003	n.f. <sup>a</sup>	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Eht1p	0.007 <sup>b</sup> ±0.001	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	0.022 <sup>b</sup> ±0.001	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>
Eeb1p	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.012 <sup>b</sup> ±0.004	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>	n.f. <sup>a</sup>
Iah1p	0.033 <sup>d</sup> ±0.003	0.009 <sup>b</sup> ±0.001	n.f. <sup>a</sup>	0.022 <sup>c</sup> ±0.003	n.f. <sup>a</sup>	0.021 <sup>d</sup> ±0.001	0.018 <sup>b</sup> ±0.001	0.025 <sup>e</sup> ±0.002	0.0195 <sup>e</sup> ±0.0002	n.f. <sup>a</sup>

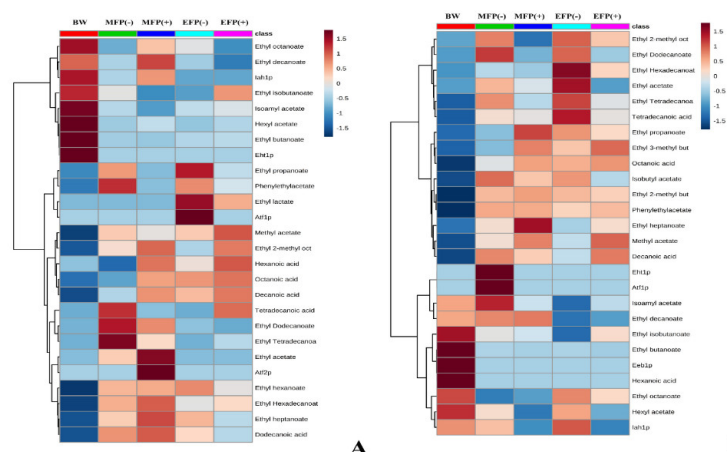
\* Different letters (a-b) in the same row are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) according to Fisher's test. BW: base wine; MFP (+): middle of fermentation with pressure; MFP (-): middle of fermentation without pressure; EFP (+): end of fermentation with pressure; EFP (-): end of fermentation without pressure. \*\* n.f.—not found

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM		Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica			
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ			
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	112/186	



The esters were classified into 6 acetate esters (ethyl acetate, methyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, hexyl acetate, and phenylethyl acetate) and 14 ethyl esters (ethyl lactate, ethyl propanoate, ethyl isobutanoate, ethyl butanoate, ethyl 2-methyl butanoate, ethyl 3-methyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate, ethyl octanoate, ethyl 2-methyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, ethyl tetradecanoate, and ethyl hexadecanoate).

The evolution of the metabolites as well as of the proteins is represented throughout the second fermentation process for both pressure and without CO<sub>2</sub> pressure conditions for both strains by a heatmap (Figure 1). In this way, a general and integrated view of the metabolome and proteome involved in this process is obtained, allowing a first approach. Figure 1A showed how hexanoic acid or dodecanoic acid, as well as ethyl hexanoate, were present in higher concentrations in the G1 strain. The enzyme Atf2p also stands out, whose concentration increased in the middle of the second fermentation under pressure conditions. Figure 1B exhibited that esters such as phenylethyl acetate, ethyl 3-methylbutanoate, isobutyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate, or acids such as octanoic acid and decanoic acid were found at a higher concentration throughout the fermentation process both under study conditions and in the P29 strain. As for the proteins, the proteins Eht1p and Atf1p showed a high concentration in the P29 strain in the middle of the second fermentation in the condition without CO<sub>2</sub> pressure, suggesting a possible relationship between them. Eht1p was also important in the P29 strain in the no-pressure condition, although the metabolites associated with this strain did not reduce its concentrations as would be expected since there is a degradation enzyme. Finally, the Eeb1p enzyme showed a high content in the base wine of the P29 strain. A joint analysis of the heatmap data for both G1 and P29 strains showed that compounds such as ethyl tetradecanoate, tetradecanoic acid, 2-methyl ethyl octanoate, or ethyl hexadecanoate showed considerable concentrations, regardless of the strain. Other metabolites such as ethyl butanoate or ethyl isobutanoate are associated with the base wine, their concentration is reduced during the fermentation process in both strains and conditions.



**Figure 1.** Heat map of the group of metabolites and proteins for flor yeast (A) and the P29 strain (B). \*The dendrograms that indicate the grouping of variables and can be visualized in the left of the diagram. The key shown indicates the tones associated with values in the cells. In order to make full use of the shadow information, the data are normalized. The average of each condition is represented in the first top row: base wine, BW; middle of the fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure, MFP (-); middle of the fermentation with CO<sub>2</sub> overpressure, MFP (+); final fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure, EFP (-); final fermentation with CO<sub>2</sub> overpressure, EFP (+).

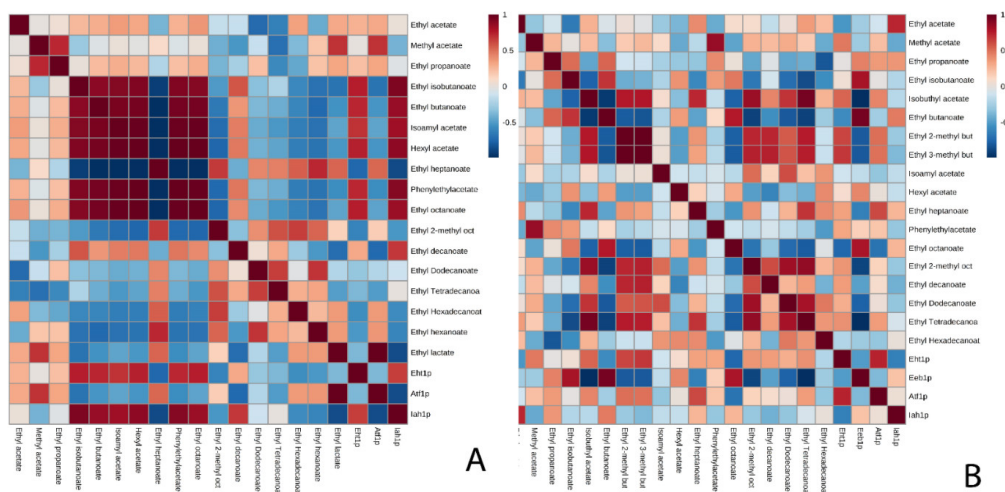
### 3.1. Acetate Esters

In the condition without CO<sub>2</sub> overpressure, the metabolomic profile obtained for the acetate esters was not similar for both strains. However, there was in both cases, an increase in the concentration of

methyl acetate and a decrease in the concentrations of hexyl acetate, and isoamyl acetate was obtained (Table 2 and Supplementary Materials). According to the literature, compounds of hexyl acetate and phenylethyl acetate decrease during cava production, so that they could be used as aging markers [50].

In the P29 strain, the amount of isobutyl acetate increased (0.01 mg/L), not being identified in flor yeast (G1 strain). This concentration is in agreement with the range established for the isobutyl acetate, between 0.01–0.8 mg/L in wine [51]. Ethyl acetate, the main ester produced in wine [51], was produced in high amounts in both strains (20–22 mg/L). Isoamyl acetate (2–5 mg/L) and 2-phenylethyl acetate (0.40–0.86 mg/L) constituted the following important ester compounds in the sparkling wines analyzed [28].

With respect to the proteins involved in the synthesis and degradation of these compounds, the behavior was different in each strain (Table 3 and Supplementary Materials). The protein that presented the highest protein content was Iah1p in both strains. In flor yeast, both proteins (Atf1p and Iah1p) were identified, Atf1p being the one that presented higher protein content at the end of the second fermentation (0.032 mol%). The correlation analysis (Figure 2A) showed a measured correlation with methyl acetate (0.692). During the course of the fermentation, the content of this protein and the concentration of this compound increased. Conversely, the behavior obtained for the proteins that intervened in the metabolism of the esters of the control strain (P29 strain) differed from the flor strain. In the P29 strain, Atf1p was identified in MF and not in the other conditions; and the protein content of Iah1p decreased in MF and increased in EF. In addition, in the correlation analysis shown in Figure 2B for Atf1p, it was observed that there was no significant correlation and the correlations obtained for Iah1p were close to zero, and no significant correlation could be established.



**Figure 2.** Matrix resulting from the analysis of correlations made for the condition without pressure in flor yeast (A) and in the P29 strain (B) with a level of significance of 95%.

It would be interesting to highlight the correlation obtained between an acetate ester synthesis protein with an ethyl ester in flor yeast. The correlation analysis (Figure 2A) presented a strong correlation between Atf1p and ethyl lactate (0.999). During the course of the fermentation, the content of this protein and the concentration of this compound increased. Ethyl lactate is predominantly produced during alcoholic fermentation from reactions between alcohols and Acetyl-CoA catalyzed by alcohol acetyltransferase [17]. In this study, ethyl lactate was identified at the end of the second fermentation in both conditions as in Ubeda et al. (2019) [28]. In addition, ethyl lactate has also been previously reported as a good marker of aging [52]. This increase is very interesting and it differentiates the behavior of this yeast compared to the P29 strain. On the other hand, a strong and

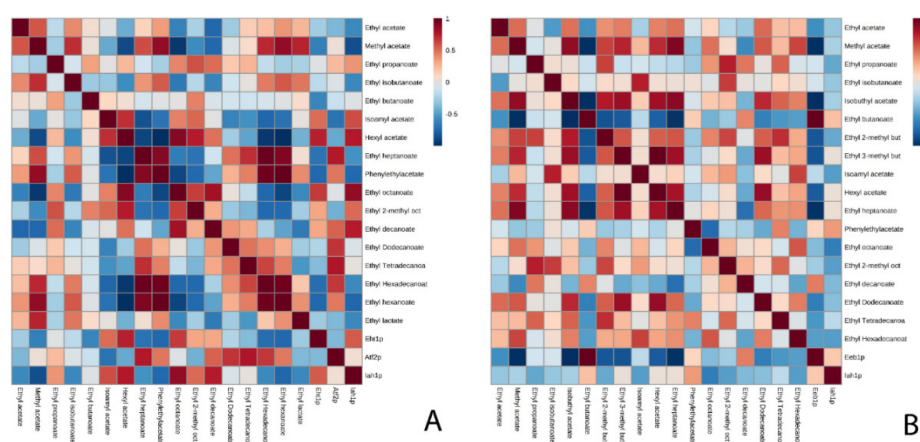
Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	114/186



inverse correlation was observed between Iah1p and ethyl lactate (−0.867), that is, as the protein content of Iah1p decreases, the amount of ethyl lactate increases.

Meanwhile, in the CO<sub>2</sub> overpressure condition, the metabolic behavior of both strains was different. In the P29 strain, there was an increase in the concentration of methyl acetate and isobutyl acetate in MF, remained unchanged at the end, EF. In the flor yeast, a significant decrease in the amount of most acetate esters was observed during the second fermentation, except for methyl acetate, whose concentration increased, and isobutyl acetate that was not identified. The concentration of the rest of acetate esters remained without significant differences during this study; except hexyl acetate that decreased as in the studies carried out by other authors [53].

The difference between both strains for the proteins involved in the formation and degradation of acetate esters (Atf1p, Atf2p, and Iah1p) was the detection of Atf2p in MF in the flor yeast, whereas in the P29 strain, this protein was not detected. Iah1p protein, showed an inverse correlation with phenylethyl acetate (−0.749) in flor yeast (Figure 3A); while in the P29 strain (Figure 3B), there was no correlation between Iah1p and phenylethyl acetate.



**Figure 3.** Matrix resulting from the analysis of correlations made for the CO<sub>2</sub> overpressure condition in flor yeast (A) and in the P29 strain (B) with a confidence level of 95%.

In this study, the behavior of each strain in terms of CO<sub>2</sub> overpressure was not affected, except for hexyl acetate and phenylethyl acetate, whose amount was greater in the CO<sub>2</sub> overpressure condition. However, with regard to the proteins, greater differences were found in terms of CO<sub>2</sub> overpressure, since Atf1p was not identified in both strains (Table 3 and Supplementary Materials). It seems that the synthesis of this protein could be repressed due to the overpressure to which yeasts are subjected because it has only been identified in no-pressure condition. However, more experiments are needed to corroborate this hypothesis.

It can be concluded after this study that the metabolic profile obtained is practically identical both with pressure and without pressure for each strain. This implies that the overpressure of CO<sub>2</sub> is not involved in the metabolism of acetate esters.

### 3.2. Ethyl Esters

With regards to the production of ethyl esters in sparkling wines, results depend on the yeast strain, the growth conditions, and the stress of the yeast [54]. Changes can be explained by the mechanism of adsorption–desorption of the cell walls and by the enzymatic or chemical hydrolysis of its esters, related to the phenomenon of autolysis of the yeast [32].

In the condition without CO<sub>2</sub> overpressure, the ethyl ester that showed the highest concentration in both strains was ethyl octanoate (1.5–3 mg/L). This compound confers sour and apple aroma [50].

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	115/186



This result was also reported by several authors such as López de Lerma et al. (2018) [55] in cava wines that use yeast strains in free forms, bio-immobilized or immobilized with alginate. In particular, the main compounds detected were ethyl butanoate, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate [55]. In our study, a different behavior was obtained in both strains with respect to the metabolism of the ethyl esters, except ethyl isobutanoate, ethyl heptanoate, ethyl 2-methyl butanoate, and ethyl octanoate.

No ethyl 2-methyl butanoate and 3-methyl butanoate ethyl were identified in flor yeast (G1 strain). The concentration of 6 ethyl esters decreased during the second fermentation. In addition, the concentration of the rest of esters increased significantly. On the other hand, in the P29 strain, ethyl hexanoate and ethyl lactate were not found. Additionally, most of the esters identified showed a significant increase in their concentration during the course of the second fermentation, except for ethyl isobutanoate, ethyl dodecanoate, ethyl butanoate, and ethyl octanoate, whose concentration decreased in EF. The decrease in esters during wine aging is generally attributed to the release of hydrolytic enzymes [56], so these results would be explained.

The proteins that intervene in the metabolism of ethyl esters are Eeb1p, Eht1p, and Iah1p. In flor yeast, Eht1p was identified in the base wine and Iah1p decreased its protein content during the second fermentation and it was not identified in EF. In contrast, in the P29 strain, Eht1p was identified only in MF, Eeb1p in the base wine, and the content of Iah1p decreased in MF but increased in EF. Such as the study of acetate esters, a correlation analysis was performed in order to identify correlations between proteins and ethyl esters. It was possible to establish in this case a greater number of correlations in the flor yeast (Figure 2A); for Eht1p, the strongest and most direct correlations were with ethyl isobutanoate (0.755), ethyl butanoate (0.730), and ethyl octanoate (0.756). If the protein content of Eht1p increases, the amount of these ethyl esters also increases. The concentration of ethyl heptanoate increases as the content of Iah1p decreases (−0.877), so in this case a strong and inverse correlation was established. The correlations established in the strain P29 for Eeb1p were the same as those of the flor yeast for Eht1p; ethyl isobutanoate (0.801), ethyl butanoate (0.960), and ethyl octanoate (0.796); while those established for Eht1p were with ethyl 2-methyl butanoate (0.634) and ethyl 3-methyl butanoate (0.678). However, no correlation of interest could be established between Iah1p and the rest of the ethyl esters (Figure 2B).

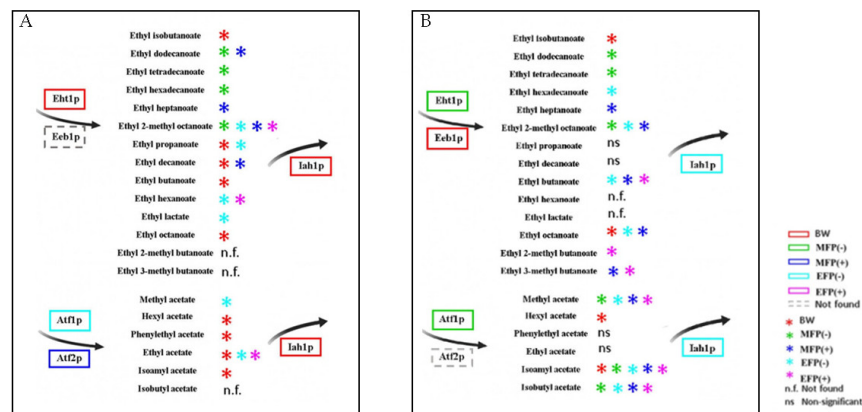
With regard to the CO<sub>2</sub> overpressure condition, in flor yeast, the amount of ethyl dodecanoate, ethyl hexadecanoate, ethyl heptanoate, ethyl propanoate, and ethyl decanoate was affected in EF, whereas in the P29 strain only its concentration of ethyl dodecanoate and ethyl heptanoate were affected. The CO<sub>2</sub> overpressure could be affecting the amount of ethyl heptanoate in EF, causing a decrease. The major difference observed in the flor yeast in the CO<sub>2</sub> overpressure condition was with ethyl propanoate, since this compound increased its content in EF while in the non-pressure CO<sub>2</sub> condition, it declined. The same happened in the P29 strain for ethyl dodecanoate: without pressure, this compound decreased its concentration in EF, while with CO<sub>2</sub> overpressure its amount increased during the second fermentation.

Regarding the protein analysis, in the flor yeast, a smaller number of proteins was identified than in P29. No protein was identified in EF in both strains. Eht1p and Iah1p were the ones with the highest protein content in P29. The number of correlations established between the proteins and the ethyl esters for the yeast was less than in the previous condition. In flor yeast, Eht1p could be correlated with ethyl octanoate (0.668) and Iah1p with ethyl hexanoate (−0.765) (Figure 3A). In the P29 strain, it could only be related to Eeb1p with ethyl butanoate (0.999) (Figure 3B).

The metabolites and proteins that presented the highest concentration in each strain are highlighted in a schematic figure (Figure 4) in order to provide a better understanding of the results obtained in this work.

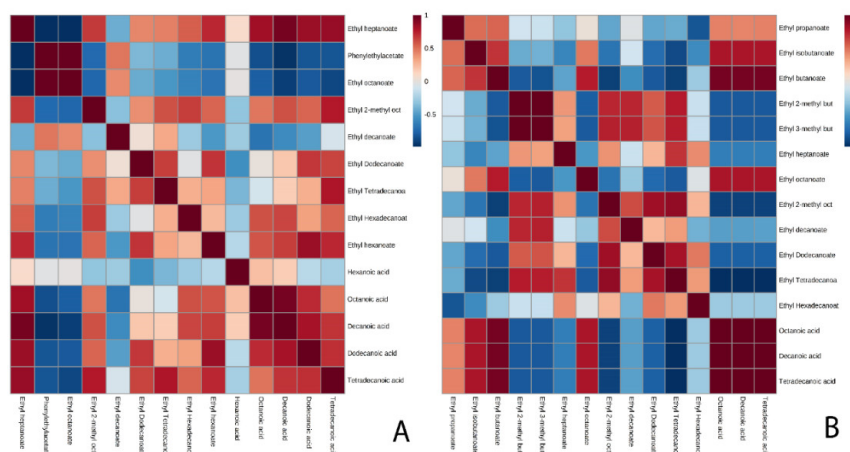
Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	116/186





**Figure 4.** Summary scheme of metabolites and proteins that presented a higher concentration in each study concentration and are involved with the metabolism of esters for flor yeast (A) and the strain P29 (B). The color of the asterisks and boxes represent the condition in which the metabolites and proteins were identified, respectively. Each condition is represented by a color: red for the base wine, BW; green for the middle of the fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure, MFP (-); dark blue for half fermentation with CO<sub>2</sub> overpressure, MFP (+); light blue final fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure, EFP (-); pink for final fermentation with CO<sub>2</sub> overpressure, EFP (+).

In order to perform a deeper study of the metabolism of ethyl esters, it was decided to study the potential substrates, that are, the medium chain fatty acids (Table 4 and Supplementary Materials). Five fatty acids (hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, and tetradecanoic acid) were identified in flor yeast, while 3 acids (octanoic acid, decanoic acid, and tetradecanoic acid) were identified in the P29 strain. In addition, correlations were established between ethyl esters and fatty acids, highlighting a greater number of correlations in the flor yeast compared to the P29 strain. In both conditions for the flor yeast, the fatty acids were related to ethyl heptanoate and ethyl hexanoate (Figures 5A and 6A). On the contrary, in the P29 strain, the correlations that were established in both conditions were different (Figures 5B and 6B), highlighting in the CO<sub>2</sub> overpressure condition, the correlation with ethyl heptanoate and the condition without pressure, the relationship with ethyl butanoate.



**Figure 5.** Matrix of correlations established between esters and fatty acids in the condition without CO<sub>2</sub> overpressure for flor yeast (A) and the P29 strain (B).

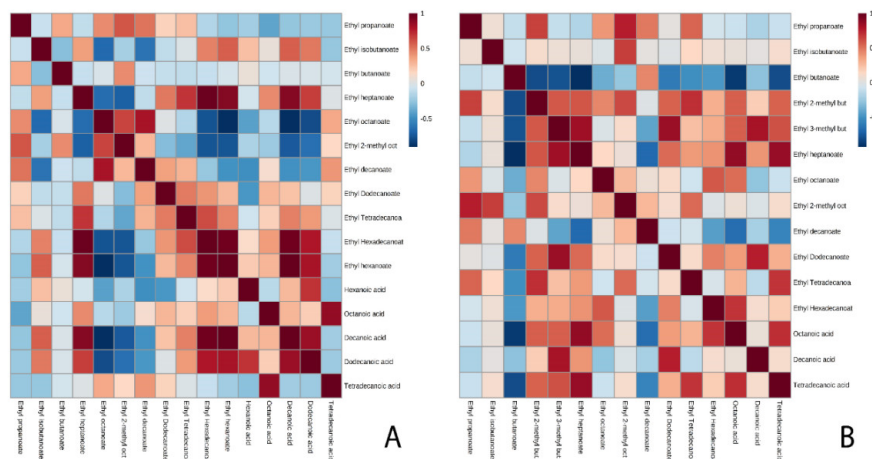
**Table 4.** Determination of the concentration (mg/L) of fatty acids involved in the synthesis of ethyl esters.

	P29 Strain									
	G1 Strain					Concentration (mg/L)				
	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)	BW	MFP (-)	EFP (-)	MFP (+)	EFP (+)
Hexanoic acid	0.137 <sup>a</sup> ±0.005	0.203 <sup>b</sup> ±0.006	0.20 <sup>b</sup> ±0.02	0.26 <sup>c</sup> ±0.03	0.26 <sup>c</sup> ±0.01	0.137 <sup>a</sup> ±0.005	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Octanoic acid	12.67 <sup>a</sup> ±0.06	18 <sup>b</sup> ±2	28 <sup>cd</sup> ±1	26 <sup>c</sup> ±1	28.4 <sup>d</sup> ±0.2	12.67 <sup>a</sup> ±0.06	31 <sup>b</sup> ±2	32 <sup>b</sup> ±1	31 <sup>b</sup> ±3	35 <sup>b</sup> ±2
Decanoic acid	0.91 <sup>a</sup> ±0.03	2.02 <sup>b</sup> ±0.01	2.7 <sup>c</sup> ±0.3	3.2 <sup>d</sup> ±0.1	3.22 <sup>d</sup> ±0.06	0.91 <sup>a</sup> ±0.03	3.2 <sup>b</sup> ±0.4	3.3 <sup>b</sup> ±0.4	3.0 <sup>b</sup> ±0.1	3.6 <sup>b</sup> ±0.5
Tetradecanoic acid	0.814 <sup>a</sup> ±0.002	0.93 <sup>c</sup> ±0.01	0.86 <sup>b</sup> ±0.01	0.871 <sup>b</sup> ±0.006	0.863 <sup>b</sup> ±0.003	0.814 <sup>a</sup> ±0.002	0.11 <sup>a</sup> ±0.03	0.17 <sup>b</sup> ±0.01	0.119 <sup>a</sup> ±0.004	0.1 <sup>a</sup> ±0.1
Dodecanoic acid	n.f. <sup>a</sup>	0.149 <sup>c</sup> ±0.001	0.125 <sup>b</sup> ±0.002	0.169 <sup>d</sup> ±0.006	0.119 <sup>b</sup> ±0.007	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

\* Different letters (a-b) in the same row are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) according to Fisher's test. BW: base wine; MFP (+): middle of fermentation with pressure; MFP (-): middle of fermentation without pressure; EFP (+): end of fermentation with pressure; EFP (-): end of fermentation without pressure. \*\* n.f.—not found

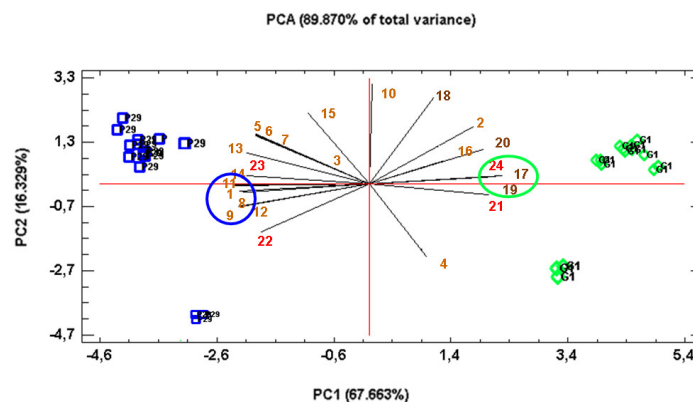
Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM		Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica			
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ			
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	118/186	





**Figure 6.** Matrix of correlations established between esters and fatty acids in the CO<sub>2</sub> overpressure condition for the flor yeast (A) and the P29 strain (B).

Finally, a multivariate analysis of the principal components was carried out to discriminate between the variables those that separate the flor yeast from the P29 strain. The PCA obtained (Figure 7) explained 89.870% of the total variance. PC1 (67.663%) separated with positive values the flor yeast to the P29 strain, with negative values. The variables that separated the flor yeast were hexanoic acid (0.246), tetradecanoic acid (0.246), and Atf2p (0.234). However, the acetate esters were the variables that discriminated against the P29 strain. These esters were ethyl acetate (−0.246), isoamyl acetate (−0.246), hexyl acetate (−0.241), and phenylethyl acetate (−0.247).



**Figure 7.** Principal component analysis, PCA. \*The different compounds were identified by numbers as follows: 1. Ethyl acetate, 2. Methyl acetate, 3. Ethyl propanoate, 4. Ethyl isobutanoate, 5. Isobutyl acetate, 6. Ethyl 2-methyl butanoate, 7. Ethyl 3-methyl butanoate, 8. Isoamyl acetate, 9. Hexyl acetate, 10. Ethyl heptanoate, 11. Phenylethyl acetate, 12. Ethyl octanoate, 13. Ethyl 2-methyl octanoate, 14. Ethyl decanoate, 15. Ethyl tetradecanoate, 16. Ethyl lactate, 17. Hexanoic acid, 18. Octanoic acid, 19. Tetradecanoic acid, 20. Dodecanoic acid, 21. Eht1p, 22. Eeb1p, 23. Atf1p, 24. Atf2p. The blue color for the P29 strain and green for the G1 strain (flor yeast) were used. Proteins (21–24) were represented in red, fatty acid esters (1–16) in dark yellow and fatty acids (17–20) in dark brown.

#### 4. Conclusions

This work focuses on investigating the possible use of a flor yeast for the production of sparkling wines, through the study of the metabolism of esters, and due to its strong influence on the organoleptic



properties of sparkling wines. In general, an insignificant effect of CO<sub>2</sub> overpressure on quantified esters was observed since the two strains analyzed showed a similar behavior during the second fermentation under both study conditions. Furthermore, in flor yeast, the content of proteins responsible for the synthesis and degradation of esters did not change versus the P29 strain, giving the possibility of establishing a greater number of significant correlations between esters and proteins in a flor yeast.

With regard to the compounds produced by the flor yeast that are of great organoleptic interest for sparkling wines, in addition to exhibiting fermentation characteristics similar to those obtained by conventional yeast, it can be concluded that this is a yeast strain suitable for the production of this special type of wine, thus increasing yeast strain biodiversity and possibly reducing production costs since this wine strain facilitates the clarification and subsequent removal of the wine, thanks to its capacity of cell–cell adhesion. These results suppose a first approximation in the search of metabolome–proteome relations of the yeast during the elaboration of the sparkling wine (cava). However, further research that considers the study of other metabolic compounds and pathways, as well as a transcriptomic and genetic approach and enzymatic activities, would be necessary in order to achieve more solid conclusions.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/3/403/s1>.

**Author Contributions:** M.d.C.G.-J.: 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.J.M.: Supervision, Validation, Visualization. A.P.-P.: Methodology. F.C.: Methodology. T.G.-M.: Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing-review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was 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 Cordoba (Spain), and by 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, as well as the help of Francisco José Martín García for the language revision of this paper.

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

## References

- Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Moreno-Arribas, M. Microbial Contribution to Wine Aroma and its Intended use for Wine Quality Improvement. *Molecules* **2017**, *22*, 189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- Rapp, A.; Mandery, H. Wine Aroma. *Experientia* **1986**, *42*, 873–884. [[CrossRef](#)]
- Suomalainen, H. Yeast and its Effect on the Flavour of Alcoholic Beverages. *J. Inst. Brew.* **1971**, *77*, 164–177. [[CrossRef](#)]
- Soufleros, E.H.; Bertrand, A. Rôle de la Souche de Levure Dans la Production des Substances Volatiles au Cours de la Fermentation du jus de Raisin. *OENO One* **1979**, *13*, 181–198. [[CrossRef](#)]
- Lee, S.J.; Rathbone, D.; Asimont, S.; Adden, R.; Ebeler, S.E. Dynamic Changes in Ester Formation During Chardonnay Juice Fermentations with Different Yeast Inoculation and Initial Brix Conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *55*, 346–354.
- Mateo, J.J.; Jimenez, M.; Huerta, T.; Pastor, A. Comparison of Volatiles Produced by Four *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Isolated from Monastrell Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 206–209.
- Plata, M.C.; Mauricio, J.C.; Millán, C.; Ortega, J.M. In Vitro Specific Activity of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in Two Flor Yeast Strains during Biological Aging of Sherry Wines. *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *85*, 369–374. [[CrossRef](#)]
- Plata, M.C.; Millán, C.; Mauricio, J.C.; Ortega, J.M. Formation of Ethyl Acetate and Isoamyl Acetate by Various Species of Wine Yeasts. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 217–224. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	120/186



10. Stribny, J.; Gamero, A.; Pérez-Torrado, R.; Querol, A. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* Differ from *Saccharomyces Cerevisiae* during the Production of Aroma-Active Higher Alcohols and Acetate Esters Using Their Amino Acidic Precursors. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 41–46. [[CrossRef](#)]
11. Walker, G.; Stewart, G. *Saccharomyces Cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2016**, *2*, 30. [[CrossRef](#)]
12. Di Gianvito, P.; Perpetuini, G.; Tittarelli, F.; Schirone, M.; Arfelli, G.; Piva, A.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Olivastri, L.; Suzzi, G.; et al. Impact of *Saccharomyces Cerevisiae* Strains on Traditional Sparkling Wines Production. *Food Res. Int.* **2018**, *109*, 552–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Piendl, A.; Geiger, E. Technological Factors in the Formation of Esters during Fermentation (Brewing technology). *Brew. Dig.* **1980**, *55*, 26–55.
14. Rollero, S.; Bloem, A.; Camarasa, C.; Sanchez, I.; Ortiz-Julien, A.; Sablayrolles, J.M.; Dequin, S.; Mouret, J.R. Combined Effects of Nutrients and Temperature on the Production of Fermentative Aromas by *Saccharomyces Cerevisiae* during Wine Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2291–2304. [[CrossRef](#)]
15. Edwards, C.G.; Beelman, R.B.; Bartley, C.E.; McConnell, A.L. Production of Decanoic Acid and other Volatile Compounds and the Growth of Yeast and Malolactic Bacteria during Vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 48–56.
16. Gómez, E.; Laencina, J.; Martínez, A. Vinification Effects on Changes in Volatile Compounds of Wine. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 406–409. [[CrossRef](#)]
17. Kemp, B.; Alexandre, H.; Robillard, B.; Marchal, R. Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 19–38. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, S.; Petersen, M.; Liu, J.; Toldam-Andersen, T. Influence of Pre-Fermentation Treatments on Wine Volatile and Sensory Profile of the New Disease Tolerant Cultivar Solaris. *Molecules* **2015**, *20*, 9791. [[CrossRef](#)]
19. Culbert, J.A.; McRae, J.M.; Condé, B.C.; Schmidtke, L.M.; Nicholson, E.L.; Smith, P.A.; Howell, K.S.; Boss, P.K.; Wilkinson, K.L. Influence of Production Method on the Chemical Composition, Foaming Properties, and Quality of Australian Carbonated and Sparkling White Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1378–1386. [[CrossRef](#)]
20. Marais, J. The effect of pH on Esters and Quality of Colombar Wine during Maturation. *VITIS-J. Grapevine Res.* **2016**, *17*, 396.
21. Daudt, C.E.; Ough, C.S. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, SO<sub>2</sub>, yeast strain, and grape variety. *Am. J. Enol. Vitic.* **1973**, *24*, 130–135.
22. Herraiz, T.; Ough, C.S. Formation of Ethyl esters of Amino Acids by Yeasts during the Alcoholic Fermentation of Grape Juice. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 41–48.
23. Martínez-Lapuente, L.; Apolinar-Valiente, R.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Pérez-Magariño, S.; Williams, P.; Doco, T. Polysaccharides, Oligosaccharides and Nitrogenous Compounds Change during the Ageing of Tempranillo and Verdejo Sparkling Wines. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 291–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Plata, M.C.; Mauricio, J.C.; Millán, C.; Ortega, J.M. Influence of Glucose and Oxygen on the Production of Ethyl Acetate and Isoamyl Acetate by a *Saccharomyces Cerevisiae* Strain during Alcoholic Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 115–121. [[CrossRef](#)]
25. Laurent, M.H.; Henick-Kling, T.; Acree, T.E. Changes in the Aroma and Odor of Chardonnay Wine Due to Malolactic Fermentation. *Wein Wiss.* **1994**, *49*, 3–10.
26. Izquierdo-Cañas, P.M.; Mena-Morales, A.; García-Romero, E. Malolactic Fermentation before or during Wine Aging in Barrels. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *66*, 468–474. [[CrossRef](#)]
27. Nykänen, L.; Suomalainen, H. Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *Springer Sci. Bus. Media* **1983**, *3*, 3–16.
28. Ubeda, C.; Kania-Zelada, I.; del Barrio-Galán, R.; Medel-Marabolí, M.; Gil, M.; Peña-Neira, Á. Study of the Changes in Volatile Compounds, Aroma and Sensory Attributes during the Production Process of Sparkling Wine by Traditional Method. *Food Res. Int.* **2019**, *119*, 554–563. [[CrossRef](#)]
29. Verstrepen, K.J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J.P.; Winderickx, J.; Thevelein, J.M.; Pretorius, I.S.; Delvaux, F.R. Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 110–118. [[CrossRef](#)]
30. Sumbly, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Microbial Modulation of Aromatic Esters in Wine: Current Knowledge and Future Prospects. *Food Chem.* **2010**, *121*, 1–16. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	121/186



31. Mauricio, J.C.; Moreno, J.J.; Valero, E.M.; Zea, L.; Medina, M.; Ortega, J.M. Ester Formation and Specific Activities of in Vitro Alcohol Acetyl Transferase and Esterase by *Saccharomyces Cerevisiae* during Grape Must Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2086–2091. [[CrossRef](#)]
32. 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](#)]
33. Martínez-García, R.; Roldán-Romero, 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**, *308*, 125555. [[CrossRef](#)]
34. 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**, *285*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ivit, N.N.; Kemp, B. The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. *Fermentation* **2018**, *4*, 73. [[CrossRef](#)]
36. Vigentini, I.; Cardenas, S.B.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C.A.; Picozzi, C.; Foschino, R. Use of Native Yeast Strains for in-Bottle Fermentation to Face the Uniformity in Sparkling Wine Production. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Peinado, R.A.; Moreno, J.A.; Muñoz, D.; Medina, M.; Moreno, J. Gas Chromatographic Quantification of Major Volatile Compounds and Polyols in Wine by Direct Injection. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6389–6393. [[CrossRef](#)]
38. Tredoux, A.; Villiers, A.; Májek, P.; Lynen, F.; Crouch, A.; Sandra, P. Stir Bar Sorptive Extraction Combined with GC–MS Analysis and Chemometric Methods for the Classification of South African Wines According to the Volatile Composition. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4286–4296. [[CrossRef](#)]
39. Vararu, F.; Moreno-García, J.; Zamfir, C.I.; Cotea, V.V.; Moreno, J. Selection of Aroma Compounds for the Differentiation of Wines Obtained by Fermenting Musts with Starter Cultures of Commercial Yeast Strains. *Food Chem.* **2016**, *197*, 373–381. [[CrossRef](#)]
40. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
41. 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](#)]
42. 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](#)] [[PubMed](#)]
43. Seisonen, S.; Vene, K.; Koppel, K. The Current Practice in the Application of Chemometrics for Correlation of Sensory and Gas Chromatography Data. *Food Chem.* **2016**, *210*, 530–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mason, A.B.; Dufour, J.P. Alcohol Acetyltransferases and the Significance of Ester Synthesis in Yeast. *Yeast* **2000**, *16*, 1287–1298. [[CrossRef](#)]
45. Lilly, M.; Bauer, F.F.; Lambrechts, M.G.; Swiegers, J.H.; Cozzolino, D.; Pretorius, I.S. The Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase and Esterase Activity on the Flavour Profiles of Wine and Distillates. *Yeast* **2006**, *23*, 641–659. [[CrossRef](#)]
46. Saerens, S.M.G.; Verstrepen, K.J.; Van Laere, S.D.M.; Voet, A.R.D.; Van Dijck, P.; Delvaux, F.R.; Thevelein, J.M. The *Saccharomyces Cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* Genes Encode Novel Enzymes with Medium-Chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4446–4456. [[CrossRef](#)]
47. Saerens, S.; Thevelein, J.; Delvaux, F. Ethyl Ester Production during Brewery Fermentation, A Review. *Cerevisia* **2008**, *33*, 82–90.
48. Procopio, S.; Qian, F.; Becker, T. Function and Regulation of Yeast Genes Involved in Higher Alcohol and Ester Metabolism during Beverage Fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *233*, 721. [[CrossRef](#)]
49. Pires, E.J.; Teixeira, J.A.; Brányik, T.; Vicente, A.A. Yeast: The Soul of Beer’s Aroma-A Review of Flavour-Active Esters and Higher Alcohols Produced by the Brewing Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1937–1949. [[CrossRef](#)]
50. Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fusté, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Development of Volatile Compounds of Cava (Spanish Sparkling Wine) during Long Ageing Time in Contact with Lees. *Food Chem.* **2006**, *95*, 237–242. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	122/186



51. Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. Yeast and its Importance to Wine Aroma-A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 97–129. [[CrossRef](#)]
52. Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile Compounds by SPME-GC as Age Markers of Sparkling Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 158–162.
53. Ruiz-Moreno, M.J.; Muñoz-Redondo, J.M.; Cuevas, F.J.; Marrufo-Curtido, A.; León, J.M.; Ramírez, P.; Moreno-Rojas, J.M. The Influence of Pre-Fermentative Maceration and Ageing Factors on Ester Profile and Marker Determination of Pedro Ximenez Sparkling Wines. *Food Chem.* **2017**, *230*, 697–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Torrens, J.; Urpí, P.; Riu-Aumatell, M.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Different Commercial yeast Strains Affecting the Volatile and Sensory Profile of Cava Base Wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *124*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. López de Lerma, N.; Peinado, R.A.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. Influence of Two Yeast Strains in Free, Bioimmobilized or Immobilized with Alginate Forms on the Aromatic Profile of Long Aged Sparkling Wines. *Food Chem.* **2018**, *250*, 22–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ancín-Azpilicueta, C.; González-Marco, A.; Jiménez-Moreno, N. Evolution of Esters in Aged Chardonnay Wines Obtained with Different Vinification Methods. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 2446–2451. [[CrossRef](#)]



© 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	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	123/186



### **4.3 Capítulo III. Comparativa de los procesos biológicos más importantes afectados por la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación.**

En este último capítulo se presentan y comparan los resultados obtenidos de un primer estudio del conjunto de procesos biológicos, de acuerdo con los términos de Ontología Genética (términos GO) y su relación con las proteínas expresadas por *S. cerevisiae* P29, durante la segunda fermentación de vinos espumosos en condiciones de sobrepresión endógena de CO<sub>2</sub> (condición habitual, en botella cerrada) y sin dicha presión (condición control, en botella abierta), mediante un análisis proteómico con el fraccionador OFFGEL e identificación de proteínas con LTQ Orbitrap XL acoplados a HPLC. Para la clasificación de los procesos biológicos se ha usado las herramientas proporcionadas por la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* Genome Database). Como resultado, se ha observado un menor número de procesos biológicos en la condición típica de segunda fermentación (botella cerrada) frente a la condición sin sobrepresión de CO<sub>2</sub> (botella abierta) y al final de la segunda fermentación con respecto a la mitad del proceso.

Los procesos biológicos más destacados bajo la condición sin sobrepresión de CO<sub>2</sub> a mitad de fermentación estuvieron involucrados con la división y crecimiento celular, junto con procesos biosintéticos y catabólicos, sobre todo con el metabolismo de carbohidratos y lípidos, presumiblemente para el mantenimiento de la viabilidad. Sin embargo, no se detectaron procesos específicos en la condición bajo sobrepresión y los procesos más destacados fueron la expresión de proteínas específicas en respuesta al estrés, transporte, traducción y organización cromosómica.

Al final de la fermentación, otra vez se observaron un mayor número de procesos específicos en la condición sin presión de CO<sub>2</sub>; la mayoría estaban relacionados con la división celular, el crecimiento, procesos biosintéticos y transcripción génica, que resultó en una mayor viabilidad celular en esta condición. Bajo la condición de sobrepresión de CO<sub>2</sub>, solamente se obtuvieron dos procesos específicos (proceso metabólico de ARNt y organización cromosómica). Así, los procesos más representativos estaban relacionados con la traducción, procesamiento de ARNm, biogénesis ribosómica y ensamblaje complejo de ribonucleoproteínas, probablemente en respuesta al estrés causado por las

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	124/186




duras condiciones de fermentación. La sobrepresión de CO<sub>2</sub> afectó en gran medida a la viabilidad celular.

Estos resultados han sido publicados en la revista científica *Microorganisms* bajo el título de “Biological processes highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the sparkling wines elaboration”.

*Microorganisms*, 8, 1216. doi:10.3390/microorganisms8081216.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	125/186



Article

# Biological Processes Highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the Sparkling Wines Elaboration

 María del Carmen González-Jiménez <sup>1</sup>, Teresa García-Martínez <sup>1,\*</sup> , Anna Puig-Pujol <sup>2</sup>,  
Fina Capdevila <sup>2</sup>, Jaime Moreno-García <sup>1</sup> , Juan Moreno <sup>3</sup>  and Juan Carlos Mauricio <sup>1</sup> 
<sup>1</sup> Department of Microbiology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; b02gojim@uco.es (M.d.C.G.-J.); b62mogaj@uco.es (J.M.-G.); mi1gamaj@uco.es (J.C.M.)

<sup>2</sup> Department of Enological Research, Institute of Agrifood Research and Technology—Catalan Institute of Vine and Wine (IRTA-INCAVI), Vilafranca del Penedès, 08720 Barcelona, Spain; anna.puig@irta.cat (A.P.-P.); fcapdevila@gencat.cat (F.C.)

<sup>3</sup> Department of Agricultural Chemistry, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain; qe1movij@uco.es

\* Correspondence: mi2gamam@uco.es; Tel.: +34-957-21-86-40

Received: 13 July 2020; Accepted: 9 August 2020; Published: 11 August 2020



**Abstract:** Sparkling wines elaboration has been studied by several research groups, but this is the first report on analysis of biological processes according to the Gene Ontology terms (GO terms) and related to proteins expressed by yeast cells during the second fermentation of sparkling wines. This work provides a comprehensive study of the most relevant biological processes in *Saccharomyces cerevisiae* P29, a sparkling wine strain, during the second fermentation under two conditions (without and with endogenous CO<sub>2</sub> overpressure) in the middle and the end of second fermentation. Consequently, a proteomic analysis with the OFFGEL fractionator and protein identification with LTQ Orbitrap XL coupled to HPLC were performed. The classification of biological processes was carried out using the tools provided by the *Saccharomyces* Genome Database. Results indicate that a greater number of biological processes were identified under condition without CO<sub>2</sub> overpressure and in the middle of the fermentation versus the end of the second fermentation. The biological processes highlighted under condition without CO<sub>2</sub> overpressure in the middle of the fermentation were involved in the carbohydrate and lipid metabolic processes and catabolic and biosynthetic processes. However, under CO<sub>2</sub> overpressure, specific protein expression in response to stress, transport, translation, and chromosome organization and specific processes were not found. At the end of fermentation, there were higher specific processes under condition without CO<sub>2</sub> overpressure; most were related to cell division, growth, biosynthetic process, and gene transcription resulting in increased cell viability in this condition. Under CO<sub>2</sub> overpressure condition, the most representative processes were related to translation as tRNA metabolic process, chromosome organization, mRNA processing, ribosome biogenesis, and ribonucleoprotein complex assembly, probably in response to the stress caused by the hard fermentation conditions. Therefore, a broader knowledge of the adaptation of the yeast, and its behavior under typical conditions to produce sparkling wine, might improve and favor the wine industry and the selection of yeast for obtaining a high-quality wine.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; sparkling wine; fermentation; GO terms; protein

## 1. Introduction

The production of sparkling wine by the traditional, or *Champenoise*, method consists of two consecutive fermentations and a long period of aging of the wine in contact with the yeast lees. A first fermentation occurs, where the base wine is obtained from grape must, and a second fermentation of the base wine mixed with sugar and specific yeast strains of *Saccharomyces* occurs in a sealed bottle.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	126/186



After the second fermentation, the wine is subjected to a long aging period in contact with the yeast lees for at least 9 months (Spanish sparkling wine, Cava) at low temperatures (12–16 °C). During this last stage, the organoleptic properties of wine are influenced by the release of certain secondary metabolites, such as glycerol, acetate, succinate, pyruvate, and esters [1–4]. Numerous studies attempt to relate the change in the concentration of aromatic compounds produced during aging and their effect on the final aroma of sparkling wines [5–9]. A recent study, conducted by our research group, focused on the study of the effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure during the second fermentation in the production of sparkling wines. Regarding volatility and its relationship with the organoleptic properties of the final wine, CO<sub>2</sub> overpressure affected the concentration of certain aromatic compounds, such as ethyl dodecanoate, ethyl tetradecanoate, hexyl acetate, ethyl butanoate, and ethyl isobutanoate [10]. Once yeast cells die during aging, intracellular compounds are released to the wine as mannoproteins during the autolysis process, thus improving the quality, and favoring the organoleptic properties of these special wines [11,12]. During these stages, the yeast is subjected to various stresses, so ensuring its survival and tolerance to these conditions is essential to guarantee the success of the sparkling winemaking process [13]. On the other hand, during yeast selection, early cell death and autolysis are wanted to accelerate the process of elaboration of sparkling wines. During the second fermentation, yeasts are subjected to various stress factors, such as high ethanol content, nitrogen deficiency, low pH values, low temperature, and CO<sub>2</sub> overpressure [14]. Penacho et al. [14] showed that genes related to aerobic respiration, and vacuolar and peroxisomal functions are the main pathways affected by the pressure conditions, pointing to ethanol as the main factor responsible for these changes during second fermentation [14]. Furthermore, previous research reported that CO<sub>2</sub> overpressure seems to affect the yeast stress-related proteome during the second fermentation. In fact, according to these authors, proteins involved in osmotic stress, such as glycerol biosynthesis and others required for energy storage mechanisms during nutrient starvation, stand out under second fermentation conditions [15].

Since there are few researches focused on analysis of biological processes according to the Gene Ontology (GO) terms under fermentation conditions, the present work aims to study the effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure, released by *Saccharomyces cerevisiae* P29 strain, on the proteins related to the GO terms of sparkling wines elaborated according to the *Champenoise* method. This work conducts a global study about the most relevant biological processes in *S. cerevisiae* P29, a sparkling wine strain, under two conditions: a control condition without pressure, or P (–), and a pressure condition, or P (+), at the middle (MF) and the end (EF) of fermentation. We designed a proteomic analysis based on an OFFGEL fractionation, and later protein identification (LTQ Orbitrap XL mass spectrometer coupled to HPLC) and selection using the Gene Ontology tools from the *Saccharomyces* Genome Database (SGD). Finally, the GO Term Mapping tool was used to determine the most significant biological processes and pathways found under both conditions of this study. Broader knowledge about the adaptation of the yeast and its behavior under the typical conditions of the second fermentation would improve the industrial process, and favor the selection and genetic improvement of wine yeast strains capable of carrying out this process, giving rise to a wine of quality.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganism, Cultivation Conditions, and Sampling

For this work, the P29 strain (CECT 11770) of *Saccharomyces cerevisiae* was used. This is a typical sparkling wine strain for secondary fermentation in a closed bottle in the Cava production. It was isolated from the designation of origin (DO) of the Penedès, Barcelona (Spain) [16].

Yeast strain was incubated for 5 days at 21 °C, using gentle agitation of 100 rpm for growth in a pasteurized must of the Macabeo grape variety (174.9 g/L of sugar, 18.5° Brix, 3.6 g/L of total acidity, and 3.43 pH). When an ethanol content of 10.39% (*v/v*) was reached, yeast cells were introduced into the bottles together with the commercial base wine composed of Macabeo:Chardonnay (6:4), an ethanol

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	127/186





content of 10.21% (*v/v*), 22 g/L sucrose, and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL. The second fermentation was carried out in a thermostat chamber at 14 °C in bottles with a volume of 750 mL.

The bottles were divided into two groups for the study of CO<sub>2</sub> overpressure. Half of the bottles were closed with a perforated shutter, without pressure condition (P (-)). The rest of the bottles were hermetically sealed with a shutter and with a metal crown capsule, this causes the CO<sub>2</sub> released during the second fermentation to be trapped inside the bottle, with pressure condition (P (+)). During the second fermentation in the sparkling wine process, two sample times were taken: (a) at the middle of the second fermentation (MF) (pressure of 3 bar); and (b) at the end of the second fermentation (EF) (pressure of 6.5 bar) under CO<sub>2</sub> overpressure condition. At the same time, when a similar consumed sugar and produced ethanol content was obtained under both conditions (sugar consumption (MF:  $9.07 \pm 0.26$  g/L and EF:  $0.3 \pm 0.0$  g/L) and ethanol content (MF:  $10.7 \pm 0.03\%$  *v/v* and EF:  $11.56 \pm 0.04\%$  *v/v*), samples were taken from the condition without CO<sub>2</sub> pressure.

The wine compositions at the different sampling times were: (a) under MFP (-):  $10.64 \pm 0.02\%$  *v/v* ethanol,  $9.9 \pm 0.5$  g/L reducing sugars,  $0.2 \pm 0.0$  g/L volatile acidity,  $5.2 \pm 0.1$  g/L total acidity,  $3.28 \pm 0.03$  pH,  $1.87 \pm 0.06$  g/L malic acid,  $0.1 \pm 0.0$  g/L lactic acid; (b) under EFP(-):  $11.52 \pm 0.03\%$  *v/v* ethanol,  $0.3 \pm 0.0$  g/L reducing sugars,  $0.24 \pm 0.03$  g/L volatile acidity,  $5.1 \pm 0.02$  g/L total acidity,  $3.28 \pm 0.01$  pH,  $1.90 \pm 0.06$  g/L malic acid,  $0.1 \pm 0.0$  g/L lactic acid; (c) under MFP(+):  $10.85 \pm 0.04\%$  *v/v* ethanol,  $8.23 \pm 0.06$  g/L reducing sugars,  $0.2 \pm 0.0$  g/L volatile acidity,  $5.2 \pm 0.0$  g/L total acidity,  $3.28 \pm 0.01$  pH,  $1.87 \pm 0.06$  g/L malic acid,  $0.1 \pm 0.0$  g/L lactic acid; (d) under EFP(+):  $11.56 \pm 0.04\%$  *v/v* ethanol,  $0.3 \pm 0.0$  g/L reducing sugars,  $0.23 \pm 0.02$  g/L volatile acidity,  $5.25 \pm 0.02$  g/L total acidity,  $3.3 \pm 0.02$  pH,  $1.89 \pm 0.06$  g/L malic acid,  $0.1 \pm 0.0$  g/L lactic acid.

## 2.2. Viability

The cellular viability counting was carried out using appropriate dilutions with Ringer's solution. Then, these were plated in Sabouraud agar medium for 48 h at 28 °C. All samples were carried out in triplicate. Data are recorded as means ( $\pm$  standard deviation) CFU (colony-forming units)/mL.

## 2.3. Proteomic Analysis

The cells were collected from all bottles by centrifugation at  $4500 \times g$  for 10 min by a centrifuge (Rotina-38, Kirchlengern, Germany), washed the sediment twice with sterile distilled cold water and broken through a mechanical technique in Vibrogen, using the Cell Mill V6 (Edmund Bühler, Bodelshausen, Germany) with 500  $\mu$ m diameter glass balls. Once the cells were broken, protein extraction was performed. For this purpose, a protease inhibitor cocktail and an extraction buffer composed of 100 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM dithiothreitol (DTT), and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were used. A total of 500  $\mu$ g of protein was loaded into the well tray of the protein fractionator. This concentration was calculated by a Bradford test [17]. Then, the proteins were separated according to their isoelectric point, using the OFFGEL 3100 fractionator from Agilent Technologies (Alto Palo, CA, USA). For this, the protein samples were solubilized in a Protein OFFGEL fractionation buffer containing urea, thiourea, DTT, glycerol, and buffer with ampholytes. For identification, protein samples were analyzed on an LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) mass spectrometer equipped with a nano LC Ultimate 3000 system (Dionex, Germering, Germany), accompanied by the Proteome Discoverer 1.0 database (United States) at the University's Central Research Support Service (SCAI) from Córdoba, Spain. Conditions are described in more detail in articles published by the research group [18].

## 2.4. Biological Processes Analysis

To carry out a more reliable selection of the total proteins, the following selection criteria were taken into account, according to Dasari et al. [19]: (i) score greater than 2; (ii) number of peptides observed greater than or equal to 2. The resulting proteins were classified into biological processes,

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	128/186

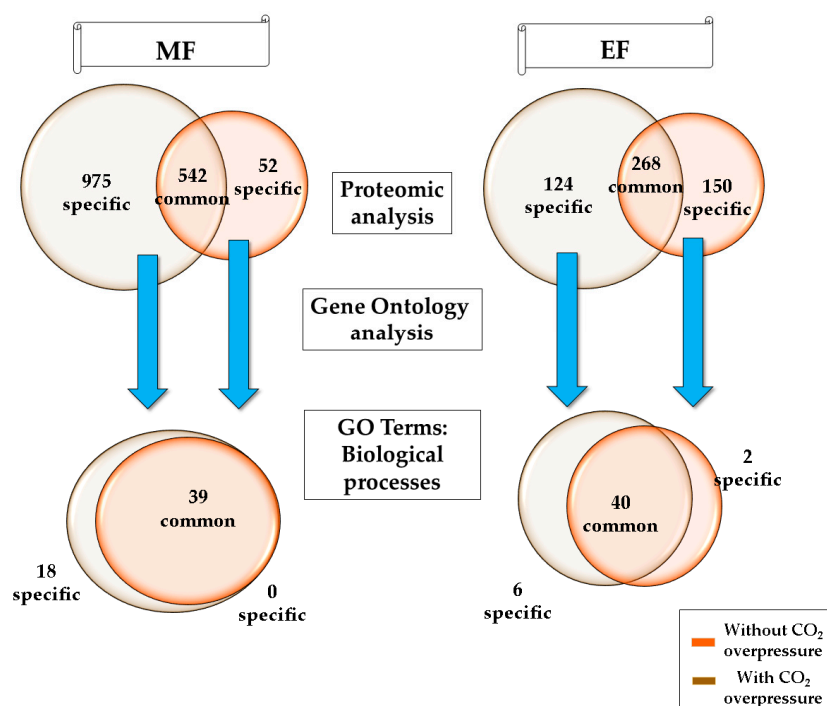


according to the GO terminology of the *Saccharomyces* Genome Database (SGD), using the GO Slim Mapper tool.

The proteins involved in each biological process were classified in different GO Terms provided by the SGD database (<https://www.yeastgenome.org/>). This classification was made using the GO Term Finder tool, provided by the database. The GO Terms are descriptive terms that allow the relating of each gene product with a molecular, cellular, and biological process context, providing a statistical value (*p*-value). This statistical study was performed with a level of significance ( $\alpha$ ) of 0.01.

### 3. Results and Discussion

The present study was performed on cultures of *S. cerevisiae* P29 strain under two experimental conditions: without and with CO<sub>2</sub> overpressure at the middle and the end of fermentation under real second fermentation conditions (Figure 1).



**Figure 1.** Venn diagram of proteins and Gene Ontology (GO) terms related to the biological processes under two experimental conditions: without and with CO<sub>2</sub> overpressure at the middle (MFP (–) and MFP (+), respectively) and the end of fermentation under real second fermentation conditions (EFP (–) and EFP (+), respectively).

A total of 1517 proteins were detected under the MFP (–) and 594 under MFP (+); 542 of them were common under both conditions (viz., 975 proteins specifically detected in MFP (–) and 52 under MFP (+)). On the other hand, 392 proteins were identified under EFP (–) and 419 under EFP (+), with 268 proteins being common between both conditions (viz., 124 proteins were specific in EFP (–) and 150 under EFP (+)) (Supplementary Materials Table S1).

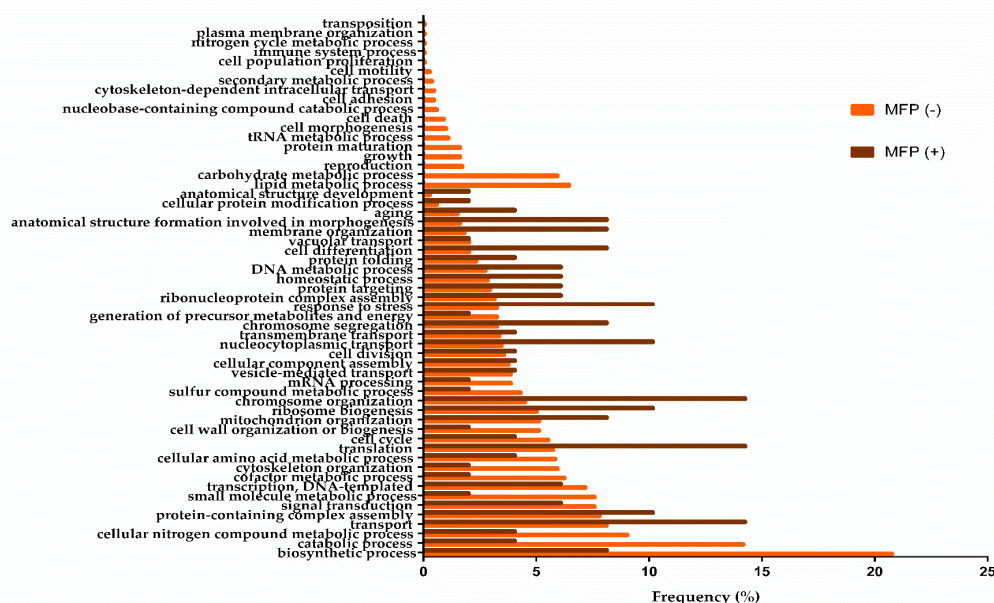
The biological processes obtained in each type of condition and sampling times were elucidated from the GO term of biological processes and pathways. Gene Ontology is a tool that describes how and where gene products work in biological systems. It is structured in three interrelated parts that



describe what genetic products do at the biochemical level and at the cellular level, and the general biological objectives to which their actions contribute [20].

### 3.1. Biological Processes during the Middle of the Second Fermentation

A total of 57 biological processes were obtained in the middle of the second fermentation (Figure 2). While 18 of them were specific processes under the condition without overpressure, there were no specific processes detected under CO<sub>2</sub> overpressure condition. This difference could be because, in high-stress situations, the yeast cells only carry on those biological processes that are fundamental to viability and cell maintenance. These results agree with those from Matallana et al. [21], which also indicates that the tolerance to environmental stress conditions is a key factor to achieve the biotechnological success of *Saccharomyces* yeasts.



**Figure 2.** Relevant biological processes in middle of second fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure (MFP (–) in orange), and with overpressure (MFP (+) in brown). The frequency (%) of each process corresponds to the number of proteins involved in each process with respect to the total proteins identified.

On the other hand, there were 18 specific processes under MFP (–); those processes that showed a higher protein frequency were related to metabolism, and more specifically to the metabolism of lipids and carbohydrates (6.49% and 5.97%, respectively). Both processes were related to a series of GO Terms (data shown in Supplementary Materials Table S2) among which the biosynthesis of lipids such as sterols, glycerolipids, or phospholipids stood out. The yeast plasmatic membrane can play an important role in the transport and tolerance of toxic compounds such as ethanol, acetic acid, acetaldehyde, and medium-chain fatty acids, and therefore small changes in the plasma membrane could trigger a modification of the yeast metabolism [22,23]. Furthermore, sterols are involved in membrane dynamics, controlling lateral movements and the activity of membrane proteins [24]; while glycerolipids play an important role in cell signaling, membrane trafficking, and anchoring of membrane proteins [25]. The composition of fatty acids in the plasma membrane of yeasts depends on the lipid composition of the environment, the availability of oxygen, and the fermentation conditions. When fermentation takes place under anaerobic conditions, the yeast can synthesize more saturated fatty acids and less ergosterol and squalene [24]. However, when fermentation carries on under aerobic conditions,



fewer medium-chain fatty acids and more unsaturated fatty acids are produced [26]. This causes a change in the composition of its lipid fractions by reducing the surface area of the membranes and decreasing the viability of the cells during fermentation. These differences in lipid composition between the two conditions are due to the fact that the biosynthetic pathways of these essential lipids are strictly aerobic [27] and are related to mitochondrial activity [28]. However, for validation of obtained results, oxygen consumption measurements by yeast cells should be made throughout the second fermentation in bottle, and analysis of the lipid composition of the plasma membranes under both conditions must be performed. On the other hand, the main GO Terms related to “carbohydrate metabolism” were metabolism of glucans and glycogen (data shown in Supplementary Materials Table S2). These polysaccharides, more specifically  $\beta$ -glucans, provide rigidity to the cell wall. The synthesis of these polysaccharides is involved in the yeast budding process. In addition, the metabolism of glycogen, a reserve polysaccharide, is also involved in increasing the viability of yeast cells in wine fermentations [29,30]. Both processes (lipid and carbohydrate metabolism) are related to the production of energy through glycolysis, the pentose phosphate pathway, and the TCA cycle. This energy is used by the yeast for cell growth, morphogenesis, and biosynthesis of compounds such as amino acids or proteins. The rest of the specific biological processes identified under MFP (–) presented a protein frequency between 2 and 0.1% (Figure 2). These results were in contrast with the cell viability analysis: under without overpressure  $5.53 \times 10^6 (\pm 2.1 \times 10^6)$  CFU/mL, (10.64  $\pm$  0.02% *v/v* ethanol) and under CO<sub>2</sub> overpressure  $8.02 \times 10^6 (\pm 1.4 \times 10^6)$  CFU/mL (3 bar, semi-sparkling wine, 10.85  $\pm$  0.04% *v/v* ethanol), no significant differences were observed [31]. This suggests that the fundamental processes of cell growth and those related to the central metabolism of yeast would be taking place under both conditions, and in this case, the CO<sub>2</sub> overpressure would not affect cell viability, despite being subjected to stress.

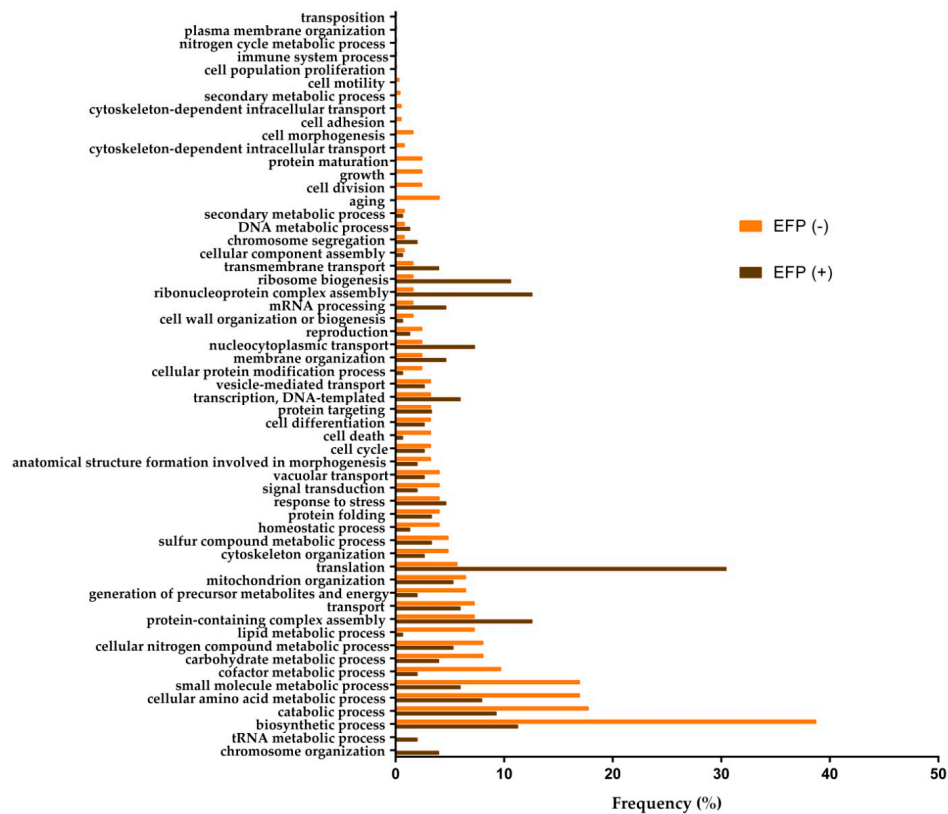
With the aim of contrasting this hypothesis, the common biological processes at the middle of the second fermentation were identified (39 processes), and the most representative common biological processes under MFP (–) versus MFP (+) were eight processes (biosynthetic process, catabolic process, cell wall organization or biogenesis, cellular nitrogen compound metabolic process, cofactor metabolic process, cytoskeleton organization, small molecule metabolic process, and sulfur compound metabolic process). In view of these results, the yeast could have a more active metabolism under conditions without CO<sub>2</sub> overpressure versus CO<sub>2</sub> overpressure, since the highlighted processes are related to synthesis and degradation, presumably of lipids and carbohydrates (specific processes identified), and to obtaining energy (cofactor metabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, or small molecule metabolic process). Unlike yeasts under CO<sub>2</sub> overpressure condition, they dedicate most of their energy to their survival. Processes that were differentially up-regulated (relative frequency above twofold) under MFP (+) versus MFP (–) samples were as follows: chromosome organization, translation, nucleocytoplasmic transport, response to stress, ribosome biogenesis, anatomical structure formation involved in morphogenesis, cell differentiation, chromosome segregation, membrane organization, DNA metabolic process, homeostatic process, protein targeting, aging, anatomical structure development, and cellular protein modification process. These processes are related to cell division (chromosome organization: 14.29%; chromosome segregation: 8.16%; DNA metabolic process: 6.12%), morphogenesis (anatomical structure formation involved in morphogenesis: 8.16%; anatomical structure development: 2.04%; membrane organization: 8.16%) and gene transcription (translation, 14.29%; nucleocytoplasmic transport, 10.2%; ribosome biogenesis, 10.2%; cellular protein modification process, 2.04%). In view of these processes under MFP (+), yeast metabolism under CO<sub>2</sub> overpressure conditions and its cell growth are not affected, since it counteracts not having specific processes for them by presenting a high frequency of proteins in the common processes mentioned above. However, the yeast could be stressed by CO<sub>2</sub> pressure, since a stress response under MFP (+) higher than MFP (–) has been detected.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	131/186



### 3.2. Biological Processes at the End of the Second Fermentation

A total of 46 processes were obtained under condition without CO<sub>2</sub> overpressure (EFP (-)), while under condition of CO<sub>2</sub> overpressure (EFP (+)) 42 biological processes were identified at the end of the second fermentation (Figure 3). Six of them were specific under condition EFP (-) and two in the EFP (+).



**Figure 3.** Relevant biological processes at the end of the second fermentation without CO<sub>2</sub> overpressure (EFP (-) in orange), and with overpressure (EFP (+) in brown). The frequency (%) of each process corresponds to the number of proteins involved in each process with respect to the total proteins identified.

Specific biological processes in EFP (-) were aging (4.03%), cell division (2.42%), cell morphogenesis (1.61%), cytoskeleton-dependent intracellular transport (0.81%), growth (2.42%), and protein maturation (2.42%). In both conditions, due to the scarcity of the carbon source (glucose), the yeast reorganizes its metabolism during the stationary phase [29,30]. The viability of yeast cells under EFP (-) condition was higher than under condition with CO<sub>2</sub> overpressure; this is in accordance with the identification of a greater number of biological processes related to cell growth and division (EFP (-):  $1.14 \times 10^6 (\pm 0.4 \times 10^6)$  CFU/mL ( $11.52 \pm 0.03\%$  v/v ethanol); EFP (+):  $3.33 \times 10^4 (\pm 1.2 \times 10^4)$  CFU/mL ( $11.56 \pm 0.04\%$  v/v ethanol). This fact may be explained since, as described above, in EFP (+), yeast autolysis may be taking place, which would help the survival of the rest of the population in this hard condition. On the other hand, the GO Terms related to the specific biological processes in EFP (-) were developmental process, intracellular copper ion transport, and oxidoreduction coenzyme metabolic process (Supplementary Materials Table S3). They presented *p*-values of 0.00365, 0.00488, and 0.00738, respectively. These GO Terms could be involved with the maintenance of the redox balance between NAD<sup>+</sup> and NADH in aerobic conditions by *S. cerevisiae*. Yeasts need to recycle NAD<sup>+</sup> and oxidize NADH for the continuation

of glycolysis; otherwise, the glycolytic flow would decrease, which could lead to a depletion of the ATP energy charge, becoming lethal for yeast [31,32]. According to Kutyna et al. [33], most of the NADH produced during glycolysis is subsequently oxidized during the formation of ethanol. NAD<sup>+</sup> regeneration can also occur through the formation of glycerol. Peeters et al. [34] reported that the combination of aberrant growth onset due to glycolytic dysregulation in cells can cause apoptosis in yeast.

Regarding common biological processes, under condition without CO<sub>2</sub> overpressure (EFP (-)) processes which stood out were biosynthetic process, cellular amino acid metabolic process, small molecule metabolic process, carbohydrate metabolic process, cofactor metabolic process, generation of precursor metabolites and energy, signal transduction, homeostatic process, cell death, cell wall organization or biogenesis, cellular protein modification process, and lipid metabolic process. In view of the results obtained, most of these common processes in EFP (-) are involved in maintaining the redox balance caused by oxidative stress. For this purpose, the yeast could be synthesizing amino acids, such as methionine or tryptophan. These amino acids are described in studies carried out by Peláez-Soto et al. [35] as cellular protectors against damage caused by the oxidative metabolism of yeast. In addition, the processes of carbohydrate metabolic, cofactor metabolic, generation of precursor metabolites and energy, signal translation, and lipid metabolic would be dedicated to the production of energy needed to induce the antioxidative machinery. At last, seven processes presented a frequency more than twofold under condition with CO<sub>2</sub> overpressure versus without CO<sub>2</sub> overpressure, and the majority of these processes are related to gene translation (translation, ribonucleoprotein complex assembly, ribosome biogenesis, nucleocytoplasmic transport, mRNA processing, and transmembrane transport). The most significant GO Terms obtained for these processes coincide with the biological processes previously mentioned. The biogenesis of ribosomes (*p*-value:  $1.35 \times 10^{-8}$ ) and protein translation (*p*-value:  $2.57 \times 10^{-6}$ ) stood out. Presumably, the yeast could be synthesizing stress response proteins, and is more likely to respond to stress due to CO<sub>2</sub> overpressure, since the conditions of ethanol and glucose did not show significant differences between conditions (see Materials and Methods section).

The specific biological processes under EFP (+) were tRNA metabolic process and chromosome organization, which presented a frequency of 1.99% and 3.97%, respectively. Four GO Terms have been related to these two specific biological processes (Supplementary Materials Table S3). These GO Terms were chromosome organization (*p*-value: 0.00441), DNA packaging (*p*-value: 0.00909), DNA-templated transcriptional start site selection (*p*-value: 0.00991), and transcriptional start site selection at RNA polymerase II promoter (*p*-value: 0.00991). These results suggest that yeast could be activating its transcription and translation machinery to try to cope with cell death and autolysis. Jing et al. [36] reported that the increase in the amount of ethanol in the medium induces the process of autophagy in the yeast during fermentation. Yeast autolysis involves the release of different products, resulting from the degradation of yeast macromolecules, into the wine. In *S. cerevisiae*, this process is triggered by starvation conditions, and is considered an adaptive response, allowing the survival of younger yeast cells, due to the recycling of the compounds released into the medium by dead yeasts [37].

#### 4. Conclusions

This work focuses on providing a first approach to an understanding of the biological processes that take place in yeasts during the second fermentation in the production of sparkling wines through a proteomic study. This knowledge arises from the need to select yeasts capable of carrying out the second fermentation, and of tolerating various stresses to which they are subjected. We believe that stress tolerance is a good criterion for selecting enologically interesting yeasts. Despite obtaining a greater number of biological processes in the middle of the second fermentation, no specific process of the condition with CO<sub>2</sub> overpressure was identified. However, at the end of the second fermentation, two specific processes took place under CO<sub>2</sub> overpressure, versus six specific processes under conditions without CO<sub>2</sub> overpressure. Most of the prominent processes were related to cell division, growth, and biosynthetic process, presumably for the maintenance of good cell viability observed without CO<sub>2</sub>

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	133/186



overpressure condition. At the end of fermentation, it was clear that the overpressure affects viability, since there were a smaller number of living cells in the second fermentation under this condition. However, under CO<sub>2</sub> overpressure condition, processes were related to tRNA metabolic process, chromosome organization, and translation.

These results represent a first approach that highlights the most relevant biological processes that take place during the second fermentation in bottle in the production of Spanish sparkling wine (Cava). Furthermore, they could be a starting point for future research to validate some of the possible mechanisms that take place during the second fermentation in bottle.

A better understanding of yeast metabolism, its adaptation, and its behavior under the typical conditions of the second fermentation is necessary for the strain selection process and improvement of its application in the wine industry, and can be interesting for quality control and improvement of the sparkling winemaking process.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1216/s1>, Table S1: Biological processes obtained in *S. cerevisiae* under conditions of second fermentation, Table S2: GO terms obtained in the middle of the second fermentation in *S. cerevisiae*, Table S3: GO terms obtained in the end of the second fermentation in *S. cerevisiae*.

**Author Contributions:** M.d.C.G.-J.: investigation, methodology, writing—original draft. T.G.-M.: formal analysis, investigation, methodology, supervision, writing—review and editing. A.P.-P.: investigation, methodology, funding acquisition. F.C.: investigation, methodology. J.M.-G.: data curation, formal analysis. J.M.: supervision, validation. J.C.M.: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, supervision, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was 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 the University of Córdoba (Spain), and by Spain’s Ministry of Science, Innovation and Universities, and the European Fund of Regional Development (FEDER): Grant No. RTA2014-00016-C03-03, A Puig-Pujol.

**Acknowledgments:** The kind help of the staff at the Central Research Support Service (SCAI) of the University of Córdoba with the protein analyses is gratefully acknowledged.

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

## References

- González-Ramos, D.; González, R. Genetic Determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9411–9416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Charpentier, C.; Feuillat, M. Yeast autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G., Ed.; Harwood Academic Publishers: London, UK, 1993; pp. 225–242.
- 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. [[CrossRef](#)]
- Troton, D.; Charpentier, M.; Robillard, B.; Calvayrac, R.; Duteurtre, B. Evolution of the lipid contents of Champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Viticult.* **1989**, *40*, 175–182.
- Pozo-Bayón, M.A.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V.; Andújar-Ortiz, I.; Pueyo, E. Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rosé Cava sparkling wines. *LWT-Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1526–1532. [[CrossRef](#)]
- Torrens, J.; Urpí, P.; Riu-Aumatell, M.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *124*, 48–57. [[CrossRef](#)]
- Pozo-Bayón, M.A.; Martínez-Rodríguez, A.; Pueyo, E.; Moreno-Arribas, M.V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends. Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 289–299. [[CrossRef](#)]
- 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.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	134/186



9. Morales, M.L.; Ochoa, M.; Valdivia, M.; Ubeda, C.; Romero-Sanchez, S.; Ibeas, J.L.; Valero, E. Volatile metabolites produced by different flor yeast strains during wine biological ageing. *Food Res. Int.* **2020**, *128*, 108771. [[CrossRef](#)]
10. 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](#)]
11. Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast autolysis in sparkling wine—A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127. [[CrossRef](#)]
12. 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](#)] [[PubMed](#)]
13. Martí-Raga, M.; Martín, V.; Gil, M.; Sancho, M.; Zamora, F.; Mas, A.; Beltran, G. Contribution of yeast and base wine supplementation to sparkling wine composition. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4962–4972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Penacho, V.; Valero, E.; González, R. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Porras-Agüera, J.A.; Román-Camacho, J.J.; Moreno-García, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; García-Martínez, T. Effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on the yeast “stressome” during the “prise de mousse” of sparkling wine. *Food Microbiol.* **2020**, *89*, 103431. [[CrossRef](#)]
16. Bartra, E.; Casado, M.; Carro, D.; Campama, C.; Piña, B. Differential expression of thiamine biosynthetic genes in yeast strains with high and low production of hydrogen sulfide during wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 272–281. [[CrossRef](#)]
17. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
18. 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](#)]
19. 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](#)]
20. Denny, P.; Feuermann, M.; Hill, D.P.; Lovering, R.C.; Plun-Favreau, H.; Roncaglia, P. Exploring autophagy with gene ontology. *Autophagy* **2018**, *14*, 419–436. [[CrossRef](#)]
21. Matallana, E.; Aranda, A. Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* **2017**, *64*, 103–110. [[CrossRef](#)]
22. Hazel, J.R.; Williams, E.E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* **1990**, *29*, 167–227. [[CrossRef](#)]
23. Valero, E.; Millan, M.C.; Mauricio, J.C.; Ortega, J.M. Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 119–124.
24. Tesnière, C. Importance and role of lipids in wine yeast fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 8293–8300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Francois, J.; Parrou, J.L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 125–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Suomalainen, H.; Lehtonen, M. The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* **1979**, *85*, 149–156. [[CrossRef](#)]
27. Kwast, K.E.; Burke, P.V.; Poyton, R.O. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*, 1177–1195.
28. Aguilera, A.; Benítez, T. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **1985**, *142*, 389–392. [[CrossRef](#)]
29. Winderickx, J.; Holsbeeks, I.; Lagatie, O.; Giots, F.; Thevelein, J.; Winde, H. From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. In *Yeast Stress Responses*; Hohmann, S., Mager, W.H., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2003; pp. 305–386.
30. De Virgilio, C. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 306–339. [[CrossRef](#)]
31. González-Jiménez, M.C.; Moreno-García, J.; García-Martínez, T.; Moreno, J.J.; Puig-Pujol, A.; Capdevilla, F.; Mauricio, J.C. Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration. *Microorganisms* **2020**, *8*, 403. [[CrossRef](#)]

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	135/186





32. Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W.; van Dijken, J. Energetics of *S. cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 405–412.
33. Kutyna, D.R.; Varela, C.; Henschke, P.A.; Chambers, P.J.; Stanley, G.A. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends. Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 293–302. [[CrossRef](#)]
34. Peeters, K.; Van Leemputte, F.; Fischer, B.; Bonini, B.M.; Quezada, H.; Tsytlonok, M.; Haesen, D.; Vanthienen, W.; Bernardes, N.; Bravo Gonzalez-Blas, C.; et al. Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Peláez-Soto, A.; Roig, P.; Martínez-Culebras, P.V.; Fernández-Espinar, M.T.; Gil, J.V. Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* response to oxidative stress mediated by cocoa polyphenols extract. *Molecules* **2020**, *25*, 452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jing, H.; Liu, H.; Zhang, L.; Gao, J.; Song, H.; Tan, X. Ethanol induces autophagy regulated by mitochondrial ROS in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 1982–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cebollero, E.; Gonzalez, R. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4121–4127. [[CrossRef](#)]




© 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	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	136/186



# INFORME FACTOR DE IMPACTO Y CUARTIL (JCR)

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	137/186



## 5. INFORME CON EL FACTOR DE IMPACTO Y CUARTIL DEL JOURNAL CITATION REPORTS (JCR)

Esta Tesis Doctoral se presenta por compendio de artículos y con mención internacional, por lo que en la Tabla 3 se muestra la información referida a los 3 artículos publicados en la revista científica de alto índice de impacto internacional “*Microorganisms*”, incluida en el segundo cuartil referenciada la última relación publicada, 2019, por el *Journal Citation Reports (JCR)* en la categoría *Microbiology* por orden de consecución de objetivos específicos propuestos.

**Tabla 3.** Informe de las publicaciones científicas como primer autor.

<i>Objetivo 1</i>	
<b>Título del artículo</b>	Comparative study of the proteins involved in the fermentation-derived compounds in two strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during sparkling wine second fermentation
<b>Autores</b>	<b>González-Jiménez, M.D.C.</b> , García-Martínez, T., Mauricio, J.C.*, Sánchez-León, I., Puig-Pujol, A., Moreno, J., Moreno-García, J.
<b>Revista científica</b>	Microorganisms (Section: Microbial Biotechnology)
<b>Año de publicación</b>	2020
<b>Índice de impacto (JCR)</b>	4.152
<b>Cuartil</b>	37/134 (Q2)
<b>Categoría</b>	Microbiology
<b>DOI</b>	10.3390/microorganisms8081209


Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	138/186



Tabla 3. Continuación I.

<b>Objetivo 2</b>	
<b>Título del artículo</b>	Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration
<b>Autores</b>	González-Jiménez, M.D.C., Moreno-García, J., García-Martínez, T.*, Moreno, J., Puig-Pujol, A., Capdevilla, F., Mauricio, J.C.
<b>Revista científica</b>	Microorganisms (Section: Food Microbiology)
<b>Año de publicación</b>	2020
<b>Índice de impacto (JCR)</b>	4.152
<b>Cuartil</b>	37/134 (Q2)
<b>Categoría</b>	Microbiology
<b>DOI</b>	10.3390/microorganisms8030403


Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	139/186



**Tabla 3. Continuación II.**


<b>Objetivo 3</b>	
<b>Título del artículo</b>	Biological processes highlighted in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> during the sparkling wines elaboration
<b>Autores</b>	<b>González-Jiménez, M.D.C.</b> , García-Martínez, T.*, Puig-Pujol, A., Capdevilla, F., Moreno-García, J., Moreno, J., Mauricio, J.C.
<b>Revista científica</b>	Microorganisms (Section: Food Microbiology)
<b>Año de publicación</b>	2020
<b>Índice de impacto (JCR)</b>	4.152
<b>Cuartil</b>	37/134 (Q2)
<b>Categoría</b>	Microbiology
<b>DOI</b>	10.3390/microorganisms8081216

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	140/186



# CONCLUSIONES

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	141/186



## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se deducen de esta Tesis Doctoral se describen a continuación:

Las conclusiones obtenidas del Objetivo 1 sobre el estudio del metabolismo de los compuestos de carbono derivados de la fermentación están recogidas en el artículo “Comparative study of the proteins involved in the fermentation-derived compounds in two strains of *S. cerevisiae* during sparkling wine second fermentation” publicado en la revista científica *Microorganisms* 2020, 8(8), 1209; DOI:10.3390/microorganisms8081209.

- En la levadura de flor se ha identificado un mayor número de proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de metabolitos derivados de la fermentación, como son etanol, glicerol, ácido acético, acetaldehído, acetoina y 2,3-butanodiol, con respecto a la levadura convencional.
- La mayoría de las proteínas presentaron mayor contenido proteico en la levadura de flor y la concentración de los metabolitos relacionados fue diferente en cada cepa, pero todas fueron superiores al de su umbral olfativo.

Las conclusiones extraídas del Objetivo 2 acerca de la identificación y cuantificación de las proteínas y metabolitos del aroma quedan reflejadas en el siguiente artículo: “Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration” publicado en la revista científica *Microorganisms*, 8(3), 403. DOI:10.3390/microorganisms8030403.

- En general, el metabolismo de los ésteres bajo condiciones de sobrepresión de CO<sub>2</sub> fue similar en ambas cepas estudiadas.
- La levadura de flor puede ser una buena candidata para la elaboración de vinos espumosos.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	142/186




Las conclusiones obtenidas del Objetivo 3, en relación al estudio de los procesos biológicos más importantes afectados por la sobrepresión de CO<sub>2</sub> endógeno en *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación, están recogidas en el artículo “Biological processes highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the sparkling wines elaboration”. *Microorganisms*, 8, 1216. DOI:10.3390/microorganisms8081216.

- Se han detectado un menor número de procesos biológicos durante la segunda fermentación bajo sobrepresión de CO<sub>2</sub>, no encontrándose procesos específicos en esta condición de estrés a mitad de la segunda fermentación y sólo dos al final.
- Bajo condiciones sin sobrepresión, la mayoría de los procesos destacados están relacionados con la división celular, el crecimiento y procesos biosintéticos, presumiblemente para el mantenimiento de una buena viabilidad celular. Sin embargo, en condiciones de sobrepresión de CO<sub>2</sub>, los procesos estaban relacionados con el proceso metabólico del ARNt, la organización de los cromosomas, respuesta a estrés y la traducción.
- La sobrepresión de CO<sub>2</sub> afectó en gran medida a la viabilidad celular.

Como conclusión general basada en los resultados obtenidos, se sugiere el uso de este tipo de levadura de flor para la elaboración de vino espumoso, ya que presenta características de fermentación y metabolismo similares a las obtenidas por la levadura convencional. El uso de este tipo de levadura aumentaría la biodiversidad de las cepas de levadura y, posiblemente, reduciría los costos de producción puesto que esta cepa facilita la clarificación y posterior eliminación del vino por su capacidad de adhesión célula-célula, además, es capaz de resistir elevadas concentraciones de etanol.

Con este trabajo de investigación, se ha pretendido obtener una primera aproximación en la búsqueda de las relaciones metaboloma-proteoma de la levadura durante la elaboración del vino espumoso, así como aportar información relevante acerca del comportamiento del proteoma y metaboloma de ambos tipos de levaduras industriales sometidas a condiciones típicas y tan especiales como son las que tienen lugar durante la elaboración de este tipo de vino. Sin embargo, sería necesaria una mayor investigación que considere el estudio de otras levaduras de flor, además de otros compuestos y vías metabólicas, así


Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	143/186





como un enfoque transcriptómico y genético junto con análisis de actividades enzimáticas para llegar a conclusiones más sólidas.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	144/186



## 7. CONCLUSIONS

The general conclusions that are deduced from this Doctoral Thesis are described below:

The conclusions obtained from Objective 1, related the study of the carbon compounds derived from fermentation metabolism, are included in the article "Comparative study of the proteins involved in compounds derived from fermentation in two chains of *Saccharomyces cerevisiae* during sparkling wine second fermentation" published in the Scientific Journal *Microorganisms*, 2020, 8 (8), 1209; DOI.: 10.3390 / microorganisms8081209.

- A greater number of proteins related to the metabolism and transport of metabolites derived from fermentation such as ethanol, glycerol, acetic acid, acetaldehyde, acetoin and 2,3-butanediol, have been identified in the flor yeast with respect to those identified in the conventional yeast.
- Most of the proteins presented higher protein content in the flor yeast and the concentration of the related metabolites were strain dependent. However, they were all above their olfactory threshold.

The conclusions resulting from Objective 2, related to the identification and quantification of aroma proteins and metabolites, are included in the following articles: "Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration" published in *Microorganisms*, 2020, 8 (3), 403. DOI.: 10.3390 / microorganisms8030403.

- In general, the metabolism of esters under conditions of CO<sub>2</sub> overpressure was similar in both strains studied.
- The flor yeast strain may be a good candidate for the production of sparkling wines.

The conclusions obtained from Objective 3, in relation to the study of the most important biological processes affected by endogenous CO<sub>2</sub> overpressure in

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	145/186



*Saccharomyces cerevisiae* during the second fermentation, are included in the article "Biological processes highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the sparkling wines elaboration". *Microorganisms*, 2020, 8, 1216. DOI.: 10.3390 / microorganisms8081216.

- Fewer biological processes have been detected during the second fermentation under CO<sub>2</sub> overpressure. No specific processes were found in this stress condition in the middle of the second fermentation. Only two processes were found at the end.
- Under conditions without overpressure, most of the processes highlighted are related to cell division, growth and biosynthetic processes, presumably for the maintenance of good cell viability. However, under conditions of CO<sub>2</sub> overpressure, the processes were related to tRNA metabolic process, chromosome organization, stress response and translation.
- CO<sub>2</sub> overpressure greatly affected cell viability.

As a general conclusion based on the results obtained, the use of this type of flor yeast for the production of sparkling wine is suggested, as it presents similar fermentation and metabolism characteristics to those obtained by conventional yeast. The use of this type of yeast would increase the biodiversity of the yeast strains, and possibly, reduce production costs, since this strain facilitates the clarification and subsequent elimination of the wine. This is due to its cell-cell adhesion capability. It is as well capable of resisting high concentrations of ethanol.


With this research work, the aim has been to obtain a first approximation in the search for the yeast metabolome-proteome relationships during the production of sparkling wine. It has been aimed as well to provide relevant information about the behavior of the proteome and metabolome of both types of industrial yeast subjected to typical conditions, as special as those that take place during the production of this type of wine. However, further research would be needed to consider the study of other flor yeasts, in addition to other compounds and metabolic pathways. It would be equally necessary some transcriptomic and genetic approaches together with analysis of enzymatic activities to reach more solid conclusions.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	146/186



# REFERENCIAS

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	147/186



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, C.A. 2006. Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In A. Querol & G.H. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*: Springer.
- Abdallah, Z., Aguié-Béghin, V., Abou-Saleh, K., Douillard, R., Bliard, C. 2010. Isolation and analysis of macromolecular fractions responsible for the surface properties in native Champagne wines. *Food Research International*, 43, 982-987.
- Alañón, M.E., Pérez-Coello, M.S., Marina, M.L. 2015. Wine science in the metabolomics era. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 1-20.
- Alexandre, H. 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* - their ecology, genetics and metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 269-275.
- Alexandre, H. Guilloux-Benatier, M. 2006. Yeast autolysis in sparkling wine-a review. *Australian Journal of Grape Wine Research*, 12, 119-127.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231, 215-224.
- Babayan, T.L., Bezrukov, M.G. 1985. Autolysis in yeasts. *Acta biotechnologica*, 5, 129-136.
- Backhaus, K., Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Purschke, G., de Koster, C.G., Klis, F.M., Heinisch, J. J. 2010. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 27, 647-660.
- Bakker, B.M., Bro, C., Kötter, P., Luttk, M.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182, 4730-4737.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S. 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 27-51.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	148/186



- Baumes, R. 2000. Los constituyentes volátiles de la etapa fermentativa. *In* Flanzky, C. (Eds). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, pp.147-158. Madrid.
- Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamón, J.M. 2004. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4, 625-632.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
- Benítez, P., Castro, R., García Barroso, C. 2003. Changes in the polyphenolic and volatile contents of “fino” sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6482-6487.
- Bennetzen, J.L., Hall, B.D. 1982. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 3018-3025.
- Bergström, A., Simpson, J.T., Salinas, F., Barré, B., Parts, L., Zia, A., Nguyen Ba, A.N., Moses, A.M., Louis, E.J., Mustonen, V., Warringer, J., Durbin, R., Liti, G. 2014. A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 872-888.
- Berlanga, T. M., Millán, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M. 2006. Influence of nitrogen on the biological aging of sherry wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2113-2118.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 6, 317-339.
- Boer, V.M., Tai, S.L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M. C., Piper, M. D., De Winde, J.H., Pronk, J.T., Daran, J.M. 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research*, 7, 604-620.
- Bolat, I., Romagnoli, G., Zhu, F., Pronk, J.T., Daran, J.M. 2013. Functional analysis and transcriptional regulation of two orthologs of *ARO10*, encoding broad-substrate-

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	149/186



- specificity 2-oxo-acid decarboxylases, in the brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* CBS1483. *FEMS Yeast Research*, 13, 505-517.
- Bonal, F. 1995. Dom Pérignon: vérité et légende. Langres, Guéniot. France.
- Borneman, A.R., Forgan, A.H., Kolouchova, R., Fraser, J.A., Schmidt, S. A. 2016. Whole genome comparison reveals high levels of inbreeding and strain redundancy across the spectrum of commercial wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6, 957-971.
- Botelho, G. M. 2008. Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira *Vitis vinifera* L. cultivars. Doctoral dissertation, Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro, Portugal.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. 1995. Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. 1999. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. *In* Principles and practices of winemaking, pp. 102-192. Springer, Boston, MA.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brückner, S., Mösch, H-U. 2011. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 25-58.
- Bullock, J.D., Wang, J.P., Bullock, G.H. 1998. Was Dom Perignon Really Blind? *Survey of Ophthalmology*, 42, 481-486.
- Bustos, A.S., Calisaya, J.C., Paredes, C., Duran, G., Taquichiri, M., Alvarado, J.A., Peñarrieta, J.M. 2012. Cuantificación de resveratrol en vinos mediante HPLC. *Revista Boliviana de Química*, 29, 164-169.
- Buxaderas, S., López-Tamames, E. 2012. Sparkling wines: features and trends from tradition. *In* Advances in food and nutrition research, 66, pp.1- 45, Academic Press.
- Byrne, S., Howell, G. 2017. Acetaldehyde: how to limit its formation during fermentation. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 637, 68-69.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	150/186



- Cargile, B.J., Talley, D.L., Stephenson Jr, J.L. 2004. Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of the accuracy of pI predictability of peptides. *Electrophoresis*, 25, 936-945.
- Carnacini, A., Antonelli, A., Galletti, G.C., Natali, N., Farris, G.A. 1997. Quantitative changes of some volatile components in Vernaccia di Oristano (a Sardinian Sherry-like Wine) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2225-2228.
- Caro, L.H.P., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., Van Den Ende, H., Klis, F.M. 1997. In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13, 1477-1489.
- Casalone, E., Colella, C.M., Daly, S., Gallori, E., Moriani, L., Polsinelli, M. 1992. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22, 435- 440.
- 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. *Biotechnology Progress*, 21, 614-616.
- Cebollero, E., Gonzalez, R. 2006. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4121- 4127.
- Charpentier, C., Feuillat, M. 1993. Yeast autolysis. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 225-242.
- Charpentier, C., Freyssinet, M. 1989. The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast (Chichester)*, 5, 181-186.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.N., Pons, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165-178.
- Coelho, E., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. 2011. Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8770-8778.
- Coi, A. L., Bigey, F., Mallet, S., Marsit, S., Zara, G., Gladieux, P., Galeote, V., Budroni, M., Dequin, S., Legras, J.L. 2017. Genomic signatures of adaptation to wine

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	151/186





- biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Molecular Ecology*, 26, 2150-2166.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., Catanis, C. 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 98, 1055–1061.
- Corison, C.A., Ough, C.S., Berg, H.W., Nelson, K.E. 1979. Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, 130-134.
- Damberg, R., Gishen, M., Cozzolino, D. 2015. A review of the state of the art, limitations, and perspectives of infrared spectroscopy for the analysis of wine grapes, must, and grapevine tissue. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50, 261-278.
- 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. *Journal of Proteome Research*, 9, 1716–1726.
- David-Vaizant, V., Alexandre, H. 2018. Flor yeast diversity and dynamics in biologically aged wines. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2235.
- De Deken, R.H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44, 149-156.
- De Nobel, J.G., Barnett, J.A. 1991. Passage of molecules through yeast cell walls: A brief essay-review. *Yeast*, 7, 313-323.
- Debonneville C., Thomé M.A., Chaintreau A. 2004. Hyphenation of quadrupole MS to GC and comprehensive two-dimensional GC for the analysis of suspected allergens: review and improvement. *Journal of Chromatographic Science*, 42, 450-455.
- Díaz de Mendivil, J.M., Peris Balada, A., PláPayà, S. 1999. Larousse de los vinos, pp. 241-246. Larousse Editorial S.A., Barcelona, Spain.
- Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Dickinson, J.A., Hewlins, M.J. 2000. An investigation of the metabolism of isoleucine to active Amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275,10937-10942.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	152/186



- Dickinson, J.R., Salgado, L.E., Hewlins, J.E. 2003. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 8028-8034.
- Dickinson, T.A., White, J., Kauer, J.S., Walt, D.R. 1998. Current trends in artificial-nose technology. *Trends in Biotechnology*, 16, 250-258.
- Drawert, F., Schreier, P., Scherer, W. 1974. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 155, 342-347.
- Duteurtre, B. 2010. Le champagne, de la tradition à la science. Paris, Francia Tec & Doc, Lavoisier DL.
- Eden, A., Van Nedervele, L., Drukker, M., Benvenisty, N., Debourg, A. 2001. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 296-300.
- Eldarov, M.A., Beletsky, A.V., Tanashchuk, T.N., Kishkovskaya, S.A., Ravin, N.V., Mardanov, A.V. 2018. Whole-genome analysis of three yeast strains used for production of sherry-like wines revealed genetic traits specific to flor yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 9, 965.
- 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. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 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 Research*, 8, 1127-1136.
- Essader, A.S., Cargile, B.J., Bundy, J.L., Stephenson Jr, J.L. 2005. A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics*, 5, 24-34.
- Feuillat, M., Charpentier, C. 1982. Autolysis of yeasts in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33, 6-13.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	153/186



- Fidalgo, M., Barrales, R. R., Ibeas, J. I., Jimenez, J. 2006. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 11228-11233.
- Fiehn, O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *In Functional genomics*, pp. 155-171. Springer, Dordrecht.
- Flanzy, C. 2000. Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Madrid, España, Mundi-Prensa.
- Flanzy, C., Salgues, M., Bidan, P., Dubois, C., Moulin, J.P., Sablayrolles, J.M. 1999. "Oenology: Fondements scientifiques et technologiques". Flanzy, C., (Ed.), Technique et Documentation, pp.497-516, Paris, France.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 1034-1038.
- Fleet, G.H., Heard G.M. 1993. Yeast-growth during fermentation. *In Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 27-54, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet, G.M. 1993. Yeasts-growth during fermentation. *Wine Microbiology & Biotechnology*, 27-54.
- Florens, L., Washburn, M. P. 2006. Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology. *In New and emerging proteomic techniques*, pp. 159-175. Humana Press.
- Fontana, A.R., Bottini, R. 2017. Filter-vial dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up for determination of ethylphenols in red wines. *Food Chemistry*, 230, 405-410.
- Forsburg, S.L., Nurse, P. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 227-256.
- Fotakis, C., Kokkotou, K., Zoumpoulakis, P., Zervou, M. 2013. NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Research International*, 54, 1184-1194.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	154/186



- Frivik, S.K., Ebeler, S.E. 2003. Influence of sulfur dioxide on the formation of aldehydes in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 31-38.
- Fugelsang, K.C. 1997. *Wine Microbiology*. Chapman and Hall Pub. Co, New York, USA.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, USA.
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y. 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 910-915.
- Futcher, A.B. 1990. Yeast cell cycle. *Cell Biology*, 2, 246-251.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K.J. 2016. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166, 1397-1410.
- García-Ríos, E., López-Malo, M., Guillamón, J.M. 2014. Global phenotypic and genomic comparison of two *Saccharomyces cerevisiae* wine strains reveals a novel role of the sulfur assimilation pathway in adaptation at low temperature fermentations. *BMC Genomics*, 15, 1059.
- Gerbaux, V., Vincent, B., Bertrand, A. 2002. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 131-137.
- Gishen, M., Dambergs, R.G., Cozzolino, D. 2005. Grape and wine analysis in the Australian wine industry - Enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 296-305.
- Goddard, M.R. 2008. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89, 2077-2082.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546-567.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	155/186



- Gonzalez, R., Martinez-Rodriguez, A.J., Carrascosa, A.V. 2003. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 21-26.
- Gonzalez-Ramos, D., Cebollero, E., Gonzalez, R. 2008. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5533-5540.
- González-Ramos, D., González, R. 2006. Genetic Determinants of the Release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9411-9416.
- Gougeon, L., da Costa, G., Guyon, F., Richard, T. 2019. 1H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*, 301, 125257.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., Vincenzini, M. 1998. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*, 36, 313-318.
- Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M.C., Andersen, H.A. 1995. *BAP2*, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1269, 275-280.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell - cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 12158-12163.
- H. Van Der Dool, P.D., Kratz. A. 1963. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463- 471.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2259-2266.
- Heller, M., Michel, P.E., Morier, P., Crettaz, D., Wenz, C., Tissot, J.D., Reymond, F., Rossier, J.S. 2005. Two-stage Off-Gel isoelectric focusing: protein followed by

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	156/186



- peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis* 26, 1174 -1188.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 865-876.
- Henschke, P.A. 1993. Yeast-metabolism of nitrogen compounds. *Wine, Microbiology and Biotechnology*.
- Henschke, P.A., Jiranek, V. 1991. Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. *In Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, pp. 172-184. American Society for Enology and Viticulture, ASEV. Seattle, Washington, USA
- Hidalgo, J. 2011. *Tratado de Enología*. 2 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 2v
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á, Mas, A., Guillamón, J.M. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7148-7155.
- Hörth, P., Miller, C.A., Preckel, T., Wenz, C. 2006. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 1968-1974.
- Iimura, Y., Hara, S., Otsuka, K.I. 1980. Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 1215-1222.
- Iraqui, I., Vissers, S., André, B., Urrestarazu, A. 1999. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 3360-3371.
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y. 2004. *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 425- 430.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M. 2005, Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	157/186



- Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides Per Protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 1265–1272.
- Jansen, M., Veurink, J.H., Euverink, G.J.W., Dijkhuizen, L. 2003. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research*, 3, 313-318.
- Jauniaux, J.C., Grenson, M. 1990. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *European Journal of Biochemistry*, 190, 39- 44.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15-39.
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215-237.
- Karas, M., Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60, 2299-2301.
- Karpichev, I. V., Small, G. M. 1998. Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6560-6570.
- Karpichev, I.V., Luo, Y.I., Marians, R.C., Small, G.M. 1997. A complex containing two transcription factors regulates peroxisome proliferation and the coordinate induction of beta-oxidation enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 69-80.
- Kell, D.B., Brown, M., Davey, H.M., Dunn, W.B., Spasic, I., Oliver, S.G. 2005. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 557-565.
- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., Marchal, R. 2015. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 19-38.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	158/186



- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*, 26, 231-243.
- Kraushaar, T., Brückner, S., Veelders, M., Rhinow, D., Schreiner, F., Birke, R., Pagenstecher, A., Mösch, H.U., Essen, L.O. 2015. Interactions by the fungal Flo11 adhesin depend on a fibronectin type III-like adhesin domain girdled by aromatic bands. *Structure*, 23, 1005-1017.
- Kunkee, R.E., Bisson, L.F. 1993. "Wine-making yeasts." In *The Yeasts*, 2nd ed., Vol. 5, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds., pp. 69-127. London: Academic Press.
- Kuranda, M.J., Robbins, P.W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 19758-19767.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1246-1249.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-129.
- Laurent, M.H., Henick-Kling, T., Acree, T.E. 1994. Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Wein-Wissenschaft*, 49, 3-10.
- Legras, J. L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J.P., Dequin, S. 2018. Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1712-1727.
- Legras, J.L., Erny, C., Charpentier, C. 2014. Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PLoS One*, 9, e108089.
- Liger-Belair, G., Polidori, G., Zéninari, V. 2012. Unraveling the evolving nature of gaseous and dissolved carbon dioxide in Champagne wines: A state-of-the-art review, from the bottle to the tasting glass. *Analytica Chimica Acta*, 732, 1-15.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	159/186





- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I. S. 2006. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23, 641-659.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. 2006. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 726-743.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 744-753.
- Liu, Y., Han, F., Liu, Y., Wang, W. 2020. Determination of Biogenic Amines in Wine Using Modified Liquid-Liquid Extraction with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector. *Food Analytical Methods*, 1-12.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T.G. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 141-144.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., Brock, T. 2015. Brock Biology of Microorganisms, New Jersey. Prentice-Hall.
- Maga, J.A. 1976. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. *Lactones in Foods*, 8, 1-56.
- Malcorps, P., Cheval, J.M., Jamil, S., Dufour, J.P. 1991. A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49, 47-53.
- Mallouchos, A., Skandamis, P., Loukatos, P., Komaitis, M., Koutinas, A., Kanellaki, M. 2003. Volatile compounds of wines produced by cells immobilized on grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3060-3066.
- Marais, J., Pool, H.J. 1980. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*, 19, 151-164.
- Marce, R.M., Calull, M., Olucha, J.C., Borrull, F.R.F.X., Rius, F.X. 1991. Optimized isocratic separation of major carboxylic acids in wine. *Journal of Chromatography A*, 542, 277-293.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	160/186



- Marin-Menguiano, M., Romero-Sanchez, S., Barrales, R.R., Ibeas, J.I. 2017. Population analysis of biofilm yeasts during fino sherry wine aging in the Montilla-Moriles DO region. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 67-73.
- Marsit, S., Dequin, S. 2015. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15, fov067.
- Martínez, J.M., Cebrián, G., Álvarez, I., Raso, J. 2016. Release of mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* autolysis induced by pulsed electric field. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1435.
- Martínez, J.M., Delso, C., Aguilar, D., Cebrián, G., Álvarez, I., Raso, J. 2018. Factors influencing autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 73, 67-72.
- Martínez, J.M., Delso, C., Maza, M.A., Álvarez, I., Raso, J. 2019. Pulsed electric fields accelerate release of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* during aging on the lees of Chardonnay wine. *Food Research International*, 116, 795-801.
- Martinez, P., Codón, A.C., Pérez, L., Benitez, T. 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*, 11, 1399-1411.
- 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 Chemistry*, 237, 1030-1040.
- Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A.V., Barcenilla, J.M., Pozo-Bayón, M.A., Polo, M.C. 2001. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology*, 18, 183-191.
- Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, V., Polo, M C. 2002. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 314-322.
- Martinez-Rodriguez, A.J., Gonzalez, R., Carrascosa, A.V. 2004. Morphological changes in autolytic wine yeast during aging in two model systems. *Journal of Food Science*, 69, M233-M239.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	161/186




- Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C. 2000. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1081-1085.
- Mason, A.B., Dufour, J.P. 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16, 1287-1298.
- Mauricio, J.C., Valero, E., Millán, C., Ortega, J.M. 2001. Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3310-3315.
- Michel, P.E., Reymond, F. Arnaud, I.L., Jossierand, J., Girault, H.H., Rossier, J.S. 2003. Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 24, 3-11.
- Moine-Ledoux, V., Dubourdieu, D. 1999. An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 537-543.
- Molina, A.M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., Agosin, E. 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117, 189-195.
- Molon, M., Woznicka, O., Zebrowski, J. 2018. Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*, 19, 67-79.
- Moreno, J., Peinado, R. 2010. Química enológica. Mundi-prensa y Amv ediciones.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. 2009. Wine chemistry and biochemistry. Springer edition.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 265-286.
- 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 Research*, 18, foy005.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	162/186



- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Millán, M.C., Mauricio, J.C., Moreno, J. 2015a. Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. *Food Microbiology*, 51, 1-9.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J.C. 2015b. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiology*, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 21-29.
- Moreno-García, J., Mauricio, J., Moreno, J., García-Martínez, T. 2017. Differential proteome analysis of a flor yeast strain under biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 720.
- Moreno-García, J., Ogawa, M., Joseph, C.L., Mauricio, J.C., Moreno, J., García-Martínez, T. 2019. Comparative analysis of intracellular metabolites, proteins and their molecular functions in a flor yeast strain under two enological conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 6.
- Mosandl, A., Guenther, C. 1989. Stereoisomeric flavor compounds. 20. Structure and properties of gamma-lactone enantiomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 413- 418.
- Mrša, V., Tanner, W. 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, 15, 813-820.
- Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V. 2016. Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 797-813.
- National Institute of Standards, 2016. National Institute of Standards and Technology (NIST). Web book of chemistry.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	163/186



- Navarro-Tapia, E., Nana, R.K., Querol, A., Pérez-Torrado, R. 2016. Ethanol cellular defense induces unfolded protein response in yeast. *Frontiers in Microbiology*, 7, 189.
- Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P.E., Nicolas, L., Johnston, D.J. 2005. Flavor encapsulation in yeasts: limonene used as a model system for characterization of the release mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7532-7543.
- Nunez, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7232-7237.
- Nykanen, L. 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 4007-4021.
- OIV. 2012. International Organization of Vine and Wine. Compendium of International Methods of Wine and Must analysis. Edition. Vol. 1 and 2. Rue d'Aguesseau. París (France).
- Olavarrieta, J. 1995. El Cava. Edition 2ª, Gràfiques Ibèrica S.A., Barcelona, Spain.
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16, 373-378.
- Peinado, R.A., Moreno, J.A., Muñoz, D., Medina, M., Moreno, J. 2004. Gas Chromatographic Quantification of Major Volatile Compounds and Polyols in Wine by Direct Injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6389-6393.
- Penacho, V., Valero, E., Gonzalez, R. 2012. Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 176-182.
- Peñin, J. 2008. Historia del vino. Espasa libros, Madrid, Spain.
- Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Pardo-Mínguez, F., Gómez-Plaza, E. 2003. Extraction and formation dynamic of oak-related volatile

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	164/186



- compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5444-5449.
- Pérez-Serradilla, J.A., De Castro, M.L. 2008. Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111, 447- 456.
- Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano, G., Sinigaglia, M. 2017. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Frontiers in Microbiology*, 8, 995.
- Picard, M., Franc, C., de Revel, G., Marchand, S. 2018. Dual solid-phase and stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis provides a suitable tool for assaying limonene-derived mint aroma compounds in red wine. *Analytica Chimica Acta*, 1001, 168-178.
- Pickenhagen, W. 1989. Enantioselectivity in odor perception. *In Flavor Chemistry, Trends and Developments*, pp. 151-157. Teranishi, R., Buttery, R. G., and Shahidi, F., Eds., ACS Symposium Series 388, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Picotti, P., Clément-Ziza, M., Lam, H., Campbell, D.S., Schmidt, A., Deutsch, E. W., Röst, H., Sun, Z., Rinner, O., Reiter, L., Shen, Q., Michaelson, J.J., Frei, A., Alberti, S., Kusebauch, U., Wollscheid, B., Moritz, R.L., Beyer, A., Shen, Q. 2013. A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis. *Nature*, 494, 266.
- Pigeau, G.M., Inglis, D.L. 2007. Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1576-1586.
- Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vicente, A.A. 2014. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1937-1949.
- Pittet, A.O., Klaiber, E.M. 1975. Synthesis and flavor properties of some alkyl-substituted. alpha-pyrone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 1189-1195.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	165/186



- Plata, M.D.C., Mauricio, J.C., Millán, C., Ortega, J. 1998. *In vitro* specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of Sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, 369-374.
- Poinsaut, P. 1991. Le mosalux appareil de mesure du pouvoir moussant du vin *Revue des Oenologues*, 59, pp. 36-43
- Porras-Agüera, J.A., Mauricio, J.C., Moreno-García, J., Moreno, J., García-Martínez, T. 2020a. A differential proteomic approach to characterize the cell wall adaptive response to CO<sub>2</sub> overpressure during sparkling wine-making process. *Microorganisms*, 8, 1188.
- 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.
- Porras-Agüera, J. A., Román-Camacho, J. J., Moreno-García, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. 2020b. Effect of endogenous CO<sub>2</sub> overpressure on the yeast “stressome” during the “prise de mousse” of sparkling wine. *Food Microbiology*, 89, 103431.
- Pozo-Bayón, M.Á., Moreno-Arribas, M.V. 2011. Sherry wines. *In Advances in food and nutrition research*, 63, 17- 40. Academic Press.
- Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Marchand, S., Anocibar Beloqui, A., Bertrand, A. 2001. Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in must and wines, first application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 731-738.
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T. 2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, 233, 721.
- Prohl, C., Kispal, G., Lill, R. 2000. Branched-chain-amino-acid transaminases of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology*, 324, 365.
- Quain, D. 1988. Studies on yeast physiology - impact of fermentation performance and product quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 315-323.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	166/186



- Querol, A., Fleet, G.H. 2006. Yeast in Food and beverages. Springer
- Rapp, A., Versini, G. 1995. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *In* Developments in food science, 37, 1659-1694. Elsevier.
- Rauhut, D. 1993. Yeasts-production of sulfur compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 6, 183-223.
- Remize, F., Andrieu, E., Dequin, S. 2000. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg<sup>2+</sup> and mitochondrial K<sup>+</sup> acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3151-3159.
- Ribereau-Gayon, P., Boidron, J.G., Terrier, A. 1975. Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 1042-1047.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). 2006. Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Ríos-Reina, R., Morales, M.L., García-González, D.L., Amigo, J.M., Callejón, R.M. 2018. Sampling methods for the study of volatile profile of PDO wine vinegars. A comparison using multivariate data analysis. *Food Research International*, 105, 880-896.
- Rodicio, R., Heinisch, J.J. 2017. Carbohydrate Metabolism in Wine Yeasts. Springer edition. Chapter 8.
- Romagnoli, G., Luttk, M.A., Kötter, P., Pronk, J.T., Daran, J.M. 2012. Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 7538-7548.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., Polsinelli, M. 1994. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 213-218.
- Rossignol, T., Kobi, D., Jacquet-Gutfreund, L., Blondin, B. 2009. The proteome of a wine yeast strain during fermentation, correlation with the transcriptome. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 47-55.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	167/186





- Rossouw, D., Bauer, F.F. 2009. Comparing the transcriptomes of wine yeast strains: toward understanding the interaction between environment and transcriptome during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 937.
- Rossouw, D., Næs, T., Bauer, F.F. 2008. Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*, 9, 530.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3911-3923.
- Rottensteiner, H., Kal, A.J., Hamilton, B., Ruis, H., Tabak, H.F. 1997. A heterodimer of the Zn2Cys6 transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 247, 776-783.
- Russell, D.W., Smith, M., Williamson, V.M., Young, E.T. 1983. Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 2674-2682.
- Ryan, O., Shapiro, R.S., Kurat, C.F., Mayhew, D., Baryshnikova, A., Chin, B., Lin, Z-Y., Cox, M.J., Vizeacoumar, F., Cheung, D., Bahr, S., Tsui, K., Tebbji, F., Sellam, A., Istel, F., Schwarzmüller, T., Reynolds, T.B., Kuchler, K., Gifford, D.K., Whiteway, M., Giaever, G., Nislow, C., Costanzo, M., Gingras, A-C., Mitra, R.D., Andrews, B., Fink, G.R., Cowen, L.E., Boone, C. 2012. Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science*, 337, 1353-1356.
- Saerens, S., Thevelein, J., Delvaux, F. 2008. Ethyl ester production during brewery fermentation, a review. *Cerevisia*, 33, 82-90.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	168/186



- Saerens, S.M., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3, 165-177.
- Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D., Voet, A.R., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 4446-4456.
- Scheele, G.A. 1975. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5375-5385.
- Seisonen, S., Vene, K., Koppel, K. 2016. The Current Practice in the Application of Chemometrics for Correlation of Sensory and Gas Chromatography Data. *Food Chemistry*, 210, 530–540.
- Spiropoulos, A., Bisson, L.F. 2000. *MET17* and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4421-4426.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., Querol, A. 2015. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 41- 46.
- Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F. 2011. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 1145.
- Suárez-Lepe, J.A. 2007. Control Biológico en la fermentación de vinos tintos. Jornada técnica dedicada a analizar el crecimiento y reproducción de levaduras en vinos tintos y a la actividad fermentativa simultánea, Monforte, Galicia.
- Suárez-Lepe, J.A. and Íñigo-Leal, B. 2004. Microbiología Enológica. In Mundi-Prensa (Eds.). Fundamentos de vinificación. Madrid (Spain).
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 11, 139-173.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	169/186



- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. 2005. Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131-175.
- 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. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 5100-5112.
- Tasev, K., Stefova, M., Ivanova, V. 2016. HPLC method validation and application for organic acid analysis in wine after solid-phase extraction. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35, 225-233.
- 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. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 65-72.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. 1998. A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5215-5219.
- Török, T., Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M. 1996. Quest for wine yeasts - an old story revisited. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 303-313.
- Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., Buxaderas, S. 2008. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 48-57.
- Ubeda, C., Callejón, R.M., Troncoso, A.M., Peña-Neira, A., Morales, M.L. 2016. Volatile profile characterization of Chilean sparkling wines produced by traditional and Charmat methods via sequential stir bar sorptive extraction. *Food Chemistry*, 207, 261-271.
- Usseglio-Tomasset, L. 1967. The volatile acids (homologous of acetic acid) in fermentation with various yeast species. *Atti.Acad.Ital. Vite Vino, Siena*, 19, 165-183.
- Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1, 199-224.
- Vararu, F., Moreno-García, J., Zamfir, C.I., Cotea, V.V., Moreno, J. 2016. Selection of Aroma Compounds for the Differentiation of Wines Obtained by Fermenting

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	170/186



- Musts with Starter Cultures of Commercial Yeast Strains. *Food Chemistry*, 197, 373–381.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. 2003. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 110-118.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R.D., Chaves, S.R., Sousa, M.J., Côrte-Real, M. 2011. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and bBiotechnology*, 89, 271-280.
- Villamiel, M., Polo, M.C., Moreno-Arribas, M.V. 2008. Nitrogen compounds and polysaccharides changes during the biological ageing of sherry wines. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1842-1846.
- Vollbrecht, D., Radler, F. 1973. The formation of higher alcohols by amino acid auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. The conversion of amino acids to higher alcohols. *Archiv fur Mikrobiologie*, 94, 351.
- Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, S.L., Piper, M.D., Pronk, J.T. 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4534-4541.
- Webb, A.D. 1967. Some aroma compounds produced by vinous fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 9, 305-319.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology Genetic Engineering Reviews*, 13,19-50.
- Yang, P., Li, H., Wang, H., Han, F., Jing, S., Yuan, C., Guo, A., Zhang, Y., Xu, Z. 2017. Dispersive liquid-liquid microextraction method for HPLC determination of phenolic compounds in wine. *Food Analytical Methods*, 10, 2383-2397.
- Yin, Q.Y., De Groot, P.W., De Jong, L., Klis, F.M., De Koster, C.G. 2007. Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 7, 887-896.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	171/186



- Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., Budroni, M. 2009. *FLO11* gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 155, 3838-3846.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2934-2939.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4089- 4091.

Páginas WEBS:

<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>

<http://www.docava.es/>

<http://www.uniprot.org/>

<http://www.yeastgenome.org>

<https://www.metaboanalyst.ca/>

<https://www.nist.gov/>

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	172/186



## ANEXO I. MOVILIDAD INTERNACIONAL

Este proyecto de Tesis Doctoral, que aborda un proyecto innovador y cuya originalidad reside en la utilización de una levadura no convencional para la elaboración de vino espumoso, así como el establecimiento de relaciones entre el metaboloma y el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionará una plataforma de conocimiento para futuras investigaciones. Para ello se realizó una estancia de tres meses al Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Sassari, (Sassari, Cerdeña, Italia).


El objetivo principal de la movilidad internacional fue ampliar los conocimientos sobre diferentes técnicas moleculares de análisis de levaduras vínicas, así como la identificación de levaduras mediante análisis RFLP.

### *Técnicas moleculares aplicables al estudio del metabolismo del triptófano*

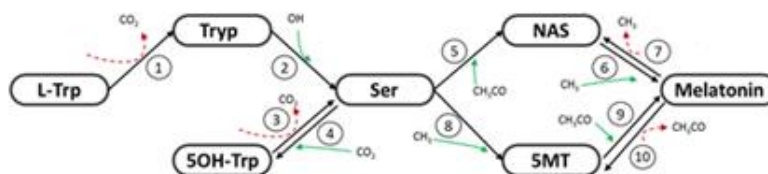
El triptófano es un aminoácido aromático precursor de numerosos metabolitos, entre los que destacan el triptofol, alcohol de fusel (Hazelwood *et al.*, 2008) y la melatonina, compuesto bioactivo (Mas *et al.*, 2014). Debido a la importancia de este último compuesto en el ser humano, en los últimos años ha habido un incremento de la investigación sobre los compuestos bioactivos derivados de los aminoácidos aromáticos producidos por la levadura durante la fermentación alcohólica en la elaboración de vino (Pérez-Serradilla *et al.*, 2008; Vigentini *et al.*, 2015; Fernández-Cruz *et al.*, 2017) y su actividad e influencia en las propiedades organolépticas del mismo (Paixão *et al.*, 2007).

La biosíntesis de la melatonina tiene lugar a partir del aminoácido aromático triptófano, principal precursor. En primer lugar, el triptófano es hidroxilado por la triptófano-5-hidroxilasa para formar 5-hidroxitriptófano. A continuación, este producto se descarboxila a 5-hidroxitriptamina (o serotonina) y, posteriormente, es acetilado para formar N-acetilserotonina mediante la arilalquilamina N-acetiltransferasa, finalmente, la N-acetilserotonina se metila en melatonina mediante la N-acetilserotonina O-metiltransferasa. (Tan *et al.*, 2015) La vía biosintética de la melatonina se ilustra en la Figura 8.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	173/186



La presencia de melatonina en el vino depende de la fase de crecimiento en la que se encuentre la levadura, así como de la concentración de triptófano presente en el medio (Sprenger *et al.*, 1999; Rodríguez-Naranjo *et al.*, 2012). Está relacionada principalmente con la defensa celular contra el estrés oxidativo (Tan *et al.*, 2015) y la protección de las células de levadura frente a la radiación UV (Bisquert *et al.*, 2018).



**Figura 10.** Ruta de biosíntesis de la melatonina en levaduras. L-Trp (triptófano), Tryp (triptamina), 5OH-Trp (5-hidroxitriptófano), Ser (serina), NAS (N-acetilserotonina), 5MT (5-metoxitriptamina). Los números indican las diferentes etapas de la ruta: 1. Descarboxilación del triptófano; 2. Hidroxilación de triptamina; 3. Descarboxilación de 5-hidroxitriptófano; 4. Carboxilación de 5-hidroxitriptófano; 5. Serotonina N-acetilación; 6. N-acetilserotonina O-metilación; 7. N-acetilserotonina O-desmetilación; 8. Serotonina O-metilación; 9. N-acetilación de 5-metoxitriptamina; 10. Desacetilación de melatonina. (Muñiz-Calvo *et al.*, 2019).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la generación de una cepa mutante nula (*knockout*) incapaz de degradar el triptófano, podría aportar grandes beneficios al vino debido a que este aminoácido aromático podría ser utilizado por la levadura para la producción de melatonina. Una de las enzimas claves en la degradación de este aminoácido aromático es la aminotransferasa aromática II, Aro9p. Esta proteína cataliza el primer paso de la ruta de degradación del triptófano.

#### Diseño experimental planteado

- I. Generación de los mutantes de delección *ARO9Δ* por recombinación homóloga en una levadura vínica de *Saccharomyces cerevisiae*
  - i. Diseño del vector de recombinación
  - ii. Transformación de la levadura
  - iii. Caracterización y análisis de los mutantes de delección
- II. Análisis de los exo-metabolitos liberados al vino por los mutantes de delección *ARO9Δ*

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Página	174/186

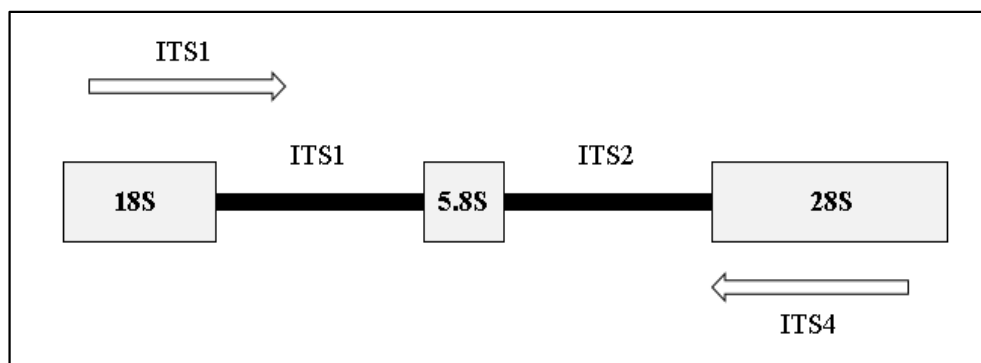


- i. Elaboración del vino con los mutantes de delección *ARO9A*
- ii. Análisis metabolómico del vino resultante

### Identificación de levaduras mediante análisis RFLP

Tradicionalmente, la identificación y clasificación de las levaduras se realizaba atendiendo a los rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. La metodología convencional para la identificación de levaduras requiere la realización de entre 60 y 90 pruebas haciendo del proceso algo complejo, laborioso y lento (Dedk, 1995). Mientras que con el desarrollo de esta técnica se puede reducir toda esa complejidad y obtener los resultados de forma rápida. Esta técnica está basada en las regiones ITS (espaciador transcrito interno) y el gen 5.8s ARNr. La región ITS consiste en una región no codificante y variable mientras que la del gen 5.8s ARNr es codificante y conservada.

Este análisis es útil para la clasificación de especies de *Saccharomyces* (Huffman *et al.*, 1992; Valente *et al.*, 1996), especies de *Kluyveromyces* (Belloch *et al.*, 1998; Wambui *et al.*, 2014), así como levaduras vínicas (Guillamón *et al.*, 1998; Padilla *et al.*, 2017; Tapsoba *et al.*, 2020), debido a que las regiones ribosómicas evolucionan de forma concreta, mostrando un polimorfismo de baja intraespecificidad y una alta variabilidad interespecífica (Carvalho *et al.*, 2005).



**Figura 11.** Representación esquemática de la región del gen ARNr amplificado por PCR usando los cebadores ITS1 e ITS4 (espaciador transcrito interno, ITS).

Para la identificación de levaduras, se siguió el protocolo establecido por Carvalho y colaboradores (2005). Los cebadores ITS1 e ITS4 se usaron para amplificar la región de la unidad de repetición de ADNr que incluye el gen 5.8s ARNr y las dos regiones no

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	175/186






codificantes designadas como espaciadores transcritos internos, ITS1 e ITS2 (ver Figura 9). ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') es para un dominio 3' conservado en la subunidad nuclear 18S e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3') es un cebador inverso a una región conservada del ADNr nuclear grande (Carvalho *et al.*, 2005). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, apareamiento a 53 °C durante 2 min y extensión a 72 °C durante 2 min; y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Por último, los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% con tampón TAE 1X (ácido tris-acético-EDTA).

### Referencias

- Belloch, C., Barrio, E., Garcia, M.D., Querol, A. 1998. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Systematic and applied microbiology*, 21(2), 266-273.
- Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., Guillamón, J.M. 2018. Protective role of intracellular melatonin against oxidative stress and UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 318.
- Carvalho, C.M., Rocha, A., Estevinho, M.L.F., Choupina, A. 2005. Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 11-17.
- Dedk, T. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6, 287-292.
- Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M.A., Valero, E., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2017. Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. *Food Chemistry*, 217, 431- 437.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169(5), 387-392.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	176/186




- 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. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2259-2266.
- Huffman, L., Molina, F., Jong, C. 1992. Authentication of ATCC strains in the *Saccharomyces cerevisiae* complex by PCR fingerprinting. *Experimental mycology*, 16(4), 316-319.
- Mas, A., Guillamon, J.M., Torija, M.J., Beltran, G., Cerezo, A.B., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. 2014. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Research International*, 1-7.
- Muñiz-Calvo, S., Bisquert, R., Fernández-Cruz, E., García-Parrilla, M.C., Guillamón, J.M. 2019. Deciphering the melatonin metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by the bioconversion of related metabolites. *Journal of Pineal Research*, 66(3), e12554.
- Padilla, B., Zulian, L., Ferreres, À., Pastor, R., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., Mas, A. 2017. Sequential inoculation of native non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine making. *Frontiers in microbiology*, 8, 1293.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204-214.
- Pérez-Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D. 2008. Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111, 447- 456.
- Rodriguez-Naranjo, M.I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, M.D.C. 2012. Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of pineal research*, 53(3), 219-224.
- Sprenger, J., Hardeland, R., Fuhrberg, B., Han, S.Z. 1999. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*, 64(2), 209-213.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	177/186



- Tan, D.X., Manchester, L., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., Reiter, R. 2015. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules*, 20, 18886-18906.
- Tapsoba, F., Savadogo, A., Zongo, C., Traoré, A. 2020. Improvement of *Borassus akeassii* wines quality by controlled fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 589-592.
- Valente, P., Gouveia, F.C., de Lemos, G.A., Pimentel, D., van Elsas, J.D., Mendoga-Hagler, L.C. Hagler, A.N. 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology letters*, 137(2-3), 253-256.
- Vigentini, I., Gardana, C., Fracassetti, D., Gabrielli, M., Foschino, R., Simonetti, P., Tirelli, A., Iriti, M. 2015. Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts. *Journal of Pineal Research*, 58, 388-396.
- Wambui, V., Hesham, A.E.L., Ogola JO, H.O., Maina, J. 2014. Application of 26S ARNr gene sequencing and RFLP of ITS1-5.8 S-ITS2 analysis for the identification of *Kluyveromyces* strain BM9 producing biofuel. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(5), 379-383.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	178/186



## ANEXO II. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS

### 1. Publicaciones Nacionales no Indexadas

En este apartado se muestran los resultados que se llevaron a cabo como un primer estudio sobre el efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub> en el metabolismo de los aminoácidos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* P29 durante la segunda fermentación en la elaboración de vinos espumosos, ya que el metabolismo del nitrógeno es uno de los procesos más importantes que tienen lugar durante la fermentación alcohólica del mosto.

Durante la segunda fermentación y en el periodo de envejecimiento del vino tiene lugar la liberación de compuestos nitrogenados, mayoritariamente aminoácidos y péptidos, que contribuyen positivamente al aroma, sabor y propiedades espumantes de los vinos espumosos. Dependiendo del tipo de compuesto nitrogenado del que se trate, *S. cerevisiae* puede acumularlo y, posteriormente, incorporarlo directamente a proteínas, usarlo como fuente de nitrógeno o como fuente de carbono.

El efecto de la sobrepresión de CO<sub>2</sub> se reflejó en la obtención de un menor número de proteínas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos bajo condiciones típicas de segunda fermentación con respecto a la condición sin sobrepresión de CO<sub>2</sub>. Debido a que las levaduras utilizan los aminoácidos como fuente de nitrógeno para producir la biomasa suficiente y realizar la fermentación alcohólica, esto va a repercutir en la formación de precursores aromáticos y en las características organolépticas del cava.

Estos resultados constituyen otra aportación científica derivada directamente de la Tesis Doctoral, publicada en la revista referente especializada sobre el sector de la vitivinicultura en España *La Semana Vitivinícola, Revista Técnica del Sector*. Nº 3486, con el título “Estudio preliminar del metabolismo de aminoácidos en vinos espumosos”. **González Jiménez, M. C.,** Moreno-García, J., Porras, J. A., García Martínez, T. *La Semana vitivinícola*, 2017, 6-8.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	179/186



## 2. Presentaciones de Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales

En este segundo apartado se presentan tanto las comunicaciones orales como escritas en formato de póster a distintos congresos nacionales e internacionales.

### A. Comunicaciones orales

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Comunicación oral:** Estudio comparativo de los procesos biológicos llevados a cabo al final de la fermentación alcohólica por dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. **González-Jiménez, M.D.C.**, Porrás-Agüera, J.A., Román-Camacho, J., Ogawa, M., Sánchez-León, I., Moreno-García, J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Comunicación oral:** Análisis comparativo de las proteínas relacionadas con la apoptosis en dos cepas de levadura industriales al final de la fermentación alcohólica. Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Ogawa, M., Román-Camacho, J.J., Moreno-García, J., Martín-García, F.J., García-Martínez, T., Mauricio, J.C.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Comunicación oral:** ¿Comportamientos sociales en biofilms de levadura de flor? Evidencias de apoptosis en el proteoma de la levadura de flor. Moreno-García, J., Ogawa, M., Martín-García, F.J., **González-Jiménez, M.D.C.**, Porrás-Agüera, J.A., Sánchez-León, I., García-Martínez, T., Mauricio, J.C.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Comunicación oral:** Selección de levaduras osmotolerantes y resistentes al SO<sub>2</sub> como estrategia de lucha contra el cambio climático. Martín-García, F.J., Palacios-Fernández, S., López de Lerma-Extremera, N., Martínez-García, R., **González-Jiménez, M.D.C.**, García-Mauricio, J.C., Peinado-Amores, R.A.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	180/186



**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Comunicación oral:** Gluconic acid metabolism of flor yeast: Screening of intracellular metabolites. Ogawa, M., Moreno-García, J., Moreno, J., Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Martín-García, F.J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**VII Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. (Córdoba, España, 2019). Comunicación oral:** Efecto de la presión de CO<sub>2</sub> endógeno sobre las proteínas implicadas en el flujo del carbono de *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación del cava. **González-Jiménez, M.D.C.**

**I Jornada de transferencia Universidad-Empresa del Máster en Biotecnología. (Córdoba, España, 2019). Comunicación oral:** Estudio proteómico y metabolómico de levaduras vínicas durante la producción de cava. **González-Jiménez, M.D.C.**

**VI Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. (Córdoba, España, 2018). Comunicación oral:** Proteínas relacionadas con la formación de alcoholes de fusel en una cepa de levadura de flor *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación en cava. **González-Jiménez, M.D.C.**

**VIII Jornadas de divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. (Córdoba, España, 2018). Comunicación oral:** Proteomic and exo-metabolomic studies of wine yeast subjected to different winemaking conditions. Martín-García, F.J., Moreno-García, J., López de Lerma, N., Martínez-García, R., Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Roldán-Romero, Y., Millán, M.C., Peinado, R., Mauricio, J.C., Moreno, J., García-Martínez, T.

**XXXIX Jornadas de Viticultura y Enología. Tierra de Barros. (Badajoz, España, 2017). Comunicación oral:** Primeros estudios del metabolismo de aminoácidos después de la segunda fermentación en botella de los vinos espumosos. **González-Jiménez, M.D.C.**, Mauricio, J.C., Porrás-Agüera, J.A., Moreno-García, J., Martín-García, F.J., García-Martínez, T.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	181/186



**XXXIX Jornadas de Viticultura y Enología. Tierra de Barros. (Badajoz, España, 2017). Comunicación oral:** Estudio del fenotipo *Killer* de levaduras vínicas de la Denominación de Origen Montilla-Moriles. Martín-García, F.J., García-Martínez, T., **González-Jiménez, M.D.C.**, Martínez-García, R., Porrás-Agüera, J.A., Mauricio, J.C.

**XXXIX Jornadas de Viticultura y Enología. Tierra de Barros. (Badajoz, España, 2017). Comunicación oral:** Proteínas de autólisis y autofagia en una levadura de flor en la producción de vino espumoso. Porrás-Agüera, J.A., García-Martínez, T., **González-Jiménez, M.D.C.**, Martín-García, F.J., Moreno-García, J., Mauricio, J.C.

**V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. (Córdoba, España, 2016). Comunicación oral:** Proteínas relacionadas con diferentes grupos de compuestos volátiles de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* durante la segunda fermentación en botella en la elaboración de vinos espumosos. **González-Jiménez, M.D.C.**

**VII Jornadas de divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. (Córdoba, España, 2016). Comunicación oral:** Flocculation, adhesion and biofilm proteins in a wine yeast strain during cava elaboration. Porrás-Agüera, J.A., Moreno-García, J., **González-Jiménez, M.D.C.**, Martín-García, F.J., Mauricio, J.C., Moreno, J., García-Martínez, T.

#### B. Póster

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Póster:** Estudio comparativo de los procesos biológicos llevados a cabo al final de la fermentación alcohólica por dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. **González-Jiménez, M.D.C.**, Porrás-Agüera, J.A., Román-Camacho, J., Ogawa, M., Sánchez-León, I., Moreno-García, J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Póster:** Análisis comparativo de las proteínas relacionadas con la apoptosis en dos cepas de levadura industriales al final de la fermentación

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	182/186



alcohólica. Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Ogawa, M., Román-Camacho, J.J., Moreno-García, J., Martín-García, F.J., García-Martínez, T., Mauricio, J.C.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Póster:** ¿Comportamientos sociales en biofilms de levadura de flor? Evidencias de apoptosis en el proteoma de la levadura de flor. Moreno-García, J., Ogawa, M., Martín-García, F.J., **González-Jiménez, M.D.C.**, Porrás-Agüera, J.A., Sánchez-León, I., García-Martínez, T., Mauricio, J.C.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Póster:** Selección de levaduras osmotolerantes y resistentes al SO<sub>2</sub> como estrategia de lucha contra el cambio climático. Martín-García, F.J., Palacios-Fernández, S., López de Lerma-Extremera, N., Martínez-García, R., **González-Jiménez, M.D.C.**, García-Mauricio, J.C., Peinado-Amores, R.A.

**I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía. (Madrid, España, 2019). Póster:** Gluconic acid metabolism of flor yeast: Screening of intracellular metabolites. Ogawa, M., Moreno-García, J., Moreno, J., Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Martín-García, F.J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**VII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. (Cádiz, España, 2018). Póster:** Análisis comparativo de proteínas de pared en dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en fase estacionaria de crecimiento. Porrás-Agüera, J.A., **González-Jiménez, M.D.C.**, Moreno-García, J., Mauricio, J.C., Moreno, J., García-Martínez, T.

**XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica, GIENOL. (Ciudad Real, España, 2018). Póster:** Procesos biológicos más representativos en dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el tiraje de vinos espumosos. **González-Jiménez, M.D.C.**, Porrás-Agüera, J.A., Moreno-García, J., Peinado, R., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, FEMS. (Valencia, España, 2017). Póster:** Amino acid metabolism during the second fermentation in the elaboration of cava by two *Saccharomyces cerevisiae* wine strains: a first proteomic approach.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	183/186





**González-Jiménez, M.D.C.**, Moreno-García, J., Porras-Agüera, J.A., Capdevila, F., Puig-Pujol, A., Moreno, J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

**XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica, GIENOL. (Tarragona, España, 2015). Póster:** Metabolismo de aminoácidos después de la segunda fermentación en la producción de cava. **González-Jiménez, M.D.C.**, Moreno-García, J., Capdevila, F., Puig-Pujol, A., Moreno, J., Mauricio, J.C., García-Martínez, T.

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	184/186



Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	185/186



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
21/12/2020 00:52
2020086579

Código Seguro de Verificación	USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM	Fecha	21/12/2020 00:52:18
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	MARIA DEL CARMEN GONZALEZ JIMENEZ		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM">http://sede.uco.es/verifirma/code/USAFWJ4Z5EV7E4AAKEINIFTQIM</a>	Página	186/186

