

Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Titulación
Grado en Enología

**Levaduras transgénicas para elaboración de
vino. Revisión bibliográfica**

Alumna: Elena Martín Oyagüe

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

Julio de 2020

ÍNDICE

Pág.

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LA LEVADURA VÍNICA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
6. LEVADURAS TRANSGÉNICAS PARA ELABORACIÓN DE VINO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
6.1. CARACTERÍSTICAS DESEABLES DE LA LEVADURA VÍNICA.....	9
6.2. APLICACIONES DE LAS LEVADURAS TRANSGÉNICAS EN LA ELABORACIÓN DE VINO.....	11
6.2.1. MEJORA EN EL RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN.....	11
6.2.2. MEJORA EN LA CALIDAD SENSORIAL	12
6.2.3. MEJORA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LOS ORGANISMOS QUE DETERIORAN EL VINO	15
6.2.4. MEJORA EN LOS PROCESOS.....	17
6.2.5. MEJORA EN LAS PROPIEDADES QUE AFECTAN A LA SALUD HUMANA	18
6.3. LEGISLACIÓN APLICABLE	21
7. CONCLUSIÓN.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA.....	22

1. RESUMEN

Las modernas prácticas de vinificación y la necesidad de adaptarse a nuevos mercados derivan en muchas ocasiones en la búsqueda de cepas de levadura cada vez más especializadas para la fermentación, con propiedades enológicas muy bien definidas. Los avances en las técnicas de ADN recombinante han hecho posible modificar propiedades existentes o introducir nuevas propiedades en cepas industriales de levadura.

Durante los últimos años se han obtenido diversas levaduras vínicas transgénicas con interés para mejorar o desarrollar nuevas condiciones de vinificación, y esto se traduce en un control del proceso y de la producción más preciso. Se pueden seleccionar y desarrollar cepas que modifiquen ciertas características del sabor y aromáticas del vino; mejorar determinadas propiedades de la fermentación, como el desarrollo simultáneo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica; o propiedades tecnológicas como la actividad proteolítica y la capacidad de floculación de la levadura. Por último, se han desarrollado cepas que permiten seleccionar las características deseadas de los metabolitos producidos durante la fermentación alcohólica, muchos de ellos con implicación para la salud.

En esta revisión bibliográfica se hace un análisis de las principales áreas de aplicación de la ingeniería genética sobre levaduras que intervienen en la elaboración de vino en la obtención de características deseables para mejorar las tecnologías y calidad en la vinificación, concretamente con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, principales responsables de la fermentación.

Finalmente, se recopila el conocimiento actual y los avances logrados en la obtención de levaduras transgénicas para vinificación, y los aspectos legales que afectan a la utilización industrial de dichas levaduras.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, ingeniería genética, recombinante, vino

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LA LEVADURA VÍNICA *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene un genoma haploide de 13.5 Mb, contenidas en 16 cromosomas en tamaños que van de 230 a 2,350 Kb, y un ADN mitocondrial de 80 kb, así como una serie de elementos extracromosómicos que se detallan en la Tabla 1. El genoma presenta un sesgo moderado en su composición nucleotídica (frecuencia en el uso de un determinado codón para la codificación de un determinado aminoácido) con un contenido promedio de 39% G+C (González y Valenzuela, s.f).

Tabla 1: Material genético de *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente: elaboración propia

	TIPO HERENCIA	ACIDO NUCLEICO	LOCALIZACIÓN	CANTIDAD RELATIVA	NUMERO DE COPIAS	TAMAÑO (Kb)
Cromosomas	Mendeliana	Doble cadena ADN	Núcleo	80%	16 pares cromosomas	230-2350
Plásmido 2 µm	No Mendeliana	Doble cadena ADN	Núcleo	5%	60-100	6318
Transposones	No Mendeliana		Núcleo			
ADN mitocondrial	No Mendeliana	Doble cadena ADN	Citoplasma	15%	8-130	75-85
ARN	No Mendeliana	Doble cadena ARN	Citoplasma			4600
Priones	No Mendeliana		Citoplasma			

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* está completamente secuenciado, y de dicha secuencia se han deducido las siguientes características de cada uno de los elementos genómicos:

DNA cromosómico: contiene más de 6000 ORFs (*Open Reading Frames* o marcos de lectura abierta), es decir, secuencias de ADN que potencialmente codifican para una proteína aunque se desconoce su función biológica; tiene un promedio de un gen cada 2 kb, y un contenido del 39-41 por ciento en guanina y citosina; es mucho más compacto que el genoma de otras células eucariotas debido a que las zonas intergénicas son pequeñas y tiene pocos intrones (Carro, 2003); el 72 % de la secuencia corresponde a secuencias codificantes, con un tamaño promedio de sus genes de 1,45 Kb, o 486 codones (González y Valenzuela, s.f).

De los 16 cromosomas, el cromosoma mayor, cromosoma XII, es el más variable ya que contiene el ADN ribosómico (región con un alto e indeterminado grado de repetición). Su tamaño estándar oscila entre las 1,2 y 2,2 Mb (Carro, 2003).

Plásmido 2 µm: su función biológica está por descubrir, ya que no codifica funciones fenotípicas aparte de su propia replicación, que es independiente del DNA nuclear.

Doble cadena ARN: se trata de dos moléculas lineales de doble cadena de ARN (controladas por genes del núcleo) llamadas M y L, con un tamaño de 1,3-2 Kb y 4,5 Kb respectivamente.

M codifica para dos tipos de proteínas: una toxina de naturaleza glicoprotéica llamada toxina *killer*, y un factor inmunitario. L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas. Algunas cepas de levaduras son inmunes a estas toxinas, pero no producen la toxina. Estas cepas, llamadas neutras, contienen los genomas L y M, pero el genoma M codifica solamente para la producción del factor inmunitario y no para la producción de la toxina (Esther y Jiménez 2007).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas *killer*, que se han denominado K1, K2, K3, K28 y K3GR1 según la agresividad de éstas (K1 el de mayor agresividad). Las cepas *killer* poseen la ventaja ecológica de poder desplazar a otras, pero organolépticamente el factor *killer* no aporta ningún valor añadido al producto final (Sos y Ralstonia, 2003).

La toxina segregada por las cepas *killer* actúa sobre la pared y membranas celulares de las cepas sensibles, alterando el potencial electroquímico de la membrana y causándoles la muerte. La mayoría de las cepas *killer* de *S. cerevisiae* pertenecen a las clases K1 y K2, las cuales matan una a la otra, aunque son inmunes a su propia toxina (Esther y Jiménez 2007).

Elementos priónicos: los priones son proteínas cuya secuencia de aminoácidos no determina una sola conformación o estructura terciaria. Pueden adoptar distintas conformaciones en distintas condiciones, y contienen información en dicha conformación de manera análoga a los genes. Dicha información es heredable, y puede transmitirse, replicarse y expresarse en forma de algún fenotipo (Cacace, 2011).

La mayoría de los priones de levadura son de tipo amiloide, que es un polímero lineal de una sola especie de proteína, con una estructura en gran parte de lámina beta en la cual las cadenas beta son perpendiculares al eje largo del filamento. Sorprendentemente, una sola proteína priónica puede ser la base de cualquiera de las muchas variantes diferentes de priones que difieren genética y biológicamente (Wickner *et al.*, 2013).

ADN mitocondrial: las mitocondrias poseen su propio sistema genético y su propia maquinaria de síntesis de proteínas. *Saccharomyces cerevisiae* tiene uno de los mayores ADN mitocondriales de cualquier organismo; sin embargo, su genoma es rico en adenintimina, y lleva la información genética de sólo unos pocos componentes mitocondriales esenciales; ni siquiera codifica para la mayoría de las enzimas involucradas en la generación de ATP durante el crecimiento aeróbico (Pretorius, 2000).

El genoma mitocondrial también está implicado en funciones celulares distintas del metabolismo respiratorio. Levaduras con diferentes ADN mitocondriales podrían diferir en sus características de floculación, metabolismo lipídico, mayor producción de alcohol y formación de compuestos de sabor (Walker 1998).

Transposones: son elementos genéticos capaces de moverse por el genoma cambiando de localización y causando mutaciones (Caruz, 2009) y que varían en número y posición en las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se sabe que el genoma de la levadura alberga cinco familias de transposones, denominadas *Ty1* a *Ty5*. Frecuentemente están integrados en la zona adyacente al promotor de un gen de ARNt (Pérez, 1997). Su importancia se debe a que pueden ser utilizados como vectores en ingeniería genética.

2.2. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS

La tecnología del ADN recombinante es el conjunto de técnicas que permiten el aislamiento, la clonación en vectores, la amplificación, la manipulación y la caracterización de genes o fragmentos específicos de ADN. Estas técnicas permiten la obtención *in vitro* de un ADN híbrido o ADN recombinante mediante la combinación de ADN de diferentes orígenes y su transferencia a sistemas celulares apropiados para su replicación o clonación. Las células u organismos que reciben estas combinaciones génicas pasan a ser células u organismos transgénicos (Benito y Espino, 2013).

La transformación es el proceso mediante el cual determinadas moléculas de ADN exógeno pueden ser introducidas en una célula. La adquisición de este ADN resulta en un cambio heredable (González y Valenzuela, s.f).

Para poder transformar un organismo se requieren protocolos que destruyan (al menos parcialmente) la pared celular y permeabilicen la membrana, de tal forma que se puedan introducir fragmentos del ADN. En la Tabla 2 se recogen las estrategias de destrucción más habituales en ingeniería genética.

Tabla 2. Estrategias de destrucción de la pared celular. Fuente: elaboración propia

ESTRATEGIA	COMENTARIOS
Obtención de esferoplastos	Células con la pared parcialmente degradada mediante métodos enzimáticos, lo que aumenta su permeabilidad al ADN exógeno. Es necesario después un tiempo de regeneración de la pared en un medio de estabilización isotónico (González, 2008).
Electroporación	Aplicación de descargas eléctricas de alta intensidad que generan poros sobre la superficie celular facilitando la entrada de ADN exógeno (González, 2008)
Utilización de acetato de litio y PEG (propilenglicol)	Incubación de las células con acetato de litio y PEG, previamente a un shock térmico.
Biolística	Se cubren micropartículas, generalmente de oro, con el ADN a introducir y se disparan estas micropartículas contra la célula.

Se requieren además vehículos o vectores que se puedan replicar establemente o recombinarse con el ADN cromosómico dentro del organismo. Como se ha dicho anteriormente, en *Saccharomyces cerevisiae* existe un plásmido natural de 2 μ m, que constituye la base para la construcción de distintos vectores de clonaje. Esta construcción debe estar organizada para que el gen foráneo se exprese en *Saccharomyces cerevisiae*, por tanto, se habrá de dotar de todos los elementos de regulación de la expresión génica en levaduras: secuencias promotoras, secuencias activadoras, secuencias terminadoras, etc (Rivas *et al.*, 2001).

La mayoría de los vectores actualmente utilizados para la clonación de genes de interés en levaduras se conocen como “plásmidos lanzadera” (González, 2008).

Un plásmido lanzadera está compuesto por dos orígenes de replicación (ORI), uno propio de *E. coli* y otro de *Saccharomyces cerevisiae*; dos marcadores de selección (válidos en *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente) que pueden ser de complementación de auxotrofia o de resistencia a antibióticos, y un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés: *Multiple Cloning Site*), lugar donde se va a introducir el gen que se quiere expresar. El MCS está delimitado por un promotor fuerte y regulable que controla la expresión del gen (Montero Arratibel y Bermejo Benito 2017)

Como el proceso de transformación tiene una baja eficiencia, se deben seleccionar posteriormente aquellas levaduras que hayan incorporado el vector. Para ello se utiliza el gen marcador, que permitirá que sólo se reproduzcan en un medio selectivo de incubación aquellas levaduras que incorporan el vector (Rivas *et al.*, 2001). Son genes que confieren resistencia a antibióticos (en el ejemplo de la Figura 1, el gen de la resistencia a la ampicilina: amp^R para *E. coli* y el gen que determina la síntesis de un aminoácido o nucleótido (URA3, LEU2).

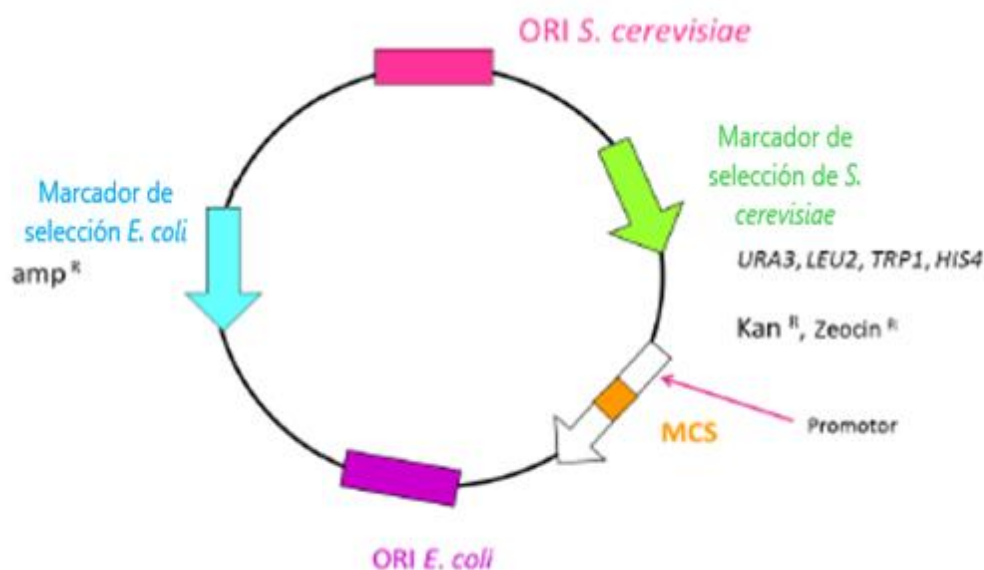


Figura 1: Representación gráfica de los elementos genéticos que constituyen un plásmido lanzadera (Montero Arratibel y Bermejo Benito 2017).

Los genes marcadores prototróficos son probablemente los marcadores de selección más utilizados. Suelen derivarse de las vías de biosíntesis de los aminoácidos (por ejemplo, LEU2, TRP1, que son elementos de las rutas biosintéticas de los aminoácidos leucina y triptófano respectivamente) o de los nucleótidos base (por ejemplo, URA3 codifica la proteína que participa en la biosíntesis de uracilo) y requieren la disponibilidad de una cepa huésped auxotrófica que contenga una versión no funcional o una supresión del gen correspondiente. Además de utilizar genes endógenos, también es posible complementar las auxotrofías de *S. cerevisiae* con genes heterólogos (Michener y Smolke, 2014).

Si la cepa del huésped no contiene el alelo mutante apropiado necesario para el uso de un marcador prototrófico o de autoselección, como suele ser el caso de las cepas industriales, es necesario emplear un marcador dominante. La mayoría de los marcadores dominantes confieren resistencia a diversos compuestos inhibidores del crecimiento o tóxicos (Michener y Smolke, 2014), entre los cuales, los más habituales son el marcador CUP1 que confiere resistencia al cobre y cadmio y el marcador SFA1, de resistencia al formaldehído.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido también la mejora de las cepas de levaduras industriales mediante técnicas de ingeniería metabólica. Esta técnica consiste en la modificación o introducción de nuevas capacidades bioquímicas para la mejora específica de propiedades celulares mediante la tecnología del ADN recombinante. En primer lugar, se analiza el metabolismo celular con el fin de identificar las rutas metabólicas más prometedoras cuya alteración podría conferir a la cepa de levadura modificada alguna característica de interés industrial, y en segundo lugar se identifica el tipo de modificación genética más apropiado para obtener el fenotipo deseado (Sani, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Como consecuencia de los escenarios cambiantes en el mercado global del vino, las bodegas se ven obligadas a optimizar y mejorar los procesos de producción, así como a innovar e incrementar la diversidad y variabilidad de sus vinos, dotándolos de una mayor calidad, reproducible e invariable, o incluso introducir nuevas características y propiedades favorables (Uber García, 2007)

La biotecnología cobra aquí una gran importancia para la mejora de la calidad del vino, pudiendo aplicarse no sólo para modificar las características de las levaduras vínicas sino también en la vid, si bien los mayores avances en investigación de los últimos años tienen que ver con el empleo de levaduras recombinantes (Vertedor *et al.*, 2013).

Así, al comienzo de los años noventa, dos grupos de investigación de diferentes laboratorios (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia y la Universidad de Stellenbosch en Sudáfrica) publicaron los primeros trabajos en los que se desarrollaron las primeras levaduras vínicas transgénicas. Diez años después, Isak S. Pretorius, del Institute for Wine Biotechnology, Universidad de Stellenbosch, en Sudáfrica publicó el artículo "Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking" donde se resumía el avance en los estudios de levaduras vínicas recombinantes desde el comienzo de su desarrollo.

Posteriormente, en 2006, desde el Centro de Biología de la Universidade do Minho en Portugal, se publicó el artículo "The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry" donde se analizaron los progresos relacionados con las implicaciones del uso de cepas GM (Genéticamente Modificadas) en la industria enológica.

Más recientemente, en el año 2013, la tesis doctoral presentada en la Universidad Politécnica de Valencia: "Evolución genómica por diseño molecular de levaduras industriales", incluye una descripción de los principales objetivos de mejora genética de las levaduras industriales utilizadas para la producción de vino, cerveza y pan, e incluye una actualización en el avance de los estudios de levaduras vínicas recombinantes.

Como puede verse, existen varios hitos bibliográficos en relación con la transformación de levaduras vínicas. Merece la pena realizar una puesta al día de las aportaciones realizadas en los últimos años en este campo, sin olvidar mencionar algunos trabajos que abrieron camino en el desarrollo de levaduras modificadas genéticamente. La actualización puede dar una idea global de la tendencia en los objetivos de mejora de levaduras a lo largo de la última década.

4. OBJETIVOS

Como objetivo general se revisará y se sintetizará la principal información existente en el desarrollo de levaduras vínicas recombinantes de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

De esta revisión se derivarán los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar las principales áreas de aplicación de la ingeniería genética de la principal levadura implicada en la producción de vino, *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Conocer el estado actual y la tendencia de las investigaciones y su aplicación a las características potencialmente mejorables en el proceso de elaboración de vino

Por último, se describirán los aspectos legales que afectan a la utilización industrial de dichas levaduras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este TFG se revisaron artículos publicados en revistas especializadas de viticultura y enología y revistas de microbiología; también se revisaron trabajos académicos (tesis doctorales y trabajos de fin de grado) relacionados con levaduras transgénicas; por último, se utilizaron libros de texto de microbiología y publicaciones de instituciones dedicadas a la investigación científica y técnica, para completar la descripción de los principales procesos referidos.

Para ello, se utilizaron distintos buscadores de información científica y académica como Google Scholar, Dialnet, Scopus, Wos, Springer, Elsevier y ScienceDirect; páginas web de instituciones dedicadas a la investigación como el CSIC; finalmente se consultaron libros electrónicos a través de los paquetes suscritos por la biblioteca de la UVA, en concreto libros de microbiología de la editorial médica Panamericana. Otra fuente de información se encontró en los repositorios de los documentos generados por la Comunidad Universitaria de las universidades españolas donde se cursa el grado en enología, concretamente con la consulta de la bibliografía de tesis y trabajos de fin de grado con la misma temática.

Se utilizaron como base dos publicaciones: la revisión publicada en 2006 por Schuller y Casal, del Centro de Biología de la Universidade do Minho en Portugal y titulada "The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry", y la tesis presentada en la Universidad Politécnica de Valencia: "Evolución genómica por diseño molecular de levaduras industriales" (Sani, 2013), realizándose una búsqueda de artículos a partir de las referencias bibliográficas de dichos trabajos. Se seleccionaron los artículos que presentaban estudios de mejora genética en la levadura de vinificación *Saccharomyces cerevisiae*.

La búsqueda y selección de los restantes artículos científicos citados en este trabajo se realizó utilizando las bases de datos indicadas anteriormente, mediante la introducción de las palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, vino, ingeniería genética, sobreexpresión, con restricción de fecha desde 2013 a 2020, en los idiomas español e inglés. Se revisaron los resúmenes y las conclusiones, y de los artículos que se citan, se revisó el artículo completo.

Para la redacción del texto se ha seguido el documento “Para empezar a entendernos”, las “Normas de estilo y formato para Trabajo Fin de Grado Enología” y las Recomendaciones e índice para TFG en la modalidad “revisión bibliográfica”, ambos documentos publicados por el Comité del título de Enología de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia.

6. LEVADURAS TRANSGÉNICAS PARA ELABORACIÓN DE VINO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

6.1. CARACTERÍSTICAS DESEABLES DE LA LEVADURA VÍNICA

El uso de levaduras seleccionadas que se inoculan en los mostos para iniciar y conducir la fermentación alcohólica imponiéndose al resto de levaduras presentes, junto con el mayor conocimiento molecular de algunas rutas bioquímicas de interés biotecnológico y el desarrollo de técnicas de transformación, ha permitido hacer ingeniería genética de la levadura vínica (Gil, 2001).

La clonación y la transformación genética ofrecen la posibilidad de alterar las características de las levaduras vínicas con precisión quirúrgica: la modificación de una propiedad existente, la introducción de una nueva característica sin afectar negativamente a otras propiedades deseables o la eliminación de un rasgo no deseado. Utilizando estos procedimientos, es posible construir nuevas cepas de levadura vínica que difieren de la original sólo en pequeñas características específicas (Pretorius, 2000).

Existen muchas características potencialmente mejorables orientadas a optimizar aspectos de la fermentación, los procesos industriales o la calidad sensorial utilizando técnicas de ingeniería genética (Pretorius, 2000). Las principales áreas de aplicación de la ingeniería genética de levaduras productoras de vino en la obtención de características deseables para mejorar las tecnologías y calidad en la vinificación se muestran en la tabla 3.

La importancia de estas características adicionales de la levadura difiere según el tipo de vino que se vaya a elaborar, la región productora con sus respectivas variedades de uva (Pretorius, 2017) y los requisitos técnicos de la bodega. Por ello la Tabla 3 es una lista abierta, actualizable con otros rasgos, de acuerdo con el objetivo definido por la bodega.

Tabla 3: Áreas de aplicación de la ingeniería genética en la levadura vínica. Fuente: elaboración propia

AREA DE APLICACIÓN	CARACTERISTICA DESEABLE
Mejora en el rendimiento de la fermentación	Tolerancia de la levadura al estrés osmótico debido a la alta concentración de azúcar en los mostos Tolerancia de la levadura a la limitación de nutrientes Utilización de fructosa por la levadura Tolerancia de la levadura a temperaturas altas o bajas de fermentación Mejora de la cinética de asimilación de nitrógeno en fermentación Tolerancia de la levadura a la presencia de agentes fitosanitarios
Mejora en la calidad sensorial	Enzimas liberadoras de aromas Enriquecimiento en manoproteínas Ajuste de la acidez Reducción en la formación de ácido sulfhídrico Reducción del contenido en etanol Reducción en la producción de ácido acético
Mejora en el control biológico de los organismos que deterioran el vino	Expresión de la toxina <i>killer</i> Producción de enzimas antimicrobianas Biocontrol de <i>Brettanomyces/ Dekkera bruxellensis</i>
Mejora en los procesos	Despectinización Crianza sobre lías Clarificación Filtración Desacidificación biológica
Mejora en las propiedades que afectan a la salud	Baja producción de aminas biógenas Eliminación de etil carbamato Reducción del contenido en etanol Incremento de resveratrol Incremento de hidroxitirosol Incremento de folato

Todas estas características susceptibles de mejora pueden implicar el manejo de uno o más genes. Se están realizando estudios para la introducción de uno o varios genes exógenos en las levaduras a utilizar como cultivos iniciadores, analizando su imposición en el medio, si se produce la expresión de dichas características a lo largo del proceso fermentativo y, por tanto, el efecto que esta mejora tiene sobre el producto final. Esto permite que los genes se expresen en el momento adecuado del proceso de elaboración. Para la mejora de los procesos fermentativos se han desarrollado levaduras recombinantes en las que se han insertado genes exógenos provenientes de bacterias lácticas, mohos y otras levaduras (Vertedor *et al.*, 2013).

6.2. APLICACIONES DE LAS LEVADURAS TRANSGÉNICAS EN LA ELABORACIÓN DE VINO

Las técnicas de manipulación genética en levadura tienen como objetivo, principalmente:

- Expresión de un gen de una determinada enzima procedente de la misma especie o de otro organismo diferente en *Saccharomyces cerevisiae*: se libera la síntesis enzimática de un control metabólico particular o se somete a uno nuevo (Pretorius, 2000).
- Sobreexpresión de genes de la propia levadura: el gen se activa para elaborar mayor cantidad de copias de ARN y proteínas.
- Atenuación de la expresión o silenciamiento de la expresión génica: eliminación de características no deseables en la levadura.
- Deleción: eliminación de un fragmento de ADN y de sus correspondientes funciones.

Como se indica en la Tabla 3, existen diferentes áreas de aplicación de la ingeniería genética de levaduras productoras de vino para obtener características deseables respecto a la calidad de los vinos y mejora de las tecnologías. Dichas áreas se desarrollan a continuación.

6.2.1. MEJORA EN EL RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

La producción de vino es un proceso complejo, tanto desde el punto de vista microbiológico como bioquímico, en el que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* desempeña un papel central.

El entorno en el que se desarrolla la levadura es cambiante: al comienzo de la vinificación, las células de levadura se ven afectadas por el estrés osmótico debido a la alta concentración de azúcar en los mostos (Jiménez-Martí *et al.*, 2009). A medida que avanza la fermentación, otras condiciones de estrés adquieren relevancia, como la limitación de nutrientes (especialmente el agotamiento del nitrógeno, el carbono y las vitaminas). Algunos autores (Pérez-Torrado *et al.*, 2002) han estudiado los genes de la levadura que dan lugar a mayor viabilidad de la levadura en condiciones de carencia de fuentes de carbono, o la mejora de la cinética de asimilación del nitrógeno durante la fermentación (Salmon y Barre, 1998). Otra condición de importancia crítica para el mantenimiento de una alta tasa de fermentación al final de la fermentación alcohólica lo constituye la utilización de fructosa por la levadura. La fructosa se convierte en el principal azúcar presente durante las últimas etapas de la fermentación alcohólica, y las levaduras de vino tienen que fermentar este azúcar después de largos períodos de inanición y en presencia de grandes cantidades de etanol, lo que puede provocar fermentaciones lentas o estancadas. Los trabajos de (Guillaume *et al.*, 2007) se centran en la mejora de la utilización de la fructosa a través de la expresión del gen transportador de hexosa HXT3. Por último, pueden producirse condiciones de estrés relacionadas con temperaturas excesivamente altas o bajas de fermentación (Cardona *et al.*, 2007),

Para la adaptación y supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* a todas estas condiciones, intervienen rutas metabólicas que se pueden mejorar a través del uso de levaduras transgénicas.

Una última característica deseable para la construcción de levaduras transgénicas lo constituye la resistencia a agentes fitosanitarios, que supone una mejora de la tolerancia de la levadura a mayores concentraciones de residuos en los mostos (Pretorius, 2000). En 1985 varias cepas de levadura utilizadas en la industria cervecera se transformaron utilizando un plásmido que porta el gen dominante para la resistencia al cobre, CUP1 (Henderson *et al.*, 1985).

En la Tabla 4 se describen los principales trabajos de ingeniería genética de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar el rendimiento de la fermentación.

Tabla 4: Principales modificaciones genéticas en *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar el rendimiento de la fermentación. Fuente: elaboración propia

CARACTERÍSTICA DESEABLE	COMENTARIOS	REFERENCIA
Tolerancia al estrés osmótico debido a la alta concentración de azúcar en los mostos	Modificación de la expresión de los genes HSP26 y YHR087W, que mejoran la resistencia al estrés y el rendimiento fermentativo.	(Jiménez-Martí <i>et al.</i> , 2009)
Tolerancia a la limitación de Nutrientes	Sobreproducción de glucógeno mediante la sobreexpresión del gen GSY2, que da lugar a mayor viabilidad de la levadura en condiciones de carencia de fuentes de carbono.	(Pérez-Torrado <i>et al.</i> , 2002)
Utilización de fructosa por la levadura	Expresión del gen transportador de hexosa HXT3 que produce aumento en la utilización de fructosa durante la fermentación.	(Guillaume <i>et al.</i> , 2007)
Tolerancia a temperaturas altas o bajas durante la fermentación	Autoinducción de la expresión del gen MSN2, que desempeña un papel importante en la respuesta al estrés de la levadura. Las células son capaces de realizar vinificaciones a 15 y 30 °C, con mayores tasas de fermentación respecto a la cepa control.	(Cardona <i>et al.</i> , 2007)
Mejora de la cinética de asimilación del nitrógeno durante la fermentación.	Eliminación de la represión de la vía de asimilación de prolina y arginina mediante mutación del gen represor de esta vía, URE2.	(Salmon y Barre, 1998)
Tolerancia de la levadura a la presencia de agentes fitosanitarios	Introducción de genes dominantes para la resistencia al cobre (CUP1) en levadura de cerveza.	(Henderson <i>et al.</i> , 1985)

El uso de levaduras transgénicas para mejorar el rendimiento de la fermentación puede ser útil para evitar refermentaciones provocadas por paradas en la fermentación, que conllevan un mayor coste en personal, tiempo y productos enológicos, además de un deterioro de la calidad del vino por la formación de sulfuro de hidrógeno y pérdida de aromas.

6.2.2. MEJORA EN LA CALIDAD SENSORIAL

El aroma es una de las propiedades organolépticas más valorada a la hora de definir la calidad de un vino, pero también una de las más complejas y difíciles de caracterizar, puesto que no es atribuible a un solo compuesto de impacto sino que es el resultado de la interacción de cientos de compuestos de distintos orígenes y diversa

naturaleza química, siendo la variedad de uva utilizada como materia prima, la cepa vínica predominante durante la fermentación alcohólica y la forma de almacenamiento los principales factores de los que depende (Uber García, 2007)

Las glicosidasas, enzimas implicadas en la liberación de terpenos y otros compuestos volátiles, y las alcoholacetiltransferasas, enzimas responsables de la producción de ésteres de acetato, han sido objetivo para la construcción de levaduras vínicas recombinantes. En la actualidad se dispone de levaduras transgénicas que secretan de forma eficiente estas enzimas (Manzanares y Orejas, 2008). También los tioles volátiles, en particular 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) y acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) contribuyen fuertemente al aroma varietal de vinos Sauvignon Blanc (Lilly *et al.*, 2006) y Verdejo. Los trabajos de (Swiegers *et al.*, 2007) se basan en la clonación y sobreexpresión del gen de *Escherichia coli* tnaA, que codifica una triptofanasa con una fuerte actividad cisteína-β-liasa, en una cepa de levadura de vino comercial, consiguiéndose hasta 25 veces más 4MMP y 3MH en el modelo que en la cepa huésped de control.

En el vino el diacetilo, un importante compuesto odorífero, es un subproducto sintetizado durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Su concentración en el vino está influenciada por muchos factores, incluyendo el pH, la concentración de citrato, la temperatura, la concentración de dióxido de azufre y el grado de aireación durante la elaboración. El diacetilo produce un sabor a mantequilla no deseado cuando su contenido es mayor de 10 mg/l, por lo que la disminución de la producción de este compuesto lograda mediante cepas de levadura manipuladas podría ser útil para el desarrollo de nuevas cepas industriales mediante la sobreexpresión de los genes BDH1 y BDH2 en *Saccharomyces uvarum* (Li *et al.*, 2017).

En la Tabla 5 se describen los principales trabajos de ingeniería genética de *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en la calidad aromática.

Tabla 5: Principales modificaciones genéticas introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en la calidad aromática. Fuente: elaboración propia

COMPUESTO LIBERADO	COMENTARIOS	REFERENCIA
Terpenos	Expresión del gen de <i>Trichoderma longibrachiarum</i> que codifica endoglucanasas (egl1) en <i>S.cerevisiae</i> para mejora del aroma varietal de un vino blanco.	(Gonzalez <i>et al.</i> , 1993)
	Expresión del gen de <i>Aspergillus niger</i> que codifica la α-L-arabinofuranosidasa (abfB) en <i>S. cerevisiae</i> para liberación de terpenos durante la vinificación.	(Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1996)
	Expresión del gen de <i>Candida molischiana</i> que codifica la β-glucosidasa (bglN) en <i>S. cerevisiae</i> para liberación de terpenos durante la vinificación.	(Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1998)
	Expresión del gen de <i>Aspergillus nidulans</i> que codifica endoxilanasas (xlnA) en <i>S. cerevisiae</i> para liberación de precursores de aromas no volátiles.	(Ganga <i>et al.</i> , 1999)
	Expresión del gen de <i>Aspergillus aculeatus</i> que codifica ramnosidasa A (rhaA) en <i>S. cerevisiae</i> para liberación de linalool.	(Visser <i>et al.</i> , 2003)
	Expresión del gen de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca) que codifica geraniol-sintasa (GES) en <i>S. cerevisiae</i> para producción de monoterpenos en vino.	(Pardo <i>et al.</i> 2015)
Alcoholes primarios	Sobreexpresión del gen BAT2 para la producción de mayor cantidad de acetato de isoamilo en el vino.	(Yoshimoto <i>et al.</i> , 2002)

Ésteres de acetato	Sobreexpresión del gen ATF1 para la producción de mayor cantidad de ésteres de acetato y tioles en el vino.	(Lilly <i>et al.</i> , 2006)
Tioles	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen que codifica actividad cisteína β -liasa de <i>E. coli</i> , <i>tnaA</i> , para la liberación de aromas tiólicos.	(Swiegers <i>et al.</i> , 2007)
Diacetilo	Sobreexpresión de los genes BDH1 y BDH2 en <i>Saccharomyces uvarum</i> para reducir la producción de diacetilo en vino.	(Li <i>et al.</i> , 2017)

Los preparados enzimáticos utilizados en las bodegas, tanto para incrementar la fracción aromática como para facilitar el desfangado, carecen en muchos casos de especificidad, y pueden tener efecto contaminante formando compuestos no deseados como los fenoles volátiles, además de elevar el coste de la producción de vino. El uso de levaduras mejoradas genéticamente para sobreexpresar genes implicados en actividades enzimáticas deseadas puede constituir una solución a estos inconvenientes.

Se puede intervenir en otras características que aportan mejora sensorial, como el enriquecimiento en manoproteínas, el ajuste de la acidez, la reducción de la formación de sulfhídrico, la reducción del contenido en etanol y la baja producción de ácido acético durante la fermentación.

El enriquecimiento en manoproteínas del vino a través de su superproducción por parte de las levaduras, supone una ventaja sobre el empleo de técnicas como la crianza sobre lías o el menor uso de aditivos enológicos. A las manoproteínas se les atribuyen diversas propiedades en enología, entre las que destacan su capacidad de evitar o minimizar algunas alteraciones que afectan negativamente a su calidad, reduciendo su valor comercial. En el trabajo de (González, 2008), la construcción de cepas de levaduras vínicas delecionadas en los genes KNR4, GP17, FKS1 y GAS1 se mostró como un método efectivo para una mayor liberación de polisacáridos y manoproteínas al vino.

En cuanto al ajuste de la acidez, en 1994 se construyó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa el gen que codifica la L(+) lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei*. La cepa recombinante puede realizar una fermentación ácido láctica-alcohólica mixta. Dichas cepas pueden usarse en todos los campos donde se requieren tanto la acidificación biológica como la fermentación alcohólica (Dequin *et al.*, 1999), evitándose así la adición de ácidos al mosto.

Los compuestos de azufre producen importantes contribuciones al sabor y olor del vino. El sulfuroso (SO_2), por ejemplo, actúa como un antioxidante que ralentiza el desarrollo de los peligros oxidativos y el envejecimiento de sabores. En contraste, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) tiene un aroma a huevos podridos y es también un precursor de otros compuestos con indeseable características sensoriales. La formación de SO_2 y H_2S es muy compleja y está altamente regulada como parte de la biosíntesis de la metionina y la cisteína. Se puede aplicar la ingeniería genética en la búsqueda de nuevos mecanismos de regulación de *S. cerevisiae* para la producción de SO_2 y H_2S mediante la sobreexpresión de genes STR que regulan el equilibrio de la biosíntesis de metionina y cisteína (Yoshida *et al.*, 2011).

Bajo condiciones estándar de vinificación, el exceso de azúcar en el mosto, junto con otros cambios en su composición relacionados con el calentamiento climático, se traduce en problemas de fermentación y un alto contenido de alcohol en los vinos finales, que puede comprometer la calidad del producto al exacerbar la percepción de algunas características de la sensación en boca como el calor y la viscosidad. El objetivo de construir cepas de levadura de vino que muestren un *Crabtree* aliviado (en presencia de cantidades de glucosa relativamente bajas, aún en presencia de cantidades suficientes de oxígeno, gran parte del azúcar consumido por la levadura se destina a la producción de etanol mediante la vía fermentativa) como forma de mejorar la reducción del contenido de etanol por la respiración fue desarrollado por (Curiel *et al.* 2016) mediante la delección en los genes HXK2, PYK1, REG1, PDE2 y PDC.

La utilización de levaduras modificadas mediante ingeniería genética para la superproducción de glicerol o la disminución del contenido en etanol produce un aumento en el contenido en ácido acético durante la elaboración. Mediante la supresión del gen ALD6, que tiene un papel en la oxidación del acetaldehído a ácido acético, se obtienen vinos con menor concentración en ácido acético (Eglinton *et al.*, 2002). Muy recientemente se ha generado una cepa de levadura de vino utilizando la técnica de edición CRISPR/Cas9, con el fin de combinar fenotipos de mayor producción de éster y glicerol sin producir aumento del contenido en ácido acético (van Wyk *et al.*, 2020).

En la Tabla 6 se describen las principales modificaciones introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en la calidad sensorial.

Tabla 6: Principales modificaciones genéticas introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en la calidad sensorial. Fuente: elaboración propia

CARACTERÍSTICA DESEABLE	COMENTARIOS	REFERENCIA
Enriquecimiento en manoproteínas	Delección en los genes KNR4, GP17, FKS1 y GAS1 para una mayor liberación de polisacáridos y manoproteínas al vino.	(González, 2008)
Ajuste de la acidez	Expresión del gen que codifica la L(+) lactato deshidrogenasa de <i>Lactobacillus casei</i> en <i>S. cerevisiae</i> para realizar fermentación ácido láctica-alcohólica mixta.	(Dequin <i>et al.</i> , 1999)
Reducción en la formación de sulfhídrico	Sobreexpresión de genes STR que regulan el equilibrio de la biosíntesis de metionina y cisteína.	(Yoshida <i>et al.</i> , 2011)
Reducción del contenido en etanol	Delección en los genes HXK2, PYK1, REG1, PDE2 y PDC, que reduce el contenido en etanol del vino sin producirse aumento de la acidez volátil.	(Curiel <i>et al.</i> 2016)
Reducción del contenido en ácido acético	Supresión del gen ALD6, que tiene un papel en la oxidación del acetaldehído a ácido acético.	(Eglinton <i>et al.</i> , 2002)

6.2.3. MEJORA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LOS ORGANISMOS QUE DETERIORAN EL VINO

Como se indicó anteriormente, las cepas *killer* poseen la ventaja ecológica de poder desplazar a otras cepas de levadura en la fermentación. La integración del gen *killer* K1 en dos cepas de levadura K2 genera cepas doble *killer* K1/K2 estables, con un espectro más amplio de destrucción y una ventaja competitiva sobre otras cepas sensibles al comienzo de la fermentación (Boone *et al.*, 1990).

Como medida de seguridad para controlar el crecimiento de contaminantes microbianos no deseados, se añaden a menudo conservantes químicos antes de la fermentación o en el producto final. Sin embargo, debido a los posibles riesgos para la salud asociados con ciertos productos químicos, hay una resistencia cada vez mayor de los consumidores al uso de conservantes químicos. Estas preocupaciones de los consumidores han estimulado una búsqueda mundial de conservantes seguros y de calidad alimentaria de origen biológico llamados bioconservadores (Schoeman *et al.*, 1999). En el caso de las fermentaciones de vino, se han desarrollado levaduras que expresan el gen de producción de leucocina (lca) de *Leuconostoc carnosum* en *S. cerevisiae* (du Toit y Pretorius, 2019); el gen de producción de glucosa oxidasa (gox) de *Aspergillus niger* en *S. cerevisiae* (Malherbe *et al.*, 2003); o el gen de producción de pediocina (pedA) de *Pediococcus acidilacti* en *S. cerevisiae* (Schoeman *et al.*, 1999), todos agentes antimicrobianos biológicamente activos en el mosto.

Otro de los contaminantes microbianos más comunes en las fermentaciones lo constituye la especie de levadura *Brettanomyces / Dekkera bruxellensis*. Esta especie de levadura puede producir compuestos fenólicos que confieren sabores desagradables al producto final. *Saccharomyces cerevisiae* segrega un biocida, llamado saccharomicina, compuesto por péptidos antimicrobianos (AMP) derivados de la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los niveles de saccharomicina secretada naturalmente por *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica no son suficientes para asegurar la muerte completa de *D. bruxellensis*; entonces se pueden construir cepas de *S. cerevisiae* genéticamente modificadas capaces de sobreproducir las AMPs derivadas de GAPDH y evaluar su potencial de biocontrol contra *D. bruxellensis* durante las fermentaciones alcohólicas (Branco *et al.*, 2019).

En la Tabla 7 se describen las principales modificaciones genéticas introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para el control biológico de los organismos que deterioran el vino.

Tabla 7: Principales modificaciones genéticas introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para el control biológico de los organismos que deterioran el vino. Fuente: elaboración propia

CARACTERÍSTICA DESEABLE	COMENTARIOS	REFERENCIA
Expresión toxina <i>killer</i>	Gen de la toxina K1 integrado en cepas de levadura K2 para proporcionar ventaja competitiva frente a cepas indígenas sensibles.	(Boone <i>et al.</i> , 1990)
Producción de enzimas antimicrobianas	Expresión del gen pedA de <i>Pediococcus acidilacti</i> en <i>S. cerevisiae</i> para producir pediocina, toxina biológicamente activa en el mosto.	(Schoeman <i>et al.</i> 1999)
	Expresión del gen lca de <i>Leuconostoc carnosum</i> en <i>S. cerevisiae</i> para producir leucocina, toxina biológicamente activa en el mosto.	(du Toit y Pretorius, 2019)
	Expresión del gen gox de <i>Aspergillus niger</i> en <i>S. cerevisiae</i> para producir glucosa oxidasa, toxina biológicamente activa en el mosto.	(Malherbe <i>et al.</i> , 2003)
Biocontrol de <i>Brettanomyces/ Dekkera bruxellensis</i>	Sobreexpresión del gen GAPDH para aumento producción saccharomicina en vino.	(Branco <i>et al.</i> , 2019)

La estrategia para evitar la proliferación de los organismos que deterioran el vino se basa en la higiene en bodega, el uso de uva sana y unas adecuadas prácticas enológicas como el control del pH y el uso de conservantes químicos (sulfuroso, dicarbonato de dimetilo, sorbato potásico...). El uso de conservantes tiene cada vez mayores limitaciones, por lo que la utilización de levaduras mejoradas genéticamente que produzcan bioconservadores puede suponer una alternativa adecuada.

6.2.4. MEJORA EN LOS PROCESOS

El mosto o el vino debe someterse a una serie de procesos durante su elaboración tales como despectinización, trasiego, crianza sobre lías, clarificación, filtración o desadicificación biológica. Estos procesos suponen unos costes elevados para las bodegas, que invierten en instalaciones, maquinaria y productos enológicos para obtener un producto de calidad. Por consiguiente, se ha trabajado mucho en la obtención de levaduras mejoradas que optimicen algunos de dichos procesos.

A continuación, se exponen las principales mejoras genéticas en las que se está trabajando para optimizar los distintos procesos:

Despectinización: un problema común que se puede encontrar en la industria del vino son las pectinas, que causan turbidez y viscosidad durante la extracción, la filtración, y la clarificación de los mostos. La mayoría de los preparados comerciales de pectinasa (enzima que degrada las pectinas) utilizados en la industria alimentaria derivan de *Aspergillus niger*, que es un hongo considerado GRAS (Generally Recognized as Safe). Una alternativa a su uso, que ya se está manejando, sería clonar y sobreexpresar los genes estructurales responsables de estas actividades enzimáticas, en este caso el gen PGU1, responsable de la actividad endogalacturonasa para la degradación de pectinas, con el fin de obtener una cepa de levadura de vino que facilite la clarificación del mosto y del vino durante la fermentación, lo que permitiría ahorrar costes (Fernández-González *et al.*, 2005).

Crianza sobre lías: la autólisis en condiciones enológicas es un proceso muy lento que lleva a largos períodos de envejecimiento, lo que implica el costoso almacenamiento de los vinos. Debido a que la muerte celular parece preceder a la autólisis durante la producción de vino espumoso, un posible método alternativo para acelerar este proceso es la construcción de cepas de levadura de vino que pierden rápidamente la viabilidad en la fase estacionaria o en condiciones de limitación de nutrientes. En el trabajo de (Tabera *et al.*, 2006) se explora la posibilidad de acelerar la pérdida de viabilidad de la levadura mediante supresión parcial o total del gen BCY1, involucrado en la respuesta positiva a la limitación de nutrientes.

Clarificación: la turbidez proteica inducida por el calor es también un problema común en los vinos blancos. Aunque el vino que contiene turbidez proteica es seguro para el consumo, no es atractivo y, por lo tanto, no es comercializable, por lo que se deben eliminar estas proteínas mediante absorción con bentonita. Entre el 5 y el 10% del volumen de vino tratado con bentonita puede perderse como lías de bentonita y, aunque puede recuperarse por filtración, el vino resultante no tiene la misma calidad. El vino contiene dos manoproteínas, HPF1 y HPF2, que ejercen un efecto protector sobre la turbidez producida por las proteínas. La sobreexpresión de los genes que expresan estas manoproteínas en *S. cerevisiae* se traduce en una mayor actividad protectora frente a la turbidez producida por proteínas (Brown *et al.*, 2007).

Filtración: en el proceso posterior a la fermentación del vino, las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* deben ser eliminadas por centrifugación o filtración, procesos que son costosos y consumen mucho tiempo. Alternativamente, la clarificación puede lograrse mediante el asentamiento natural de la levadura. Esta opción es viable sólo cuando las células se agregan, en el proceso llamado floculación. El comportamiento de floculación de las cepas de levadura puede ser estrictamente controlado y ajustado genéticamente para satisfacer los requisitos industriales específicos mediante la expresión controlada de los genes de floculación dominantes FLO1, FLO5 y FLO11 en *Saccharomyces cerevisiae* (Govender *et al.*, 2008).

Desacidificación biológica: las cepas comerciales de levadura de vino de *Saccharomyces cerevisiae* tienen poco o no tienen ningún efecto en la concentración final de ácido L-málico en los vinos, ya que son incapaces de degradar el ácido L-málico de forma efectiva. Por lo tanto, la desacidificación biológica de los vinos se obtiene tradicionalmente con la fermentación maloláctica bacteriana (FML), que reduce la acidez total del vino y también contribuye a su estabilidad microbiológica (van Staden *et al.*, 2017). La idea de expresar el gen que codifica el enzima málico en la levadura vínica ha sido un objetivo prioritario de la biotecnología enológica. Recientemente se ha conseguido una vía eficaz de degradación de ácido málico en *S. cerevisiae* mediante la construcción de cepas de laboratorio que, al expresar el gen de la L(+)-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei*, pueden llevar a cabo una fermentación mixta (lactoalcohólica) (Deák, 2002).

En la Tabla 8 se muestran los principales aspectos de los procesos de vinificación en los que se han incorporado mejoras genéticas en *Saccharomyces cerevisiae* para la modificación de algunos de sus procesos.

Tabla 8: Principales modificaciones genéticas introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora de los procesos de vinificación. Fuente: elaboración propia

PROCESO A MEJORAR	COMENTARIOS	REFERENCIA
Despectinización	Sobreexpresión del gen de la endopoligalacturonasa, <i>PGU1</i> , en la levadura de fermentación, que produce la degradación de pectinas.	(Fernández-González <i>et al.</i> 2005)
Crianza sobre lías	Delección parcial o total del gen BCY1 en <i>S. cerevisiae</i> , responsable de la viabilidad de la levadura en condiciones de limitación de nutrientes.	(Tabera <i>et al.</i> , 2006)
Clarificación	Sobreexpresión de los genes HPF1 y HPF2, que ejercen un efecto protector sobre la turbidez producida por las proteínas.	(Brown <i>et al.</i> , 2007)
Filtración	Expresión controlada de los genes de floculación dominantes FLO1, FLO5 y FLO11 en <i>S. cerevisiae</i> .	(Govender <i>et al.</i> , 2008)
Desacidificación biológica	Expresión del gen de la L(+)-lactato deshidrogenasa de <i>Lactobacillus casei</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	(Deák, 2002)

6.2.5. MEJORA EN LAS PROPIEDADES QUE AFECTAN A LA SALUD HUMANA

El vino contiene compuestos que pueden afectar a la salud humana, por lo que también se ha trabajado mucho en la mejora de levaduras que minimicen la acumulación de sustancias tóxicas (carbamato de etilo, alcohol, ...) o que incrementen

la presencia de compuestos beneficiosos para la salud, como el resveratrol. A continuación se revisan los principales aspectos en estudio en este campo.

El proceso de vinificación incluye múltiples etapas en las que puede producirse un deterioro microbiano, que alteran la calidad y el estado higiénico del vino y lo hacen inaceptable. Los principales organismos de descomposición incluyen especies y cepas de los géneros de levadura *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc; algunos géneros de bacterias BAL (Bacterias productoras de Ácido Láctico) como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y otros; y algunos géneros de bacterias BAA (Bacterias productoras de Ácido Acético) como *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Estos organismos de descomposición pueden afectar a la salud del consumidor al producir aminas biógenas y precursores del carbamato de etilo (du Toit y Pretorius 2000).

Para impedir la formación de **aminas biógenas** nocivas producidas por las bacterias del ácido láctico en el vino se construyó una cepa industrial genéticamente estable de *Saccharomyces cerevisiae*, llamada ML01, integrando un *cassette* lineal que contiene el gen de la permeabilidad del malato de *Schizosaccharomyces pombe* (mael) y el gen que codifica el enzima málico de *Oenococcus oeni* (mleA). Dicha cepa ML01 descarboxiló completamente 5,5 g/l de malato en un mosto de uva de la variedad Chardonnay durante la fermentación alcohólica. La levadura ML01 goza del estatus GRAS por la FDA (*US Food & Drug Administration*) y es la primera levadura genéticamente mejorada que se ha comercializado. Su aplicación impedirá la formación de aminas biógenas nocivas producidas por las bacterias del ácido láctico en el vino (Husnik *et al.*, 2006).

En cuanto al **carbamato de etilo**, durante la fermentación la arginina, uno de los principales aminoácidos de los mostos de uva, es metabolizada por la arginasa (codificada por CAR1) para convertirse en ornitina y urea. *Saccharomyces cerevisiae* no metaboliza completamente la urea, que es secretada por las células de levadura y reacciona espontáneamente con el etanol del vino para formar etilcarbamato, un agente potencialmente cancerígeno para los humanos. Mediante la expresión del gen DUR1, que regula el catabolismo de la urea en la fermentación (Coulon *et al.*, 2006) o la eliminación del gen CAR1 para bloquear la vía de producción de urea (Guo *et al.*, 2016) se puede reducir el contenido en etilcarbamato del vino.

También los vinos con un **alto grado alcohólico** pueden ser rechazados por algunos consumidores por motivos de salud o seguridad vial. El comercio internacional de tales vinos también podría verse obstaculizado por importantes aumentos de los impuestos, según los países involucrados (Curiel *et al.*, 2016), además de comprometer la calidad del producto como se ha indicado anteriormente. Su eliminación se lleva a cabo mediante procesos costosos como técnicas de evaporación, uso de membranas, centrifugación, etc. Varios autores han trabajado en la mejora genética en levaduras para disminuir el contenido en alcohol del vino, entre ellos (Heux *et al.*, 2006) mediante la expresión del gen que codifica NADH oxidasa de *Lactococcus lactis*, noxE, en *S. cerevisiae* para la redistribución metabólica de la fermentación, bajando la producción de etanol.

Sin embargo, también se pueden formar compuestos positivos con importancia para la salud durante la vinificación. Un ejemplo sería el **resveratrol**, un compuesto fenólico producido en las uvas que exhibe propiedades que pueden contribuir a la reducción de la incidencia de enfermedades coronarias y otros procesos relacionados con la salud humana. Se han utilizado cepas de levadura recombinantes que expresan el gen abfB

de *Aspergillus niger*, que codifica enzimas para aumentar el contenido de resveratrol en el vino blanco (González-Candelas *et al.*, 2000). Recientemente, se ha desarrollado una levadura en la que se sobreexpresó el gen que codifica la enzima resveratrol sintasa (RS) implicada en la producción de resveratrol en el vino (Song *et al.*, 2018).

Otro polifenol con un alto poder antioxidante y muchos beneficios asociados a la salud es el **hidroxitirosol**. Las levaduras vinícolas son capaces de producir grandes cantidades de tirosol, que es el precursor de la síntesis de hidroxitirosol. Se puede mejorar la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para producir la enzima que hidroxila el tirosol en hidroxitirosol mediante la sobreexpresión de los genes HpaB y HpaC (Muñiz-Calvo *et al.*, 2020).

Además de los compuestos fenólicos se encuentra otro compuesto positivo, el **folato**, también conocido como vitamina B9, molécula crítica en el metabolismo celular ya que actúa como cofactor en diversas reacciones biosintéticas. La vía biosintética del folato en la levadura está caracterizada en su mayor parte, y es similar a la de otros microorganismos. Consecuentemente se pueden aumentar los niveles de folato en el vino mediante la sobreexpresión de genes en esta vía, como el gen FOL2 (Walkey *et al.*, 2015).

En la Tabla 9 se describen los principales avances en ingeniería genética de *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en las propiedades que afectan a la salud humana.

Tabla 9: Avances en ingeniería genética de *Saccharomyces cerevisiae* para la mejora en las propiedades que afectan a la salud humana. Fuente: elaboración propia

CARACTERÍSTICA DESEABLE	COMENTARIOS	REFERENCIA
Baja producción de aminas biógenas	Sobreexpresión del gen que codifica la enzima maloláctica de <i>Oenococcus oeni</i> , mleA, en levadura vínica <i>S. cerevisiae</i> .	(Husnik <i>et al.</i> , 2006)
Eliminación etil-carbamato	Expresión del gen que metaboliza la urea durante la fermentación, DUR1, lo que reduce la formación de etilcarbamato.	(Coulon <i>et al.</i> 2006)
	Bloqueo de la formación de urea durante la fermentación mediante la supresión del gen CAR1 que metaboliza la arginasa en urea y ornitina.	(Guo <i>et al.</i> , 2016)
Reducción contenido etanol	Expresión del gen que codifica NADH oxidasa de <i>Lactococcus lactis</i> , noxE, en <i>S. cerevisiae</i> para la redistribución metabólica de la fermentación, bajando la producción de etanol.	(Heux <i>et al.</i> , 2006)
Incremento resveratrol	Expresión del gen abfB de <i>Aspergillus niger</i> en <i>S. cerevisiae</i> . Esta enzima es la responsable de la formación de resveratrol en el vino blanco.	(González-Candelas <i>et al.</i> , 2000)
	Sobreexpresión del gen RS, que produce la enzima resveratrol sintasa, lo que aumenta el contenido en resveratrol en el vino.	(Song <i>et al.</i> , 2018)
Incremento hidroxitirosol	Expresión de la enzima HpaBC de <i>Scherichia coli</i> en <i>S. cerevisiae</i> . Esta enzima es la responsable de la hidroxilación del tirosol en hidroxitirosol.	(Muñiz-Calvo <i>et al.</i> 2020)
Incremento folato	Sobreexpresión del gen FOL2, que regula la biosíntesis de formación del folato en el vino.	(Walkey <i>et al.</i> , 2015)

6.3. LEGISLACIÓN APLICABLE

La regulación de los Estados en materia de OGM (Organismos Modificados Genéticamente) viene marcada por la existencia de un convenio internacional: el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Tiene por objeto fijar unas normas básicas generales en el uso de los OGM que garantice la protección de la salud y el cuidado del medio ambiente, así como controlar los movimientos transfronterizos. Fue adoptado el 29 de enero de 2000 como un acuerdo suplementario del Convenio sobre la Diversidad Biológica y entró en vigor el 11 de septiembre de 2003. La Unión Europea, España y el resto de Estados Miembros son “Partes” del Protocolo, es decir, se han comprometido a cumplir jurídicamente sus disposiciones.

En cuanto a la normativa comunitaria, están regulados por la Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de marzo de 2001, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. La regulación sobre trazabilidad y etiquetado de OGM y de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos viene dada en los Reglamentos 1829/2003 y 1830/2003, del Parlamento Europeo y Consejo, y hace reposar en cada Estado Miembro el ejercicio de las diferentes potestades autorizadoras, inspectoras y de control sobre las distintas actividades derivadas del uso de los OGM.

En España, la Ley 9/2003 de 25 de abril establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. A su vez, son las Comunidades Autónomas quienes tienen la capacidad de desarrollar la legislación básica estatal teniendo la competencia en la concesión de autorizaciones, la vigilancia, el control y la imposición de sanciones.

Por su parte, la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) es la encargada de la regulación de las prácticas vitícolas y enológicas de todos los países miembros. La RESOLUCIÓN OIV-OENO 576A-2017 permite el uso de levaduras seleccionadas *Saccharomyces spp* para su siembra en uvas, mostos y vinos. Las levaduras utilizadas deberán haberse aislado de las uvas, mostos o vinos, obtenerse por hibridación de cepas procedentes de uvas, mostos o vinos, o derivar de otras levaduras enológicas.

A pesar de los años en que viene avanzando la ciencia en el mejoramiento de las levaduras enológicas, no fue hasta mayo del 2015 cuando se planteó desde la OIV el uso de OGM dentro del ámbito de la vitivinicultura. En aquel planteamiento se definieron tres ramas en donde podía aplicarse la tecnología del ADN recombinante: las plantas, en segundo lugar las levaduras y finalmente la obtención de enzimas provenientes de organismos genéticamente modificados. Cabe mencionar que en el año 2003, tanto Canadá como los Estados Unidos de Norteamérica, aceptaron el uso de estos microorganismos, dotándoles de una calificación dentro de la categoría GRAS (Sánchez, 2018).

7. CONCLUSIÓN

El uso de levaduras vínicas transgénicas, como se ha puesto de manifiesto a lo largo de este trabajo, puede suponer una ventaja tanto para la industria enológica como para el consumidor, ya que puede evitar o reducir el uso de costosos procesos en las bodegas, reducir o anular la necesidad de la adición de productos enológicos y conservantes químicos y contribuir a la mejora o el aumento en la producción de compuestos beneficiosos para la salud humana.

Es en este punto donde se han producido los mayores avances en el desarrollo de levaduras genéticamente modificadas durante la última década, tanto para aumentar la formación de compuestos antioxidantes y vitaminas en el vino como para la minimización en la formación de compuestos biológicos que afectan a la salud o lo deterioran, evitándose así el uso de conservantes que suponen, en muchos casos, un rechazo por parte del consumidor.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Benito Jiménez, César., Espino Nuño, Francisco Javier. *Genética. Conceptos esenciales*. Editorial Médica Panamericana.
- Boone, C., Sdicu, A.-M., Wagner, J., Degré, R., Sanchez, C., & Bussey, H. (1990). Integration of the Yeast K1 Killer Toxin Gene into the Genome of Marked Wine Yeasts and Its Effect on Vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 37–42. <https://www.ajevonline.org/content/41/1/37>
- Branco, P., Sabir, F., Diniz, M., Carvalho, L., Albergaria, H., & Prista, C. (2019). Biocontrol of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in alcoholic fermentations using saccharomycin-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3073–3083. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09657-7>
- Brown, S. L., Stockdale, V. J., Pettolino, F., Pocock, K. F., de Barros Lopes, M., Williams, P. J., Bacic, A., Fincher, G. B., Høj, P. B., & Waters, E. J. (2007). Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1363–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0606-0>
- Cacace, V. I. (2011). *Biology of Prions*. <http://arxiv.org/abs/1106.3533>
- Cardona, F., Carrasco, P., Pérez-Ortín, J. E., del Olmo, M. Í., & Aranda, A. (2007). A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.043>
- Carro, D. 2004. *Estudio de la inestabilidad cariotípica de levaduras vínicas* (Tesis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Caruz, A. (2009). Elementos transponibles en procariontes. *Biología Experimental, Área de Genética*, 1–15. http://www.ujaen.es/investiga/inmunoge/gmo/Diapositivas/Elementos_transponibles.pdf
- Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., van der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J., & van Vuuren, H. J. J. (2006). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Minimize the Production of Ethyl Carbamate in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 113–124. <https://www.ajevonline.org/content/57/2/113>

- Curiel, J. A., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Morales, P., Rodrigues, A. J., Quirós, M., & Gonzalez, R. (2016). Identification of target genes to control acetate yield during aerobic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0555-y>
- Deák, T. (2002). Application of molecular techniques in wine microbiology: A review. *Acta Alimentaria*, 31(1), 37–44. <https://doi.org/10.1556/AAlim.31.2002.1.4>
- Dequin, S., Baptista, E., & Barre, P. (1999). Acidification of Grape Musts by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Genetically Engineered to Produce Lactic Acid. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 45–50. <https://www.ajevonline.org/content/50/1/45>
- du Toit, M., & Pretorius, I. S. (2019). Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal -A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21(1), 74–96. <https://doi.org/10.21548/21-1-3559>
- Eglinton, J. M., Heinrich, A. J., Pollnitz, A. P., Langridge, P., Henschke, P. A., & De Barros Lopes E, M. (2002). Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast*, 19(4), 295–301. <https://doi.org/10.1002/yea.834>
- Esther, M., & Jiménez, R. (2007). *Análisis Genómico y Molecular de Levaduras Vínicas . Aplicación a la Mejora del Proceso de Fermentación de Vinos mediante Selección de Levaduras Autóctonas. Tesis Doctoral.*
- Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Cordero-Otero, R. R., Thanvanthri Gururajan, V., & Briones, A. I. (2005). Engineering of an oenological *Saccharomyces cerevisiae* strain with pectinolytic activity and its effect on wine. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.012>
- Ganga, M. A., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D., & Querol, A. (1999). Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3), 171–178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00202-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00202-5)
- Gil Ponce, Jose Vicente (2001). La nueva biotecnología enológica. <https://metode.es/revistas-metode/monográficos/la-nueva-biotecnología-enológica.html>
- González, A.,Valenzuela, L. *Saccharomyces cerevisiae*. (n.d.). Retrieved May 16, 2020, from <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>
- González-Candelas, L., Gil, J. V, Lamuela-Raventós, R. M., & Ramón, D. (2000). The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 179–183. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00354-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00354-8)
- González, D. R. (2008). *Desarrollo de cepas vínicas de Saccharomyces cerevisiae superproductoras de manoproteínas mediante técnicas de DNA recombinante , y su aplicación en enología.* 198.
- Gonzalez, R., Perez Gonzalez, J. a, Ventura, L., Sanchez, P., Sanz, P., Fernandez Espinar, M. T., Valles, S., Piñaga, F., & Ramon, D. (1993). Manipulación genética de la síntesis de enzimas fungicas de uso en industrias de alimentos. *Microbiología (Madrid)*, 9(EXTRA), 83–89.
- Govender, P., Domingo, J. L., Bester, M. C., Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2008). Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6041–6052. <https://doi.org/10.1128/AEM.00394-08>

- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J. M., & Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2432–2439. <https://doi.org/10.1128/AEM.02269-06>
- Guo, X.-W., Li, Y.-Z., Guo, J., Wang, Q., Huang, S.-Y., Chen, Y.-F., Du, L.-P., & Xiao, D.-G. (2016). Reduced production of ethyl carbamate for wine fermentation by deleting CAR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(5), 671–679. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1737-7>
- Henderson, R. C. A., Cox, B. S., & Tubb, R. (1985). The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance. *Current Genetics*, 9(2), 133–138. <https://doi.org/10.1007/BF00436961>
- Heux, S., Sablayrolles, J. M., Cachon, R., & Dequin, S. (2006). Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5822–5828. <https://doi.org/10.1128/AEM.00750-06>
- Husnik, J. I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z., & Vuuren], H. J. J. [van. (2006). Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*, 8(4), 315–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.02.003>
- Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Ridaura, I., Lozano, N., & del Olmo, M. (2009). Genetic manipulation of HSP26 and YHR087W stress genes may improve fermentative behaviour in wine yeasts under vinification conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.017>
- Li, P., Guo, X., Shi, T., Hu, Z., Chen, Y., Du, L., & Xiao, D. (2017). Reducing diacetyl production of wine by overexpressing BDH1 and BDH2 in *Saccharomyces uvarum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(11), 1541–1550. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1976-2>
- 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(9), 641–659. <https://doi.org/10.1002/yea.1382>
- Malherbe, D. F., Du Toit, M., Cordero Otero, R. R., Van Rensburg, P., & Pretorius, I. S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 502–511. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1208-0>
- Manzanares, P., & Orejas, M. (2008). La nueva Biotecnología apuesta por la vinificación. *Csic*, 2–7.
- Michener, J. K., & Smolke, C. D. (2014). Yeast Metabolic Engineering. *Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1152, 125–136. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8>
- Montero Arratibel Tutor, A., & Bermejo Benito, P. (2017). *Facultad De Farmacia Universidad Complutense*. http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MERCEDES_TIRADO_BAREA.pdf
- Muñiz-Calvo, S., Bisquert, R., Puig, S., & Guillamón, J. M. (2020). Overproduction of hydroxytyrosol in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous overexpression of the *Escherichia coli* 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase. *Food Chemistry*, 308(July 2019), 125646. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125646>
- Pardo, E., Rico, J., Gil, J. V., & Orejas, M. (2015). De novo production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0306-5>

Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V., & Matallana, E. (2002). Wine yeast strains

- engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3339–3344. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3339-3344.2002>
- Pérez, J. (1997). Organización Molecular Del Genoma De Levadura. *III Simposio Científico En Biología Celular y Molecular*, 99–114. http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9866/CC_30_art_5.pdf?sequence=1
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2)
- Pretorius, I. S. (2017). Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), 112–136. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1214945>
- Rivas, F., Hospital, F., Madrid, A., & Bartolomé, B. (2001). Alimentos transgénicos: por qué y cómo se desarrollan. Sesión de actualidad alimentos transgénicos y su implicación en alergia. In *Alergol Inmunol Clin* (Vol. 16, Issue 2).
- Salmon, J. M., & Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3831–3837. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3831-3837.1998>
- Sánchez, Maria Laura. *Los organismos genéticamente modificados en la enología*. <http://experticia.fca.uncu.edu.ar/numeros-antteriores/n-9-2018/182-los-organismos-geneticamente-modificados-en-la-enologia>.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., & Ramón, D. (1996). Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* abfB gene. *FEMS Microbiology Letters*, 145(2), 189–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00406-5)
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., & Ramón, D. (1998). Heterologous Expression of a *Candida molischiana* Anthocyanin- β -glucosidase in a Wine Yeast Strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 354–360. <https://doi.org/10.1021/jf970570r>
- Sani, D. (2013). *Evolución genómica por diseño molecular de levaduras industriales* (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia.
- Schoeman, H., Vivier, M. A., Du Toit, M., Dicks, L. M. T., & Pretorius, I. S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(8), 647–656. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990615\)15:8<647::AID-YEA409>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990615)15:8<647::AID-YEA409>3.0.CO;2-5)
- Song, Y., Feng, L., Ye, D., Song, Y., Qin, Y., Liu, Y., & Liu, S. (2018). A Biosynthesis method to produce resveratrol in *Saccharomyces Cerevisiae* with secretion expression of grape anti-oxidant resveratrol synthase gene during wine fermentation. *Pakistan Journal of Botany*, 50(6), 2443–2448.
- Swiegers, J. H., Capone, D. L., Pardon, K. H., Eelsey, G. M., Sefton, M. A., Francis, I. L., & Pretorius, I. S. (2007). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24(7), 561–574. <https://doi.org/10.1002/yea.1493>
- Tabera, L., Muñoz, R., & Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2351–2358. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2351-2358.2006>
- Uber García, G. (2007). Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.

- <http://www.tdx.cat/handle/10803/9532>
- van Staden, J., Volschenk, H., Van Vuuren, H. J. J., & Viljoen-Bloom, M. (2017). Malic Acid Distribution and Degradation in Grape Must During Skin Contact: The Influence of Recombinant Malo-Ethanolic Wine Yeast Strains. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 26(1), 16–20. <https://doi.org/10.21548/26-1-2114>
- van Wyk, N., Kroukamp, H., Espinosa, M. I., von Wallbrunn, C., Wendland, J., & Pretorius, I. S. (2020). Blending wine yeast phenotypes with the aid of CRISPR DNA editing technologies. *International Journal of Food Microbiology*, 324(March), 108615. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108615>
- Vertedor, D. M., Pérez, F., & Delgado, J. (2013). La biotecnología como herramienta de desarrollo del sector agroalimentario de extremadura. *Biotechnologia*, 1(2), 223–236. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.107.060401>
- Visser, J., Visser, J., Ramo, D., & Ramo, D. (2003). Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the. *Microbiology*, 69(12), 7558–7562. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7558>
- Walker GM. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley: New York. Libro - Resultados de la búsqueda Yahoo España. (n.d.). Retrieved May 16, 2020, from <https://es.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E211ES885G0&p=Walker+GM.+1998.+YeastPhysiology+and+Biotechnology.Wiley%3A+New+York.+Libro>
- Walkey, C. J., Kitts, D. D., Liu, Y., & Van Vuuren, H. J. J. (2015). Bioengineering yeast to enhance folate levels in wine. *Process Biochemistry*, 50(2), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.017>
- Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013). Chapter One - Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. In S. A. Ghabrial (Ed.), *Mycoviruses* (Vol. 86, pp. 1–36). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5>
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Kamada, Y., Tomita, M., Soga, T., & Yoshimoto, H. (2011). A novel mechanism regulates H₂S and SO₂ production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(2), 109–121. <https://doi.org/10.1002/yea.1823>
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., & Sone, H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4), 501–508. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1041-5>