

Diversidad genómica y potencial acidificante de *L. thermotolerans*.

Implicaciones de los abordajes ómicos.

Javier Vicente

javievic@ucm.es



Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

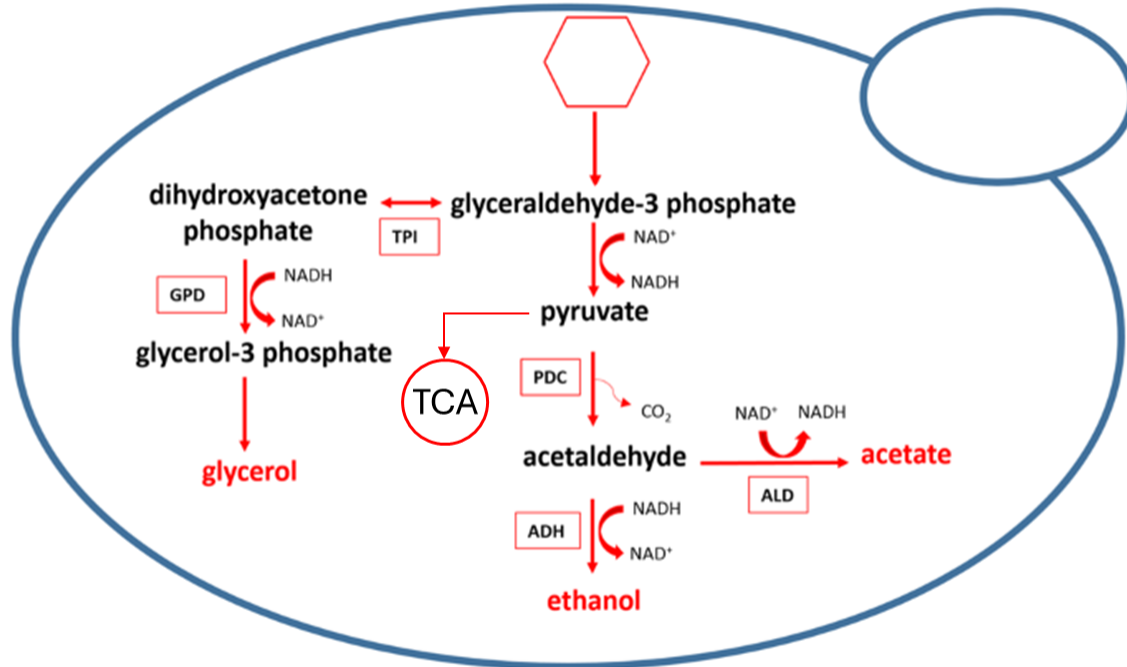
Fermentación alcohólica, proceso liderado por levaduras

Metabolismo fermentativo en levaduras

Se produce etanol a partir de piruvato para regenerar cofactores redox

Las especies implicadas han sufrido importantes procesos de adaptación, como *S. cerevisiae*

Lo que ha repercutido en sus características genéticas y fenotípicas

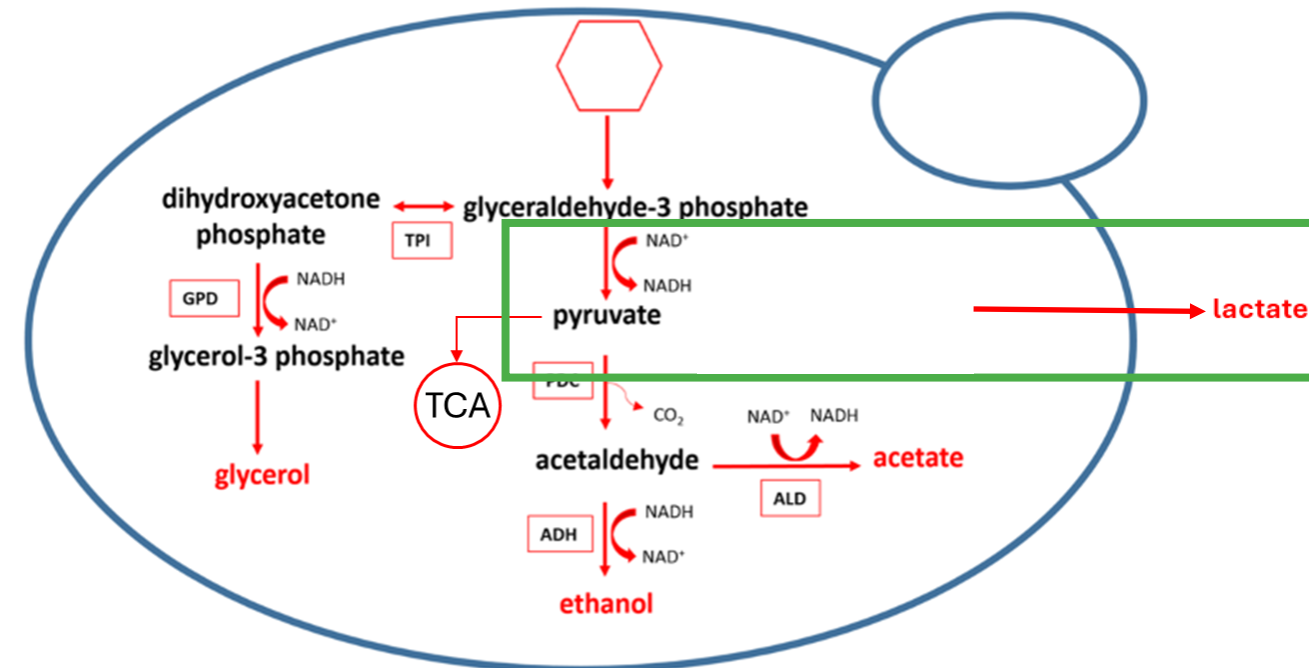


Metabolismo fermentativo en *L. thermotolerans*

Produce ácido láctico (hasta 9 g/L) a partir de piruvato en condiciones fermentativas

Ruta alternativa para la regeneración de cofactores redox, además de la producción de etanol

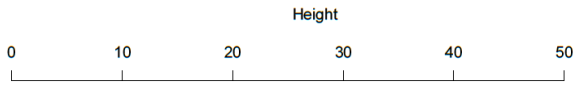
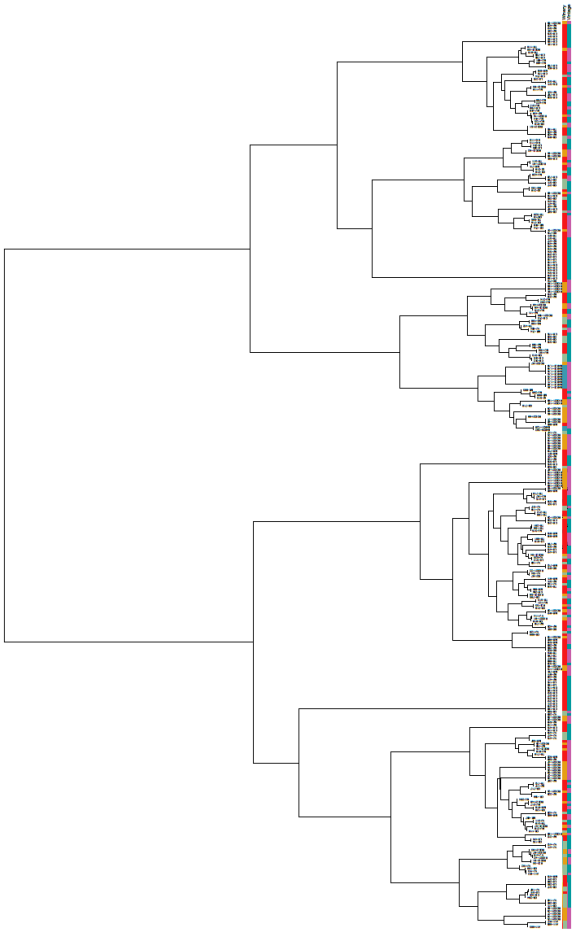
Permite disminuir el pH hasta 0,5 unidades, a la vez que disminuye el grado alcohólico



Selección de cepas de *L. thermotolerans* y establecimiento de una colección

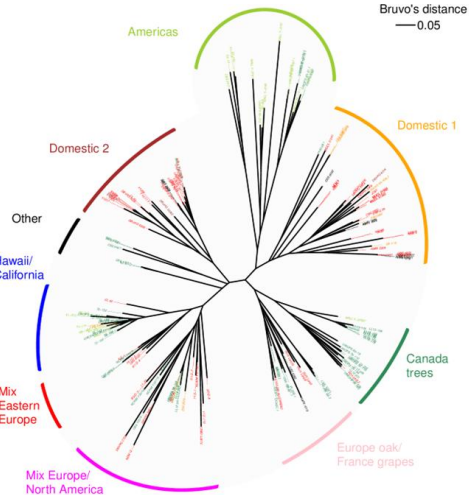
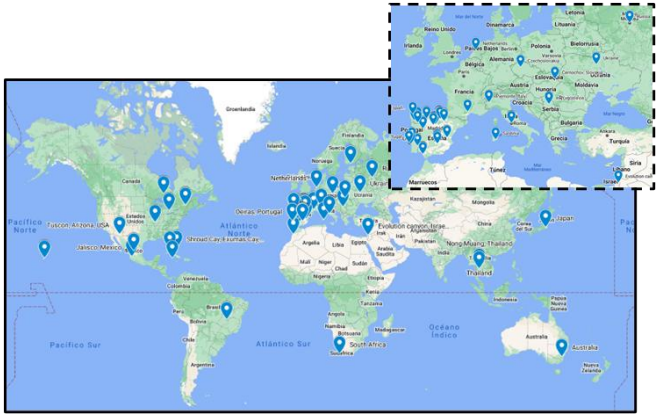
PROCESO DE SELECCIÓN DE CEPAS

- 4 bodegas, 2 vendimias
- 190 genotipos entre 429 aislados de *L. thermotolerans*

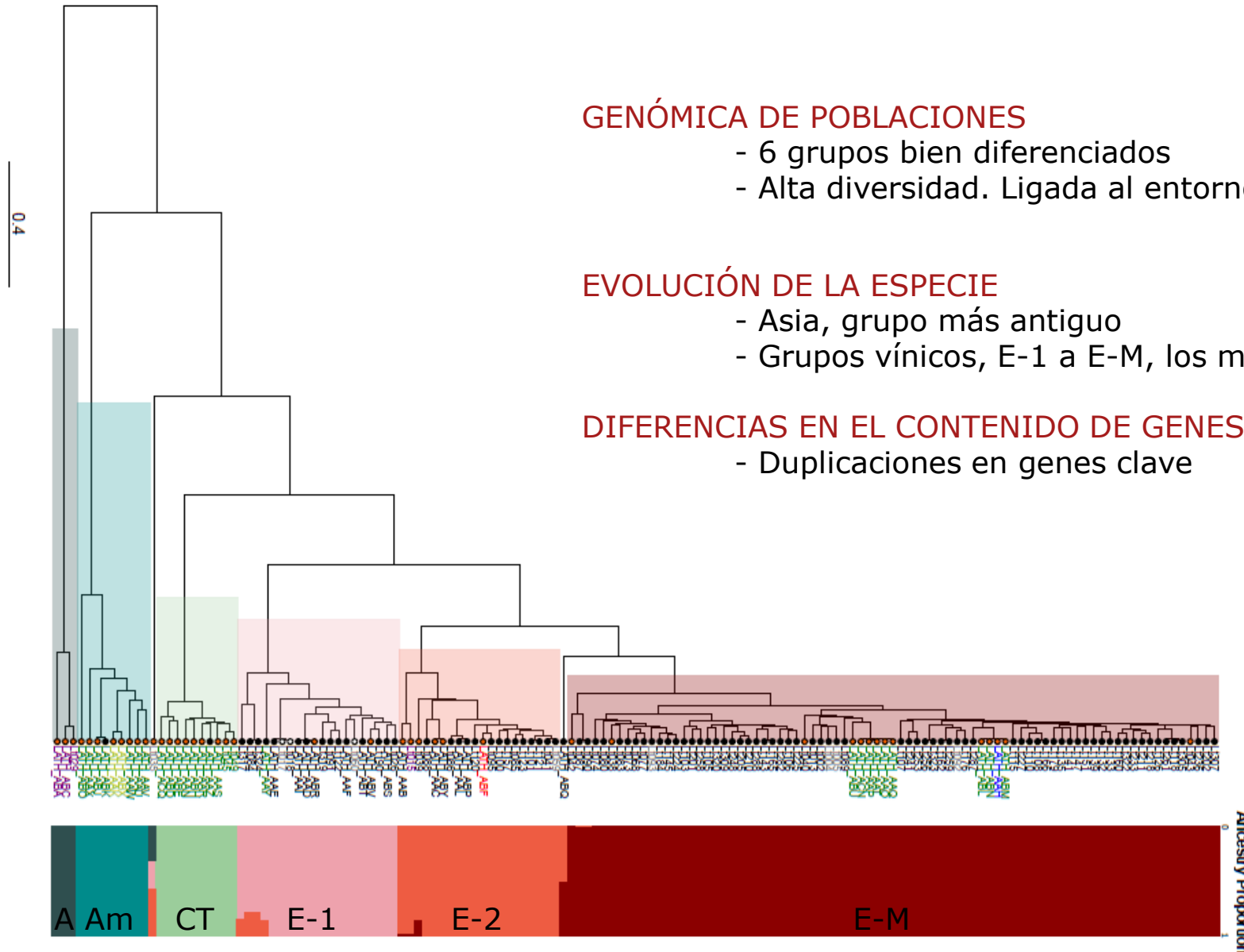


COLECCIÓN DE TRABAJO

- 145 cepas procedentes de colecciones públicas y privadas y aislamientos propios
- Amplia representación geográfica y ecológica
- 60 cepas empleadas en trabajos anteriores (Freel *et al.*, 2014; Hranilovic *et al.*, 2017, 2018)



Hranilovic *et al.*, 2017



GENÓMICA DE POBLACIONES

- 6 grupos bien diferenciados
- Alta diversidad. Ligada al entorno enológico

EVOLUCIÓN DE LA ESPECIE

- Asia, grupo más antiguo
- Grupos vínicos, E-1 a E-M, los más recientes

DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE GENES

- Duplicaciones en genes clave



DAL5
PUG1/RTA1
MAL31

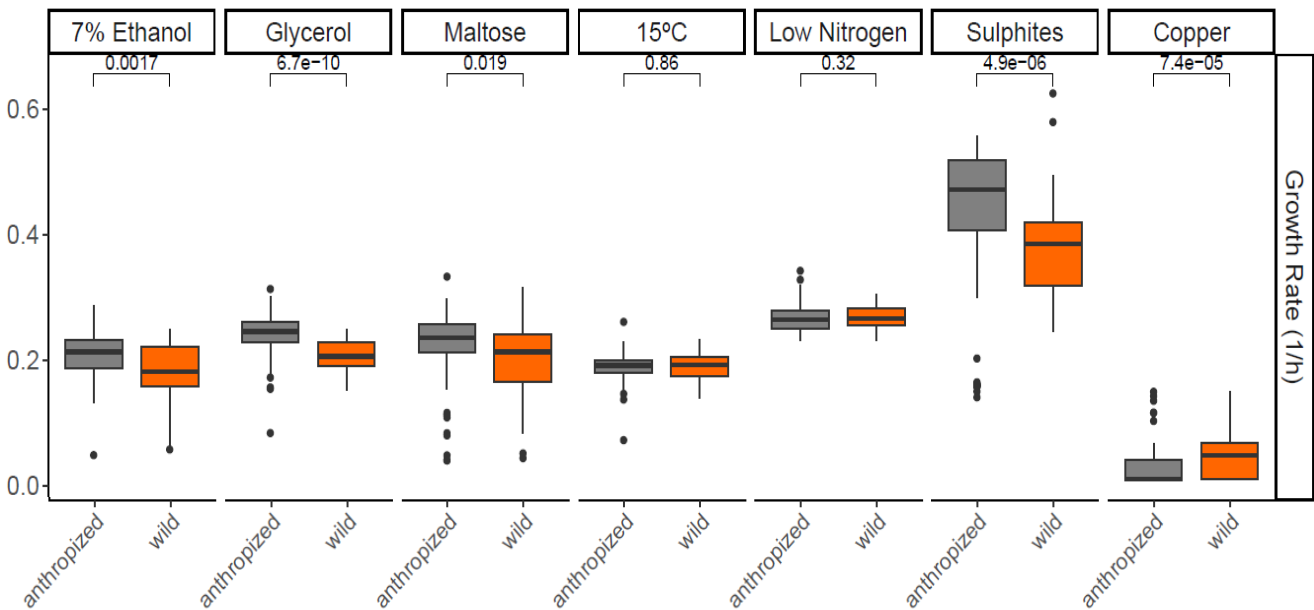
EVOLUCIÓN DE LA ESPECIE LIGADA AL ENTORNO VÍNICO

El entorno vínico ha definido la evolución de la especie

Caracterización fenotípica

FENOTIPADO DE ALTO RENDIMIENTO

(11 condiciones fermentativas, 14 asimilación de fuentes alternativas C/N)

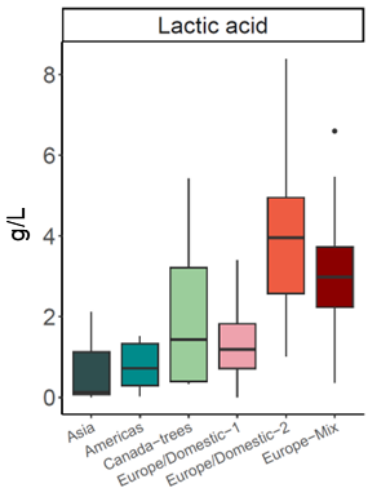


CEPAS DE ORIGEN VÍNICO

- Mejor crecimiento bajo déficit de nitrógeno (*DAL5*; *PUG1/RTA1*)
- Mejor asimilación de maltosa (*MAL31*)
- Resistencia a estresores (etanol y sulfitos)
- Mayor flujo de carbono (asimilación de glicerol)

APTITUD ENOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS

- Menor contenido de azúcares residuales (fructosa)
- Mayor producción de ác. láctico



EVOLUCIÓN DE LA ESPECIE LIGADA AL ENTORNO VÍNICO

El entorno vínico ha definido la evolución de la especie

Existen caracteres de las cepas ligados al contenido de genes

Pero otros caracteres se escapan de esta explicación...

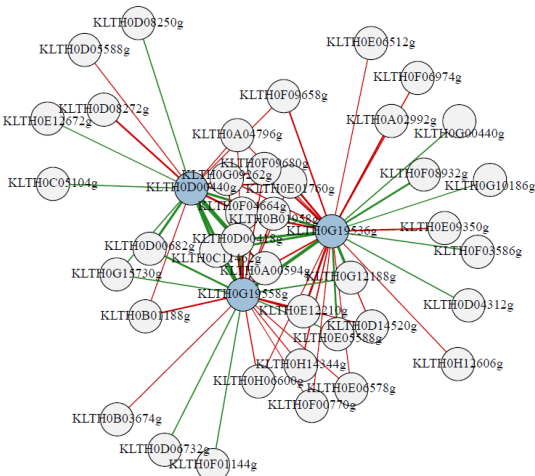
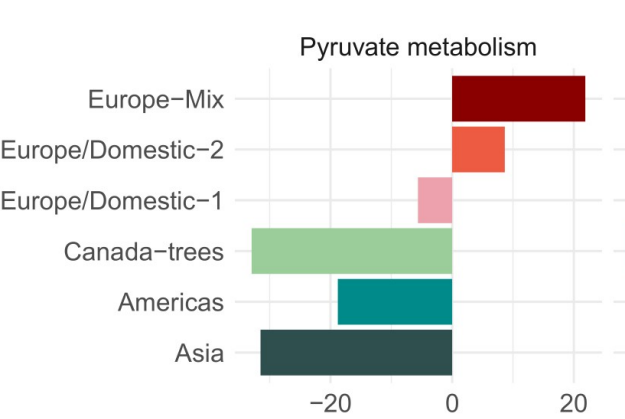
Respuesta transcripcional a la condición fermentativa

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

- Diferencias en genes relacionados con:
 - Metabolismo del carbono: *LDH*, *PDC1* y *PDC5*
 - Metabolismo del nitrógeno: *MUP1* y *OPT1*

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON EL ÁCIDO LÁCTICO

- Correlación positiva: ferm. alcohólica, metabolismo del nitrógeno, y transportadores

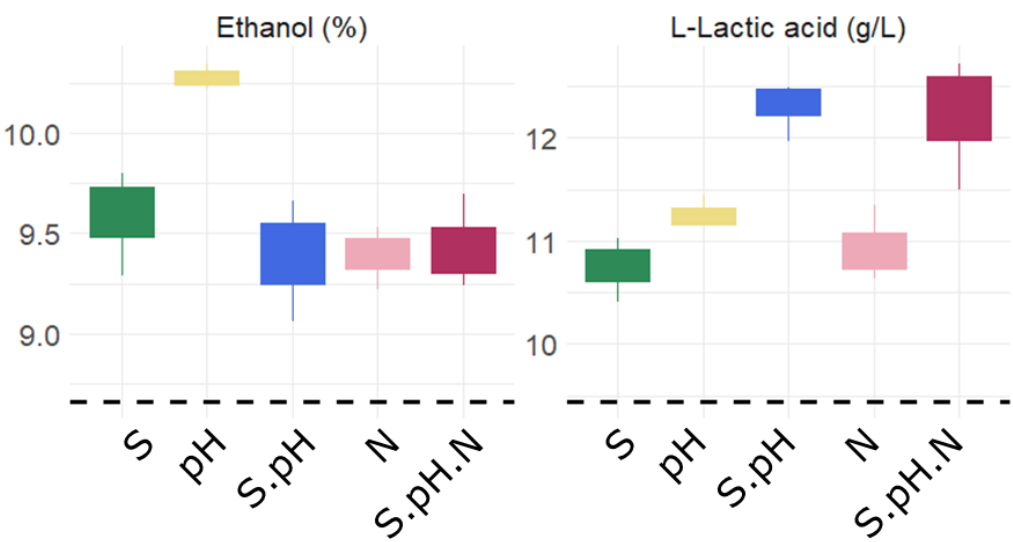


EFFECTO DE LOS FACTORES FISICOQUÍMICOS

- Modificamos:
- Azúcares fermentables: 180 - 240 g/L
 - pH: 3,3 - 3,8
 - Nitrógeno org./inorg.: 140/60 - 60/140 mg/L

- Alteración^o de:
 - Metabolismo del carbono: *LDH2*, *PDC5*
 - Metabolismo del nitrógeno: *GLN1*, *PUT1*, *DUR1/2*
 - Biosíntesis de vitaminas

- Afectan a la composición fisicoquímica final



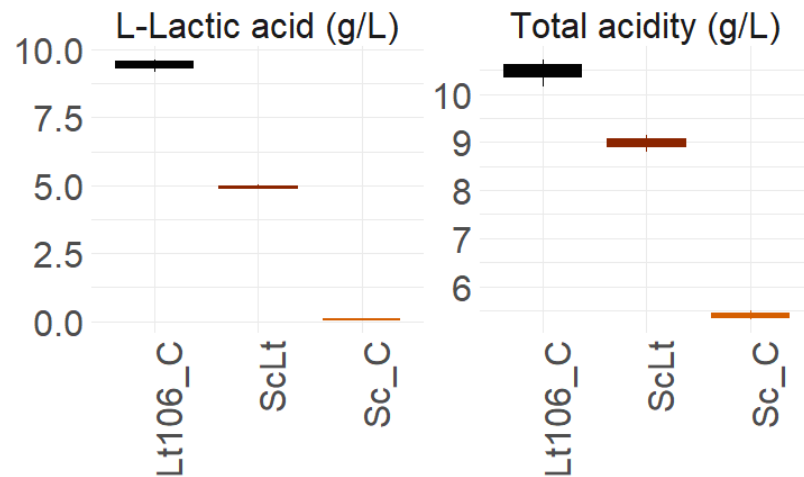
Interacción *L. thermotolerans* - *S. cerevisiae* / *S. pombe* en fermentaciones mixtas

RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A LA COINOCULACIÓN

- Fermentaciones coinculadas: *L. thermotolerans* (10^6) - *S. cerevisiae* / *S. pombe* (10^5)
- Mosto sintético

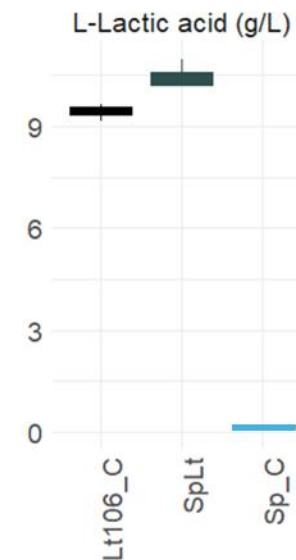
S. cerevisiae

- *L. thermotolerans* responde a la presencia de *S. cerevisiae*:
 - activando rutas del metabolismo del nitrógeno y vitaminas
- *S. cerevisiae* en presencia de *L. thermotolerans*:
 - reduce el estrés por aminoácidos
- Desde el punto de vista de la composición:
 - disminuye la capacidad de acidificación



S. pombe

- *L. thermotolerans* atenúa el metabolismo del nitrógeno
- *S. pombe*:
 - Activa rutas de respuesta a estrés
 - Incrementa la glucólisis y el metabolismo del nitrógeno
- Desde el punto de vista de la composición:
 - aumenta la producción de ácido láctico
 - se consume ácido málico
 - aumenta la acidez total



Implicaciones de la diversidad intraespecífica en la selección de cepas de *L. thermotolerans* para su aplicación industrial

DETERMINACIÓN DEL PERFIL FERMENTATIVO EN CONDICIONES ESTANDARIZADAS

- Cepas comerciales de *L. thermotolerans*
- Cepas seleccionadas de *L. thermotolerans*



Parámetros fermentativos Control de la acidez

Valor medio	Etanol (% v/v)	Azúcares residuales (g/L)
Cepas comerciales	7,22	80,43
Cepas seleccionadas	7,84	70,81

Nuevos parámetros de interés

Consumo de ác. málico
13 – 23 %
Producción de ác. succínico
0,55 – 0,59 g/L

NUEVAS CEPAS COMERCIALES

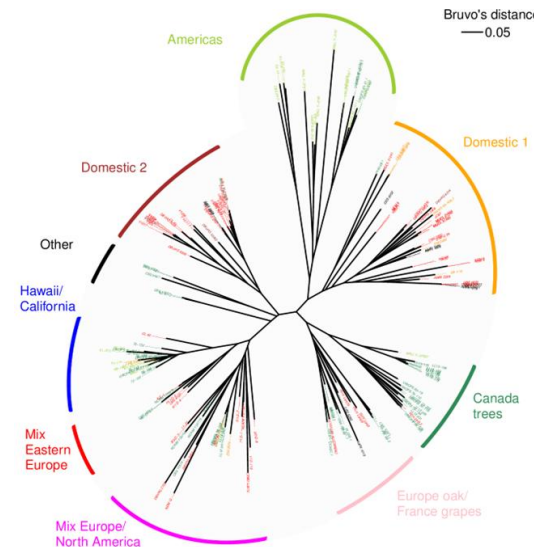


Conclusiones

- Las cepas enológicas están mejor **adaptadas** a la fermentación.
- Existe una **alta** diversidad genética y funcional dentro de la especie, clave para su **aplicación industrial**.
- Esta variabilidad determina la **capacidad de acidificación**, por lo que la **selección** de cepas es esencial.
- Los nuevos abordajes basados genómica comparativa **aseguran un mayor rendimiento industrial**.
- Las **interacciones entre levaduras** implican diferentes estrategias de respuesta al estrés.
- El **nitrógeno y las vitaminas** son clave para el éxito de las estrategias de bioacidificación.



Condiciones fisicoquímicas



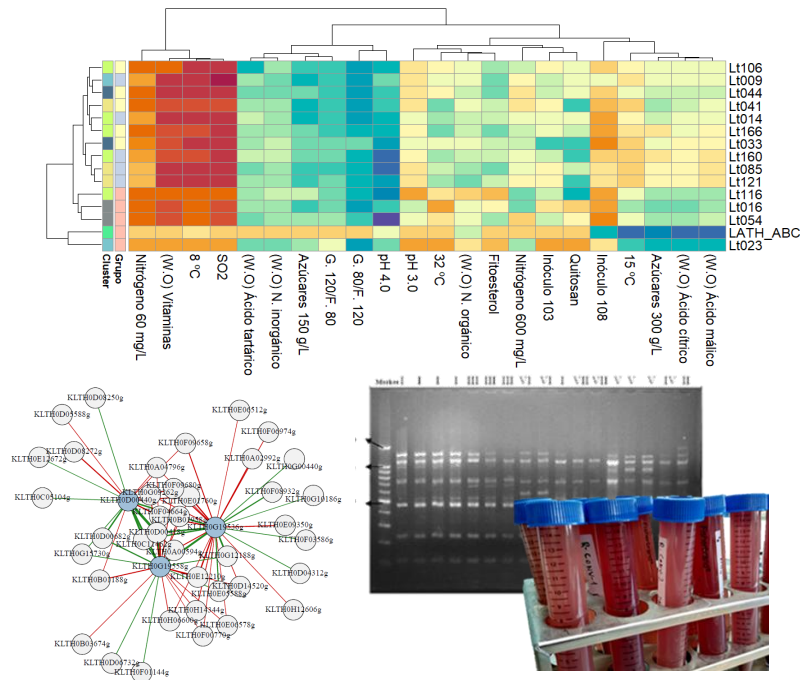
Diversidad intraespecífica



Técnicas de fermentación

¿Qué proponemos?

- Selección de cepas y validación en bodega
- Optimización de estrategias de inoculación
- Análisis de las necesidades nutricionales específicas
- Desarrollo de técnicas moleculares para el seguimiento/control de cepas
- Caracterización de antimicrobianos alternativos



¿Qué obtiene la empresa?

- Acceso a cepas completamente caracterizadas
→ Y compatibilidad en fermentaciones mixtas
- Ventaja competitiva en un contexto de cambio climático
→ Adaptación a la viticultura del futuro
- Innovación diferenciadora en el mercado
→ Fermentaciones más sostenibles
- Posibilidad de exclusividad en desarrollos
→ Reducción de aditivos enológicos
→ Nutrición a la carta



Muchas gracias

COLABORADORES



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Schacherer Lab



UMR OENO

FINANCIACIÓN



PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA



MIL SETENTAY SEIS