



**Universidad Nacional del Comahue**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**

***Estudio molecular y cinético de la captación de glucosa y fructosa por levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de una bodega de la región del Añelo***

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Magister en Ciencias Agrarias y Biotecnología**

**Bioquímica Adriana Beatriz Simes**

**Director: Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Orientación en Ciencias Fisiológicas**

**del Mónaco, Silvana**

**2016**

*A la memoria de mis abuelos  
Margherita y Gettulo  
María y Yamil.*

## Agradecimientos

Aquel que alguna vez haya intentado superarse, comprenderá el valor de las personas e instituciones que lo apoyaron. Hoy, nombro a aquellos de quienes jamás podré olvidarme.

En primer lugar, agradezco a Dios, por guiarme y darme la fortaleza de poder seguir en los momentos más desesperantes.

Agradezco a la Universidad Nacional del Comahue, cuyo apoyo económico y político, fomentó el crecimiento del grupo de personas que realizamos este Posgrado.

Agradezco a la Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, por impulsarme al crecimiento y desarrollo continuo y a quien siento pertenencia desde el día en que ingresé.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agrarias, que me recibió como alumna y me facilitó lo necesario para poder cumplir con los requisitos solicitados en la Maestría.

Agradezco a los docentes de esta Carrera, argentinos, franceses y chilenos, por volcar su conocimiento y experiencia en pos de nuestra formación.

Agradezco a mis compañeros Agrónomos, por no dudar en hacerme comprender el mundo biológico, “con los pies en la tierra”, y por reírse conmigo.

Agradezco a mi directora, Dra. Silvana del Mónaco, por guiarme en la parte técnica y en la parte teórica, lo que llevó a los hallazgos encontrados en esta tesis.

Agradezco infinitamente al Ing. Agrónomo Valentín Tassile, por su asesoramiento en el tratamiento estadístico y modelado de los datos obtenidos en la parte experimental.

Agradezco especialmente a la Dra. Adriana Caballero, por haberme incluido en su grupo de Investigación y por su continuo apoyo a lo largo de este trayecto.

Agradezco a Mabel, a Melisa, a Cristina, a Cecilia y a Juan, por haber compartido conmigo grupos de trabajo, mates y mucho más.

Agradezco a los investigadores del PROBIEN, por no dudar en el facilitamiento de bibliografía, materiales, interpretaciones y consejos.

Agradezco a las chicas del Laboratorio de Microbiología del PROBIEN, por estar a mi lado en las cosas más sencillas que hacen a la cotidianeidad del trabajo de Investigación.

Agradezco a los integrantes del grupo de investigación en Vino, de Villa Regina y de Neuquén, por el trabajo conjunto y el apoyo mutuo.

Finalmente agradezco a toda mi familia, por su cariño y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

## Resumen

Argentina no cuenta, al día de hoy, con una producción de cepas autóctonas de levaduras con buenas características tecnológicas y enológicas capaces de insertarse en el mercado vitivinícola regional. El aislamiento y caracterización a nivel molecular y fermentativo de estos microorganismos es determinante para el desarrollo económico de esta actividad a nivel nacional.

Ocho cepas originarias de la Patagonia Norte, previamente caracterizadas como *Saccharomyces cerevisiae* a nivel genómico, fueron estudiadas según sus capacidades a nivel fermentativo, haciendo hincapié en el paso limitante de la utilización de azúcares, que es el transporte de los mismos a través de la membrana plasmática. De esta forma, se analizaron los perfiles de consumo en diferentes caldos a fin de obtener datos a nivel teórico, potencialmente extrapolables a condiciones de fermentación enológica.

De las ocho iniciales, tres cepas, identificadas en estudios preliminares como ÑNM10, ÑIF8 y ÑMN16, fueron elegidas a partir de sus perfiles fermentativos. Cada uno de los análisis realizados se contrastó con una cepa de uso frecuente en la vitivinicultura local tomada como patrón, EC1118, de la cual existe abundante bibliografía relacionada tanto a su desempeño tecnológico como a su metabolismo a nivel molecular.

La caracterización metabólica consistió en evaluar la resistencia a altas presiones osmóticas y en comparar los perfiles fermentativos frente a glucosa, fructosa, una mezcla de ambas hexosas y mosto de uvas variedad Pinot noir. También fueron analizados el consumo de azúcares y la expresión molecular de los transportadores de hexosas más importantes en cada cepa a lo largo de una fermentación.

La expresión de los transportadores de hexosas durante las fermentaciones reveló diferencias interesantes en la respuesta de cada cepa para el consumo de azúcar, donde los transportadores HXT2 y HXT5 mostraron cambios significativos en la expresión en cepas de la Patagonia, que normalmente se asocian a la resistencia a condiciones ambientales estresantes.

Los resultados obtenidos combinando las características estudiadas, tanto a nivel enológico como molecular, son sumamente alentadores, evidenciando que las cepas ÑIF8 y ÑMN16 presentan un elevado potencial para su aplicación en las vinificaciones locales. Ensayos actualmente en desarrollo, llevados a cabo a escala piloto, determinarán la posibilidad de utilizar estas cepas, con características tecnológicas prometedoras, a nivel industrial.

## ***Molecular and kinetic study of the uptake of glucose and fructose by yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* specie isolated from a winery of the Añelo region.***

### **Abstract**

At present, Argentina does not count with a production of indigenous yeast strains with good technological and oenological features, able to get into the regional winery market. Isolation and molecular characterization of these microorganisms and its fermentation attributes is crucial to the economic development of this activity in the country.

Eight strains isolated from North Patagonia, previously characterized at the genomic level as *Saccharomyces cerevisiae*, were studied for their fermentation behavior, emphasizing the limiting step in the use of sugars, which is their transport through the plasma membrane. Thus, consumption profiles were analyzed in different broth in order to obtain data at a theoretical level, and virtually apply them to an oenological fermentation environment.

Three of the eight initial strains, identified in preliminary studies as ÑNM10, ÑIF8 and ÑMN16, were chosen by their fermentation profiles. Each one of the analysis was contrasted with a strain commonly used as a starter in local wineries and therefore considered as standard, EC1118, and whose technological performance and metabolism at the molecular level was abundantly studied in literature.

Metabolic characterization was made to evaluate their resistance to high osmotic pressures and to contrast fermentation profiles of glucose, fructose, a mixture of both hexoses and Pinot noir grape musts. Consumption of sugars and molecular expression of the most important hexose transporters in each strain along fermentation was evaluated.

The expression of hexose transporters during fermentations revealed interesting differences in the response of each strain to sugar consumption, where transporters HXT2 and HXT5 showed significant changes in expression in Patagonian strains, which are normally associated to endurance to environment stress conditions.

The results obtained by combining the characteristics studied, both at oenological and molecular level, are extremely encouraging, showing that strains ÑMN16 and ÑIF8 have a high potential for application in local winemaking. Currently developing assays, carried out on a pilot scale, will determine the possibility of using these strains, with promising technological features at industrial scale.

## ***Étude moléculaire et cinétique de l'assimilation du glucose et du fructose par les levures du espèce *Saccharomyces cerevisiae* isolées d'un vignoble de la région Añelo.***

### **Résumé**

L'Argentine ne possède actuellement pas de production de souches autochtones des levures présentant des caractéristiques technologiques et œnologiques capables de s'insérer dans le marché vitivinicole régional. L'isolation et la caractérisation de ces micro-organismes à niveau moléculaire mais aussi fermentatif sont des points critiques pour le développement économique de cette activité dans le contexte national.

Huit souches originaires du Nord de la Patagonie, caractérisées précédemment comme *Saccharomyces cerevisiae* du point de vue génomique, ont été étudiées en ce qui concerne leur capacité fermentative, en remarquant le pas limitant de l'utilisation des sucres, c'est à dire, son transport à travers la membrane plasmique. Ainsi, les profils de consommation dans de différents bouillons ont été analysés dans le but d'obtenir des données issues de la théorie qui peuvent, potentiellement, être extrapolées vers des conditions de fermentation œnologique.

Trois souches, parmi les huit initiales, identifiées dans des études préliminaires comme ÑNM10, ÑIF8 et ÑMN16 ont été choisies en partant de leurs profils fermentatifs. Chaque analyse conduit a été confronté à une souche d'usage fréquent dans la vitiviniculture locale adoptée en tant que référence (EC1118) dont il existe de profuse information par rapport à son comportement technologique autant que concernant son métabolisme à niveau moléculaire.

La caractérisation métabolique consista à évaluer la résistance à des pressions osmotiques élevées et à comparer les profils fermentatifs face au glucose, au fructose, au mélange des deux hexoses et au moût de raisin de la variété Pinot noir.

L'expression des transporteurs d'hexoses pendant les fermentations a révélé des différences intéressantes dans la réponse de chaque souche à la consommation de sucre, où les transporteurs HXT2 et HXT5 ont montré des changements significatifs dans l'expression dans des souches de Patagonie, qui sont normalement associés à l'endurance à des conditions de stress environnemental.

Les résultats obtenus en combinant des caractéristiques étudiées aussi bien dans le plan œnologique que dans le plan moléculaire sont bien encourageants. Ils mettent en évidence que les souches ÑIF8 et ÑMN16 présentent un potentiel significatif pour son utilisation dans des vinifications locales. Des essais qui sont actuellement en cours à l'échelle pilote, vont montrer la possibilité d'utiliser ces souches, avec des caractéristiques technologiques bien prometteuses à niveau industriel.

Algunos de los resultados presentados en esta tesis se publicaron parcialmente en las siguientes reuniones científicas, y revistas científicas/tecnológicas con arbitraje en las siguientes reuniones científicas, Nacionales e Internacionales:

Simes AB, Maturano RC, Tassile V, Caballero AC, del Mónaco SM (2016) Selección de cepas patagónicas de *Saccharomyces cerevisiae* con marcado carácter fructofílico". *La Alimentación latinoamericana*. Aceptado para su publicación. **En prensa**

Simes AB, Maturano R del C, Tassile V, Caballero AC, del Mónaco SM (2016) Molecular and kinetic characterization of the fermentative behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from North Patagonia". *Advances in Microbiology* 6, 733-744. ISSN Print: 2165-3402, ISSN Online: 2165-3410. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.69072B>

Simes AB, Tassile V, Del Mónaco SM, Caballero AC (2015). Selección de cepas patagónicas de *Saccharomyces cerevisiae* con marcado carácter fructofílico. Libro de Resúmenes de la XV CYTAL. AATA, 3 al 5 Nov 2015, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **ID 454**

Simes Adriana, Caballero Adriana y del Mónaco Silvana (2014) Utilization of hexoses by Patagonian *Saccharomyces cerevisiae* strains from oenological origin. Book of Abstract 37<sup>o</sup> World Congress of Vine and Wine. OIV, 9 al 14 de noviembre de 2014. Mendoza, Argentina. Short communication, Oenology Section Ref.: 2014-474, pp 173-175. ISBN 979-10-91799-31-7:

## Tabla de contenido

Agradecimientos .....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Résumé .....	6
Abreviaturas .....	11
1 Introducción.....	12
1.1 El vino.....	12
1.2 El Proceso de Vinificación.....	14
1.3 Componentes químicos finales en el vino.....	17
1.3.1 Hexosas .....	17
1.3.2 Glicerol.....	18
1.3.3 Ácido Acético .....	19
1.3.4 Ácido Málico .....	21
1.3.5 Ácido Láctico.....	22
1.4 Levaduras Vínicas .....	23
1.4.1 Origen de las levaduras vínicas.....	23
1.4.2 <i>Saccharomyces</i> en vino.....	23
1.4.3 Adaptaciones evolutivas.....	26
1.4.4 Efecto Crabtree .....	27
1.5 Transportadores De Membrana en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
1.5.1 Subfamilia Sensores.....	32
1.5.2 Subfamilia Transportadores .....	33
1.6 Metabolismo Fermentativo/Respiratorio: El cambio diáuxico .....	41
1.7 Influencia de los transportadores durante la fermentación del vino.....	43
1.8 Análisis estadístico de los datos: Modelos No Lineales Mixtos .....	44
2 Hipótesis de Trabajo.....	46
3 Objetivos.....	46
3.1 Objetivo General .....	46
3.2 Objetivos Específicos .....	46
4 Materiales y Métodos .....	47
4.1 Análisis Microbiológicos .....	47
4.1.1 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
4.1.2 Resistencia Osmótica a Azúcares .....	48
4.1.3 Microfermentaciones .....	49



4.1.4	Tratamiento Estadístico y Modelado .....	49
4.2	Análisis Físico Químico de los Fermentados.....	52
4.2.1	Determinación de Glucosa y Fructosa Remanentes .....	52
4.2.2	Determinación de Ácido Acético .....	52
4.2.3	Determinación de Ácido Láctico .....	53
4.2.4	Determinación de Glicerol .....	53
4.2.5	Determinación de Etanol .....	53
4.2.6	Determinación del pH final de los vinos .....	53
4.3	Análisis Molecular de la Expresión de los Transportadores de Hexosas .....	53
4.3.1	Aislamiento del ARN de las Levaduras.....	53
4.3.2	Retrotranscripción.....	54
4.3.3	Amplificación e Identificación.....	54
4.3.4	Determinación semicuantitativa de la cinética de expresión de cada transportador de hexosas. ....	55
5	Resultados.....	57
5.1	Resistencia Osmótica a Azúcares .....	57
5.2	Caracterización de los Perfiles de Fermentación Iniciales .....	58
5.2.1	Mostos sintéticos .....	58
5.2.2	Mosto de Uvas variedad Pinot noir:.....	65
5.3	Análisis del Consumo de Azúcares .....	66
5.3.1	Caldo YNB Glucosa 10% (P/V) – Fructosa 10% (P/V) .....	66
5.3.2	Mosto de uvas variedad Pinot noir.....	69
5.4	Análisis de la expresión de los Transportadores de Hexosas a lo largo de la fermentación.....	72
5.5	Relación de la Expresión de los transportadores en función de las concentraciones de hexosas.....	76
5.5	Análisis Físicoquímicos de los Vinos .....	78
6	Discusión.....	79
6.1	Resistencia Osmótica .....	79
6.2	Fermentaciones en Mostos Sintéticos y Naturales .....	80
6.3	Pérdida de Peso como CO <sub>2</sub> (Modelada según Ecuación de Gompertz Reparametrizada) .....	82
6.4	Consumo de Azúcares (Modelado según Ecuación de Taoukis modificada por Arroyo-López) .....	83
6.5	Cinética de los Transportadores de Hexosas .....	85
6.6	Análisis físicoquímico de los vinos .....	88

7	Conclusiones.....	90
8	Bibliografía .....	91
9	Anexos .....	103
	Modelado de Producción de CO <sub>2</sub> Acumulada según la Ecuación de Gompertz Reparametrizada en Caldo Glucosa 20% (P/V), Fructosa 20% (P/V) y Glucosa 10% - Fructosa 10% (P/V).....	103
	Modelado de Producción de CO <sub>2</sub> Acumulada según la Ecuación de Gompertz Reparametrizada en mosto de Uvas Pinot noir.....	110
	Modelado de Consumo de Azúcares según Taoukis 1997, modificada por Arroyo-López 2008.....	111
	Diferencias Significativas entre cepas para los Parámetros Físicoquímicos de los Vinos (Infostat) .....	113

## Abreviaturas

$a_w$	Actividad Acuosa
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de la Varianza
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EC	Sistema Internacional de Clasificación de Enzimas
FSY1	Simporte Fructosa/H <sup>+</sup> ( <i>Fructose Symporter Yeast 1</i> )
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
G3PD	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa
Gpr1	Receptor Acoplado a Proteína G1
HOG	Glicerol de Alta Osmolaridad ( <i>High Osmolality Glycerol</i> )
HXT	Gen de Transportador de Hexosas
Hxtp	Proteína Transportadora de Hexosas ( <i>Hexose Transporter Protein</i> )
LSD	Test de la Menor Diferencia Significativa
MFS	Superfamilia Principal de Transportadores ( <i>Major Facilitator Superfamily</i> )
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
nlme	Non Linear Mixed-Effect Models
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
Ser	Serina
Snf	Receptor No Fermentador de Sacarosa ( <i>Sucrose Non-Fermenting</i> )
STREs	Elementos de Respuesta al Estrés ( <i>STress Responsive Elements</i> )
TC	Sistema Internacional de Clasificación de Transportadores
TCA	Vía de los Ácidos Tricarboxílicos ( <i>TriCarboxylic Acid Cycle</i> )
Thr	Treonina
TPI	Triosa Fosfato Isomerasa

# 1 Introducción

## 1.1 El vino

La historia registrada del vino abarca unos siete milenios de artesanía e innovación. En la antigüedad, el vino era considerado como un regalo mágico, espontáneo de la naturaleza. De esta forma, viticultores y bodegueros eran custodios de una tradición vital (Pretorius y Høj, 2005).

Hoy en día, el vino es un componente integral de la cultura de muchos países, una forma de entretenimiento en otros, y una bebida de elección para los defensores de sus beneficios para la salud. A diferencia de muchos alimentos modernos, los atractivos de vino no se basa en sus audaces sabores, sino en un conjunto de sutiles sensaciones cambiantes que hacen que su encanto sea difícil de definir. En esencia, los productores de vino están vendiendo una experiencia sensorial para el consumidor (Bisson y col., 2002).

Según el Código Internacional de Prácticas Enológicas de la Oficina Internacional de la Uva y el Vino (OIV), “el vino es la bebida resultante exclusivamente de la fermentación alcohólica total o parcial de uva fresca, aplastada o no, del mosto de uva. Su graduación alcohólica real no deberá ser inferior a 8,5% vol. Sin embargo, teniendo en cuenta el clima, el suelo, la variedad de vid, factores o tradiciones específicas en determinados viñedos, el contenido mínimo de alcohol total puede ser capaz de ser reducido a 7% vol. por la legislación particular a la región considerada” (OIV, 2015).

La transformación del mosto de uva en vino es un proceso durante el cual se establecen complejas interacciones entre el jugo de uvas pertenecientes a distintas variedades de *Vitis vinifera* y algunos microorganismos, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. El jugo de uva, compuesto principalmente por agua, azúcar, ácidos orgánicos y otros metabolitos secundarios, proporciona nutrientes para que esta levadura produzca finalmente el vino, constituido principalmente por agua, etanol, glicerol, ácidos orgánicos y otros componentes adicionales. La composición molecular final, contribuirá al sabor, aroma y sensación en la boca características del vino (Ritcher y col., 2015).

En los últimos 30 años, cepas de *S. cerevisiae* han sido seleccionadas por sus propiedades enológicas y se están utilizando como iniciadoras en los procesos de vinificación para asegurar el éxito de la fermentación alcohólica, jugando además un importante papel en las características del producto final (Le June y col., 2006).

Desde hace algunos años, la producción de alimentos a nivel mundial está exigiendo una especial atención al cuidado del medio ambiente y a la preservación de recursos naturales, manifestando un claro rechazo a los organismos genéticamente modificados (OGMs) o induciendo a la minimización de su presencia en los alimentos (Reglamento CE 834/2007 del Consejo de la Unión Europea). Además, existe una importante tendencia, en el caso de la producción vitícola, a la valorización de las “Denominaciones de Origen”, reflejo del medioambiente característico de los cultivares, determinado principalmente por el *terroir* como imagen propia del lugar geográfico que imprime el sello diferencial al producto.

Por otra parte, tanto los productores como los consumidores, consideran actualmente indispensable un conocimiento preciso de las preferencias del consumidor para definir y alinear estilo y calidad, sumado a la aplicación inteligente de prácticas más eficientes a lo largo de toda la cadena de producción del vino, generando un impacto ambiental mínimo (Pretorius y Høj, 2005).

En la región Norte de la Patagonia Argentina se producen vinos que son reconocidos por su calidad e identidad, tanto por los compuestos que predominan en la materia prima otorgados por las condiciones edafoclimáticas, como por la flora nativa de microorganismos asociados que aportan notas distintivas durante las fermentaciones. La región del Comahue, geográficamente ubicada en la Patagonia norte, es una de las regiones vitivinícolas más australes del mundo. Se extiende por debajo del río Colorado (37°5' y 40°5' de latitud sur), abarcando las provincias de Neuquén y Río Negro (Figura 1). En esta zona, pueden obtenerse buenos viñedos a una baja altitud (300 m sobre el nivel del mar).

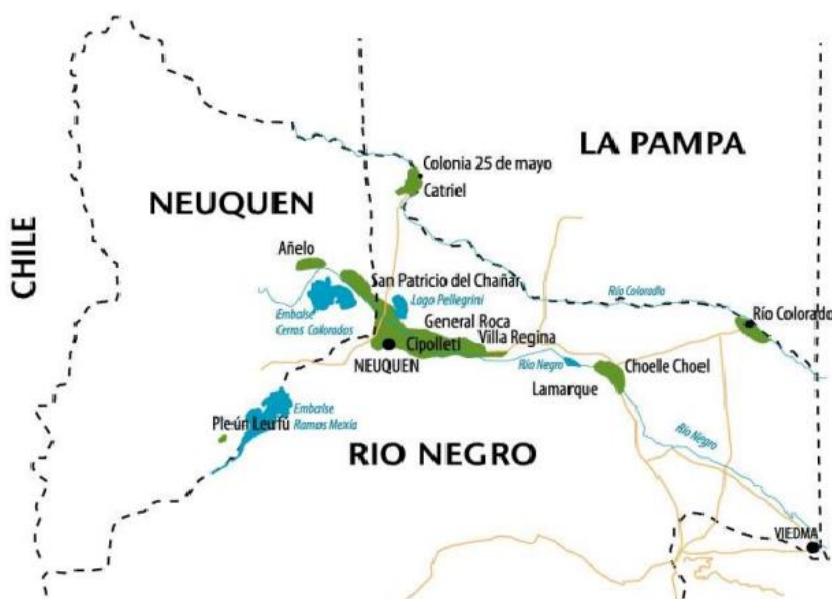


Figura 1: Zonas vitícolas de la Patagonia Norte Argentina. Informe INV, mayo de 2015.

Las condiciones ecológicas son ideales para la obtención de vinos blancos con notas terpénicas características de los Traminer y Riesling de la zona. El Chardonnay y el Sauvignon se caracterizan por un aroma ahumado difícil de encontrar en otras regiones del país. El Merlot se adapta muy bien al lugar y el Pinot noir encuentra en esta zona una de sus mejores expresiones, tanto para la obtención de vinos tintos como de vinos base de espumantes (Catania y Avagnina, 2010).

En la última década, la región ha experimentado un importante crecimiento en la industria vitivinícola en zonas vírgenes de la estepa patagónica de la Provincia del Neuquén. El 80% de la producción de esta área está destinado a la elaboración de vinos de las variedades tintas Syrah, Cabernet sauvignon, Merlot y Pinot noir. Estudios microbiológicos realizados recientemente han revelado que los mostos tintos de esta área presentan diferencias significativas en la composición de la biota de levaduras, tanto sacaromícética como no sacaromícética, asociada a sus procesos de vinificación (Caballero y col., 2008).

Por otra parte, existe una demanda cada vez mayor de nuevas y mejoradas cepas de levaduras vínicas. Además de la función principal de la levadura para catalizar la conversión eficiente y completa de los azúcares de la uva en alcohol sin el desarrollo de sabores desagradables, las cepas de cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* deben poseer otras propiedades, que permitan su dominancia a lo largo de la fermentación, calidad e inocuidad controladas durante el proceso y una mejora en las características sensoriales e incluso saludables del vino. La importancia de estas cualidades en las levaduras varía según los requisitos técnicos de la bodega, y el tipo y estilo de vino a producir. Dicho en otras palabras, se necesitan nuevas cepas de *S. cerevisiae* que se adapten mejor a las diferentes regiones vitivinícolas del mundo con sus respectivas variedades de uva, las prácticas vitícolas y técnicas de vinificación (Pretorius, 2001; Suárez Lepe y Morata, 2012).

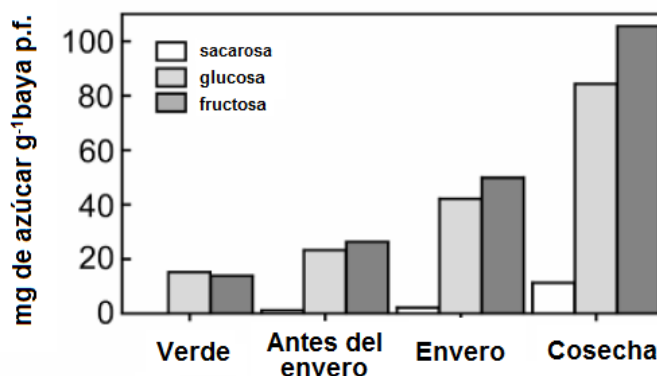
## 1.2 El Proceso de Vinificación

A diferencia de la mayoría de las frutas donde la sacarosa representa el azúcar más importante, las uvas contienen principalmente glucosa y fructosa, con cantidades mucho más pequeñas de sacarosa (Fugelsang y Edwards, 2007).

Numerosas variedades de uva, *Vitis vinífera*, son usadas en el proceso de vinificación, determinando las características particulares del producto final. Estas uvas deben ser cosechadas en el estadio apropiado de maduración, el cual determina la composición química

del mosto. Los azúcares y ácidos son los principales constituyentes del jugo y tienen un importante impacto en las propiedades de la fermentación (Fleet, *Wine*, 2001).

Luego de su producción en el mesófilo de las hojas, la sacarosa es transportada por el floema hacia los órganos de demanda. La hidrólisis de la sacarosa por invertasas ubicadas en la pared celular, aumentaría las concentraciones de glucosa y fructosa, contribuyendo a la mantención del gradiente de concentración de sacarosa desde el floema a la baya (Conde y col., 2007) (Figura 2).



**Figura 2:** Contenido de azúcares en las células de la pulpa de las bayas en diferentes etapas del desarrollo de la uva. Adaptado de (Conde y col., 2007).

La acumulación masiva de glucosa y fructosa en las células del mesocarpio de la uva se produce después del envero. Veinte días después de este período, el contenido de hexosas de la baya es cercano a 1 M, con una relación glucosa/fructosa de 1. Debido a que la sacarosa es el principal azúcar transportado por la savia en la vid, la rápida acumulación de hexosas que caracteriza la maduración de la baya implica la actividad de enzimas de la familia de las invertasas (Fillion y col., 1999).

La fermentación alcohólica puede ser conducida por levaduras nativas o por inoculación con cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* en cantidades iniciales que van de  $10^6$  a  $10^7$  células por mililitro, y se completa cuando los azúcares fermentables, glucosa y fructosa, del mosto han sido completamente metabolizados (Fleet, *Wine*, 2001). La Figura 3 muestra un diagrama general del proceso de vinificación.

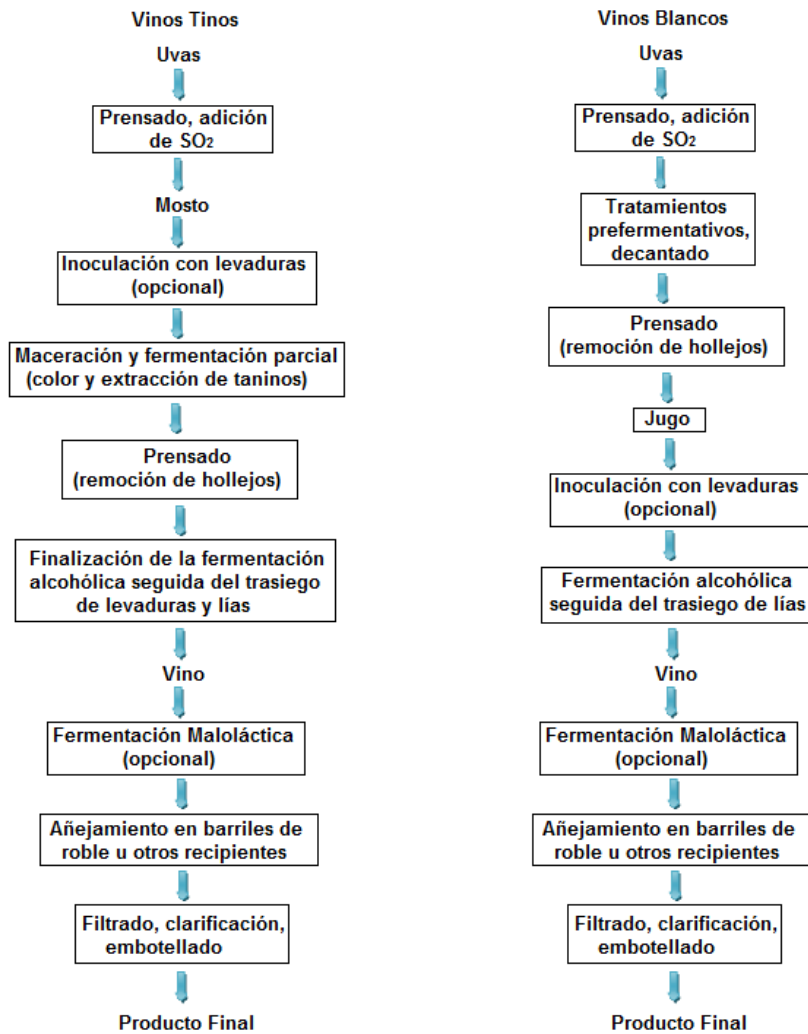


Figura 3: Esquema del proceso de producción de vinos tintos y blancos (Fleet, *Wine*, 2001)

Aunque las levaduras utilizan la fructosa en forma concomitante con la glucosa, esta última se agota primero a partir del medio, lo que da lugar a una discrepancia entre la cantidad de glucosa y fructosa consumidas durante la fermentación. Como consecuencia, el azúcar residual en el mosto de uva fermentado, generalmente contiene más fructosa que glucosa (Berthels y col., 2004). Dado que el sabor dulce detectado en la fructosa es considerado sensorialmente como casi el doble que el de la glucosa, su presencia como azúcar residual tiene un efecto mucho más intenso sobre el dulzor final del vino. De esta forma, en la producción de vinos secos, caracterizados por una concentración de azúcar residual menor a  $4 \text{ gL}^{-1}$ , su presencia es la causa principal de un sabor dulce indeseable. En relación a esto, y en función del tipo de vino que se va a producir, todo el azúcar puede ser fermentado en alcohol para producir un vino seco, o sólo una parte, en el caso de la producción de vinos semi-secos o dulces (concentración de azúcar entre  $12$  y  $45 \text{ gL}^{-1}$  o mayor de  $45 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente) (Conde y col., 2007).

Una alta concentración de fructosa residual también significa una menor producción de etanol y un mayor riesgo de deterioro microbiano en el vino una vez que la vinificación ha



terminado. Por otra parte, las detenciones en la fermentación se caracterizan frecuentemente por una relación inusualmente alta del contenido de fructosa/glucosa (Berthels y col., 2004).

### 1.3 Componentes químicos finales en el vino

#### 1.3.1 Hexosas

Las hexosas más importantes en el mosto de uva son la glucosa, llamada también dextrosa porque desvía a la derecha la luz polarizada, y fructosa, llamada también levulosa, por desviar la luz polarizada a la izquierda. Se encuentran, asimismo, pequeñas cantidades de galactosa, sin importancia desde el punto de vista organoléptico.

Como resultado de la fotosíntesis en la hoja como producto de reserva, la sacarosa migra a través del floema a la baya y allí es hidrolizada por una enzima (invertasa) en glucosa y fructosa. En la uva verde hay más glucosa que fructosa, representando el 85% de los azúcares de la uva, pero durante la maduración aumenta la proporción de fructosa y a la madurez, las cantidades de ambos azúcares son aproximadamente iguales.

Durante la fermentación alcohólica las levaduras metabolizan 5 a 6 veces más rápido la glucosa que la fructosa. En un vino que resultó dulce por una parada de fermentación, por añadido de alcohol o por cosecha tardía, siempre la cantidad de fructosa puede ser de 2 a 4 veces la cantidad de glucosa. Las pequeñas cantidades que quedan al final de una fermentación completa son preferentemente constituidas por fructosa (Catania y Avagnina, 2010).

Las cepas de levaduras vínicas son por lo general glucofílicas. Sin embargo, se observan importantes diferencias entre cepas en cuanto a su utilización de la glucosa y la fructosa (Berthels y col., 2004). La incorporación de azúcares a las células de la levadura para su fermentación depende de proteínas transportadoras de membrana. Estas proteínas muestran valores cinéticos preferentemente para la glucosa, lo que explica la prevalencia de fructosa hacia el final de la fermentación, y las cantidades residuales de este azúcar que aún permanecen en vinos totalmente fermentados. Además de la fructosa, los vinos también contienen pequeñas cantidades de otros azúcares, tales como arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, etc. El azúcar residual en los vinos secos es suficiente para añadir en boca una sensación suave (*mouthfeel*) sin un sabor dulce perceptible, pudiendo balancear el vino, aumentar la viscosidad y ayudar a enmascarar pequeños defectos o sabores ligeramente desagradables (Conde y col., 2007).

### 1.3.2 Glicerol

El glicerol es el producto secundario más importante de la fermentación (Radler y Schütz, 1982). Debido a su naturaleza no volátil, el glicerol no tiene un impacto directo sobre las características aromáticas del vino. Sin embargo, este triol imparte algunas otras cualidades sensoriales, tiene un sabor ligeramente dulce, y debido a su naturaleza viscosa, también contribuye a la suavidad, a la consistencia y al cuerpo general del vino (Pretorius, 2001).

La cantidad de glicerol en los vinos depende de muchos factores: la variedad de uva, composición en nitrógeno, los grados de madurez (niveles de azúcar), la infección por mohos (durante el cual se produce glicerol), los niveles de sulfito, el pH del mosto de uva, temperatura de fermentación, la aireación, y la elección de la cepa cultivo iniciador con su nivel de la inoculación. Típicamente, bajo condiciones controladas, las concentraciones de glicerol son más altas en los vinos tintos que en los vinos blancos, variando de 1 a 15 gL<sup>-1</sup>. El nivel de umbral de sabor de glicerol se observa a 5,2 gL<sup>-1</sup> en el vino, mientras que un cambio en la viscosidad sólo se percibe a un nivel de 25 gL<sup>-1</sup>. Cepas de levaduras capaces de producir glicerol en cantidades elevadas, serían de gran valor en la mejora de la calidad organoléptica del vino (Pretorius, 2001).

Durante la fermentación vínica, el 8% de las moléculas de azúcar sigue la fermentación gliceropirúvica y el 92% la fermentación alcohólica (Figura 4). La fermentación de los primeros 100 g de azúcar forma la mayor parte del glicerol, luego de la cual la producción del glicerol se vuelve más lenta, pero no se detiene (Ribéreau-Gayon, 2006).

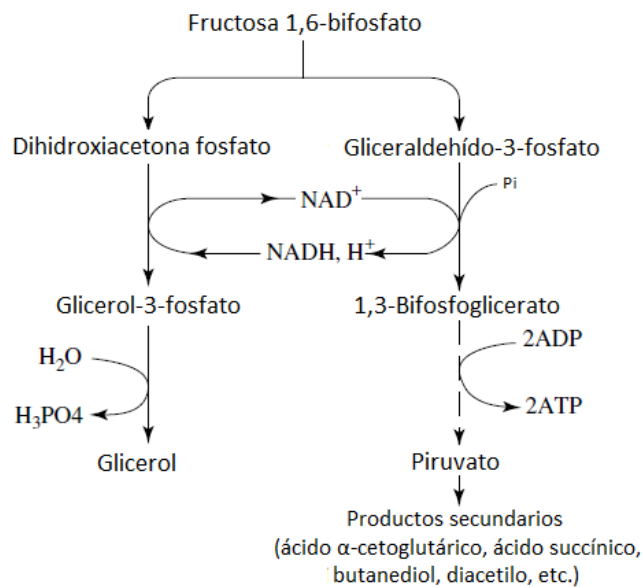


Figura 4: Vía de la fermentación glicero-pirúvica. Adaptado de Ribéreau-Gayon, 2006.

De esta forma, la biosíntesis de glicerol se vuelve una reacción secundaria importante de la vía glicolítica. La dihidroxi-acetona-fosfato (DHAP) formada por la aldolasa puede, o bien ser metabolizada a través de la glucólisis (después de isomerización por la triosa-fosfato-isomerasa, TPI), o reducirse a glicerol-3-fosfato (G3P) mediante la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PD), con la concomitante oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. Posteriormente, se forma el glicerol por la glicerol-3-fosfatasa. La biosíntesis de glicerol es importante como un medio de reposición del pool de NAD<sup>+</sup> que es consumido por la glucólisis (Dickinson y Kruckeberg, 2006). La formación de glicerol se considera como un resultado de la competencia entre las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) que compiten por la coenzima reducida NADH (Radler y Schütz, 1982). En anaerobiosis, la regeneración del NAD<sup>+</sup> a partir de la reducción de la DHAP a glicerol-3-fosfato, se vuelve importante. La acumulación de este último metabolito deriva a la formación de glicerol (Ribéreau-Gayon, 2006).

La base molecular de las respuestas al estrés osmótico en células de levadura está bien caracterizada, en particular en *S. cerevisiae*. En general, el estrés osmótico, como otros tipos de estrés, altera la expresión de aproximadamente el 10% de los genes de la célula (Tamás y Hohmann, 2003). En esta especie, una variedad de condiciones de estrés (choque térmico, irradiación UV, estrés osmótico, etc.) inducen la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a estrés (STREs) que permiten a las células crecer en condiciones potencialmente letales. Un sistema de señalización específico para estrés osmótico se llama "Vía HOG" (*High Osmolality Glycerol*), y es activado por la cascada de la proteína MAP quinasa (MAPK) (Walker y Van Dijck, 2006).

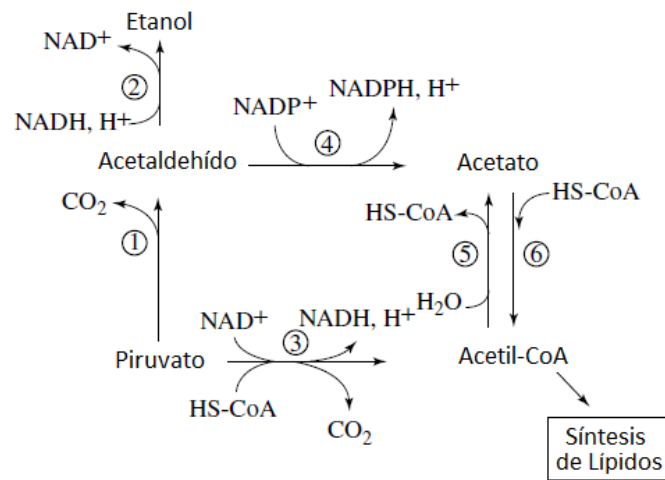
Durante la fermentación del vino, el papel principal de la síntesis de glicerol es suministrar a la célula de levadura un soluto compatible en respuesta al estrés osmótico y equilibrar el balance redox intracelular mediante la conversión del exceso de NADH generado durante la formación de la biomasa a NAD<sup>+</sup> (Pretorius, 2001).

### **1.3.3 Ácido Acético**

El ácido acético contribuye a una parte importante del componente de acidez volátil y es un aromatizante deseable en los niveles normales en el vino (0,3 gL<sup>-1</sup>) (Jackson, 2008), produciendo una sensación amarga y algo quemante al ingerirlo.

Se genera como producto secundario de la fermentación alcohólica, por oxidación de los aldehídos. Aumenta con el desarrollo de la fermentación para luego ir disminuyendo paulatinamente. Es por ello que los tenores presentes en el vino luego de una fermentación alcohólica oscilan entre 0,25 y 0,50 gL<sup>-1</sup> (Catania y Avagnina, 2010).

En el mosto de uvas sanas con una concentración de azúcar moderada (menor a 220 gL<sup>-1</sup>), *S. cerevisiae* produce cantidades relativamente pequeñas de ácido acético (100-300 mgL<sup>-1</sup>), variando de acuerdo a la cepa. La enzima piruvato deshidrogenasa produce acetil CoA antes de la descarboxilación del ácido pirúvico. Esta reacción tiene lugar en la matriz mitocondrial, pero es limitada durante la anaerobiosis. La enzima aldehído deshidrogenasa puede también formar ácido acético por oxidación de acetaldehído y ésta, cuyo cofactor es NADP<sup>+</sup>, está activa durante la fermentación alcohólica. El NADPH formado de esta manera se puede utilizar para la síntesis de lípidos (Figura 5) (Ribéreau-Gayon, 2006).



**Figura 5:** Vías de formación del Ácido Acético en levaduras. 1: piruvato decarboxilasa; 2: alcohol deshidrogenasa; 3: piruvato deshidrogenasa; 4: acetaldehído deshidrogenasa; 5: acetil-CoA hidrolasa; 6: acetil-CoA sintetasa. Adaptado de Ribéreau-Gayon, 2006.

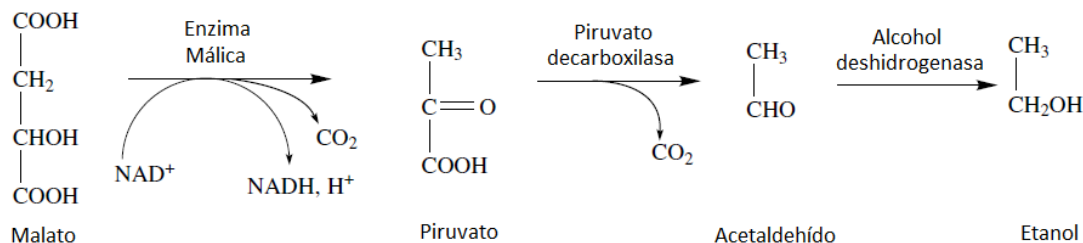
Igualmente, durante la fermentación maloláctica las bacterias lácticas pueden producir ácido acético a partir del ácido cítrico. También las bacterias lácticas lo producen cuando degradan ácido tartárico (enfermedad denominada “tourne”) y las bacterias heterolácticas pueden generarlo a partir de azúcares (Jackson, 2008).

Sin subestimar el grado de alteración del vino que puede ser causado por hongos y levaduras, es ampliamente aceptado que las bacterias son las principales culpables de la aparición en vino de este compuesto, especialmente bacterias del ácido acético y bacterias del ácido láctico. El vino avinagrado es a menudo asociado con la actividad de las bacterias del ácido acético tales como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Pretorius, 2001).

El ácido acético se expresa como acidez volátil del vino y sirve para medir el estado sanitario del mismo y su conservación. Organolépticamente se expresa como muy amargo y con sensación agria. Sin embargo, el aroma a acetona o vinagre de los vinos enfermos no se debe al ácido acético, sino al acetato de etilo.



etanal, que después se reduce a etanol (Figura 7). La enzima málica es responsable de la transformación del ácido málico en ácido pirúvico. Esta fermentación maloalcohólica reduce la acidez del vino significativamente más que la fermentación maloláctica (Ribéreau-Gayon, 2006), en los casos en que esta última se llegue a producir.



**Figura 7:** Descomposición de ácido málico por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Adaptado de Ribéreau-Gayon, 2006.

Si bien durante la fermentación alcohólica es consumido parcialmente por las levaduras, también es el sustrato de bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica, que lo llevan a cantidades cercanas a cero.

Organolépticamente está asociado con gustos verdes y ácidos (acervo), propia de los vinos elaborados a partir de uvas no bien maduras. Se caracteriza por producir una sensación de fruta verde, algo agresiva (Catania y Avagnina, 2010).

### 1.3.5 Ácido Láctico

Existen en el vino dos formas del ácido láctico que tienen diversos orígenes. Cuando el ácido láctico proviene de una fermentación maloláctica, el isómero que se encuentra en mayor cantidad es el ácido L(+), que se origina a partir del L(-) málico. Cuando las hexosas son atacadas por bacterias lácticas homofermentativas o heterofermentativas se producen ambos isómeros dependiendo de la especie bacteriana. Durante la fermentación alcohólica y a partir de la hidrogenación del ácido pirúvico, las levaduras pueden formar pequeñas cantidades de ácido láctico (200 a 600 mgL<sup>-1</sup>), y de éste, la mayor parte es D(-) láctico y sólo algunas decenas de mg del isómero L(+). (Ribéreau-Gayon, 2006).

Enológica, este ácido se caracteriza por producir una sensación ácida suave y estable (pK 3,81). Se le atribuye poder antiséptico. Los degustadores lo describen como suave, que recuerda a la manteca y a veces a las aceitunas fermentadas, poco ácido y algo agrio (Catania y Avagnina, 2010).

## 1.4 Levaduras Vínicas

### 1.4.1 Origen de las levaduras vínicas

La mayoría de las personas, ya sea con una formación científica o no científica, tienen una imagen positiva de las levaduras a causa de su conocida asociación con la producción de pan, cerveza, vino y otras bebidas alcohólicas. Más aún, con respecto al ámbito de la seguridad alimentaria, las levaduras tienen un historial impecable.

Con muy pocas excepciones (por ejemplo, cerveza), los alimentos y bebidas fermentadas implican una ecología mixta de levaduras, bacterias, hongos filamentosos en algunos casos, y sus virus. En consecuencia, es probable que se produzcan interacciones microbianas complejas a lo largo de estos procesamientos (Fleet, 2006).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de convertir azúcares en etanol y CO<sub>2</sub> a través de la fermentación y se han utilizado durante miles de años por la humanidad para producir alimentos y bebidas. Durante el Neolítico, las fermentaciones fueron probablemente iniciadas por levaduras naturales, y se desconoce cuándo los seres humanos comenzaron a añadir conscientemente levaduras seleccionadas para hacer cerveza, vino o pan. Probablemente, este tipo de actividades humanas favorecieron la creación de nuevas especies dentro del género *Saccharomyces sensu stricto* por hibridación interespecífica o poliploidización, lo que contribuyó a la “domesticación” de las levaduras actuales (Sicard y Legras, 2011; Tofalo y col., 2013). Dentro de la especie *S. cerevisiae*, se produjo la diferenciación de grupos genéticamente distintos según el origen del alimento producido por esta fermentación (por ejemplo, cepas vínicas, de cerveza o de pan).

Las cepas de *Saccharomyces* utilizadas en vinificación son un subgrupo genéticamente homogéneo, con características fenotípicas muy similares. Los bajos niveles de variación genética presente en estas cepas podrían haber sido el resultado de un “cuello de botella genético”, de la selección de rasgos específicos o de una combinación de ambos. En el caso de las levaduras usadas por el hombre en alimentos y bebidas, se estima que la diferenciación de ciertos rasgos fenotípicos de domesticación acompañó a la diferenciación genética. Algunos de estos rasgos podrían haber sido el aroma y el sabor del vino como potenciales fenotipos de selección (Hyma y col., 2011).

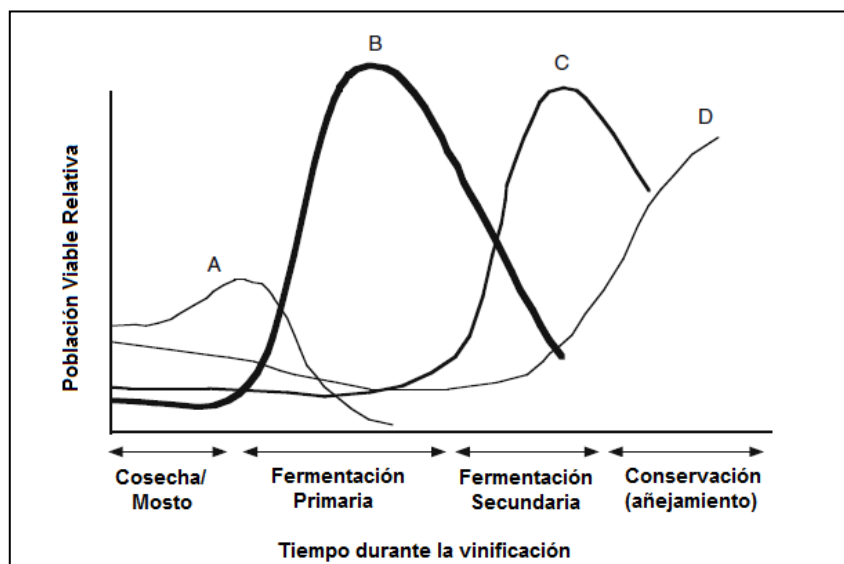
### 1.4.2 *Saccharomyces en vino*

El vino es un producto natural que resulta de varias reacciones bioquímicas, que comienzan durante la maduración de las uvas y continúan durante la cosecha, a lo largo de la

fermentación alcohólica, el aclarado y después del embotellado. Incluso si el mosto de uva representa un medio de crecimiento completo, sólo un número limitado de especies microbianas son capaces de crecer como consecuencia de sus bajos valores de pH y alto contenido de azúcar. Por lo tanto, de todos los microorganismos presentes en las uvas, las levaduras son los principales agentes de la transformación bioquímica del mosto de uva en vino (Romano, Capece y Jespersen, 2006).

Durante la maduración de las uvas, la densidad poblacional de las distintas especies de levaduras sobre la superficie de las bayas, puede estar influenciada por los cambios climáticos (lluvias), principalmente en momentos cercanos a la cosecha o por la utilización de agroquímicos (antifúngicos). Sin embargo, en estos estadíos es dificultoso aislar cepas de *Saccharomyces* (Fleet, 1999).

La vinificación comúnmente implica un desarrollo secuencial de microorganismos (Figura 8). En general, las levaduras no *Saccharomyces* son el primer grupo dominante durante la vinificación (Figura 8.A), seguido luego por las del género *Saccharomyces* que normalmente completan la fermentación alcohólica (Figura 8.B). Después de que la fermentación alcohólica termina, la fermentación maloláctica puede ser inducida por *Oenococcus* u otras bacterias de ácido láctico (Figura 8.C). Durante el envejecimiento de los vinos, pueden crecer diferentes levaduras y bacterias, muchas de ellas dan lugar a deterioro (Figura 8.D) (Fugelsang y Edwards, 2007).



**Figura 8:** Crecimiento generalizado de (A) levaduras no-*Saccharomyces*, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni*, y (D) levaduras contaminantes y/o bacterias durante el proceso de vinificación. Adaptado de Fugelsang y Edwards, 2007.



Según algunos autores, las levaduras indígenas pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*, entre otros, son las que crecen en los estadios tempranos de la fermentación, pero son rápidamente reemplazadas por la especie *S. cerevisiae*, quien completa el proceso (Combina y col., 2005; Le June y col., 2006)

Cuando comienza el proceso de fermentación el mosto de uva sufre transformaciones que van cambiando sus características. A medida que el proceso de fermentación va transcurriendo, el establecimiento de condiciones anaeróbicas, la actividad antimicrobiana del dióxido de azufre añadido, el agotamiento de los nutrientes y los niveles crecientes de etanol aumentan la selectividad del medio. Las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en el zumo de uva, podrían proliferar hasta poblaciones finales de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  ufc/mL, pero comienzan a declinar a mediados de la fermentación, cuando la producción de etanol por *S. cerevisiae* supera el 5-7%. La producción de etanol por *S. cerevisiae* es el principal factor que afecta el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* (Fugelsang y Edwards, 2007).

Durante las últimas etapas de la fermentación del vino natural las cepas fuertemente fermentativas del grupo de levaduras vínicas *Saccharomyces sensu stricto*, que son más tolerantes al etanol y más competitivas para el crecimiento en medios con alto contenido de azúcar, se vuelven dominantes ( $10^7$ - $10^8$  ufc/mL) y completan la fermentación (Romano, Capece y Jespersen, 2006). Este grupo comprende a *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* y *S. pastorianus*, asociadas a la fermentación vínica y tres nuevas especies *S. cariocanus*, *S. mikatae* y *S. kudriavzevii* (Naumov y col., 2000).

De esta forma, aunque sobre la uva no sean detectables (o cultivables) levaduras del género *Saccharomyces*, su aparición y dominio a lo largo de fermentaciones espontáneas del mosto es determinante (Combina y col., 2005).

A pesar de la utilización actual de levaduras comerciales (*starters*) su uso no garantiza la conducción de la fermentación y el crecimiento de levaduras indígenas provenientes de los viñedos o de las instalaciones y equipamientos de las bodegas puede afectar el proceso de conducción de las cepas comerciales (Lopes y col., 2007). Estos autores demostraron que cepas autóctonas seleccionadas presentaron mejores características de conducción de una vinificación que *starters* comerciales, incluso en su dominio sobre otras especies nativas, apoyando la hipótesis de que estas levaduras estarían más adaptadas a las características particulares de una determinada región productora de vino que cepas comerciales foráneas.

### 1.4.3 Adaptaciones evolutivas

Se sabe que existen varios mecanismos involucrados en la adaptación evolutiva de las levaduras al proceso de fermentación, como duplicación genética, poliploidía, rearrreglos cromosómicos, hibridación interespecífica e introgresión (Rainieri y Pretorius, 2000; Barrio y col., 2006).

Estudios biogeográficos revelaron que la especie *S. cerevisiae* está conformada por dos poblaciones que son filogenéticamente distintas, "domesticada" y "salvaje". Estas poblaciones probablemente derivan de la duplicación de todo el genoma de una cepa ancestral común. En particular, para las cepas vínicas de *S. cerevisiae* se estableció un origen geográfico a escalas regionales y globales que sugiere que las diferentes cepas evolucionaron de forma independiente durante mucho tiempo, modificando la cantidad de algunos genes importantes para la persistencia en nichos ecológicos específicos que representan hoy un reservorio de levaduras naturales. Estudios de genómica comparativa destacaron que las cepas vínicas de *S. cerevisiae* se diferencian no sólo por su origen, sino también por las transferencias genéticas de otras levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) y bacterias (Tofalo y col., 2013).

Así, aunque *S. cerevisiae* es la levadura predominante en la mayoría de los procesos de fermentación, híbridos interespecíficos dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto* han sido encontrados en diferentes procesos fermentativos (González y col., 2006) demostrando que éste es uno de los mecanismos más interesantes observados en su adaptación a los procesos industriales (de Barros Lopes y col., 2002). Por ejemplo, se demostró que la hibridación entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* pudo haber ocurrido en varias ocasiones por apareamientos entre *S. cerevisiae* vínicas diploides y *S. kudriavzevii* haploides o diploides. Después de la hibridación, el genoma híbrido habría sufrido reordenamientos genómicos aleatorios mediados por entrecruzamientos entre cromosomas homólogos y no disyunción, promoviendo la pérdida de fracciones variables de los subgenomas parentales. Tanto las restricciones impuestas por las interacciones entre los dos genomas parentales, así como entre los genomas nucleares y mitocondriales, junto con las condiciones ambientales imperantes durante fermentaciones selectivas, habrían modulado la composición final de los genomas híbridos, caracterizada por el mantenimiento del genoma de *S. cerevisiae* y la progresiva reducción de la contribución de *S. kudriavzevii* (Peris y col., 2012).

#### **1.4.4 Efecto Crabtree**

Aparentemente, la capacidad de producir etanol en condiciones aeróbicas y desde fuentes ricas en azúcares, habría aparecido como una adaptación evolutiva en la competencia por nichos ecológicos. Esta característica, llamada “Efecto Crabtree”, habría permitido, en un nicho determinado como las frutas maduras, aparecidas a fines del Cretáceo hace más de 125 millones de años, la rápida disminución de las importantes fuentes carbonadas como los azúcares y el aumento de etanol, nocivo para especies no resistentes, especialmente bacterianas, y que luego podría haber sido nuevamente usado por las mismas especies de levaduras que lo habrían producido. De esta forma, se habría establecido la dominancia en la competencia por el nicho, con la capacidad de consumir el carbono restante, al ser las únicas especies resistentes al medioambiente generado (Dashko y col., 2014). Así, la represión del metabolismo aeróbico por altas concentraciones de glucosa habría sido un mecanismo para promover las vías fermentativas que conducirían a la supervivencia frente a las otras especies microbianas, aún a costa de una menor producción de biomasa. Sin embargo, estas células restantes, tendrían la capacidad de sobrevivir durante más tiempo adaptando su metabolismo al consumo del etanol que ellas mismas habrían producido (Busti y col., 2010).

La historia evolutiva de la familia *Saccharomycetaceae* se remonta a unos 200 millones de años. Filogenéticamente, el origen del Efecto Crabtree podría tener lugar en el intervalo de tiempo que abarca desde el origen de la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas hasta la pérdida del Complejo I de la cadena respiratoria, hace aproximadamente 125 millones años. Por otra parte, esta capacidad fermentativa parecería estar continuamente activa, en tanto que el metabolismo oxidativo se vuelve inactivo a altas concentraciones de azúcar (Tofalo y col., 2013).

Otros eventos metabólicos y genéticos debieron acompañar a este tipo de comportamiento. El rápido consumo de glucosa podría haber sido una de las estrategias competitivas, generando una menor disponibilidad de la misma para los competidores. De esta forma, la duplicación de los genes de los transportadores de glucosa podría representar uno de los orígenes moleculares para el aumento inicial de la capacidad de consumir glucosa, o al menos, de disminuir su disponibilidad para los otros microorganismos. Sin embargo, el aumento de glucosa intracelular, aceleraría el flujo de carbono a través de la glucólisis, llevando a un aumento en la cantidad de piruvato, saturando así la capacidad del complejo multienzimático mitocondrial piruvato deshidrogenasa, PDH, luego de su transporte a la mitocondria a través del transportador de piruvato. Este complejo tiene una alta afinidad por el piruvato a velocidades de glucólisis moderadas. Al aumentar la cantidad de glucosa intracelular, la velocidad de la

glucólisis aumentaría, saturando el complejo y desviando el flujo de carbono hacia la formación de etanol, favoreciendo de esta forma, la fermentación anaeróbica (Rosa y Gábor, 2006).

Como todas las levaduras capaces de desarrollar el efecto Crabtree (Tabla 1), *S. cerevisiae* transporta hexosas desde el medio extracelular exclusivamente por difusión facilitada, aunque tiene sistemas de simporte con H<sup>+</sup> para disacáridos como maltosa. Esta especie ha desarrollado una inusual diversidad de proteínas transportadoras de hexosas (Hxtp) con propiedades cinéticas específicas individuales.

**Tabla 1. Levaduras capaces de desarrollar o no el Efecto Crabtree.**

Modo de Fermentación	
Crabtree Positivas	Crabtree Negativas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Hansenula neofermentans</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>

Levaduras que desarrollan Metabolismo Fermentativo frente a altas concentraciones de azúcares (Efecto Crabtree). Adaptado de Rodicio & Heinisch, 2009.

## 1.5 Transportadores De Membrana en *Saccharomyces cerevisiae*

Por comparaciones filogenéticas del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, y, teniendo en cuenta los algoritmos que identificaban secuencias transmembrana, pudieron identificarse los genes codificantes para transportadores, los que actualmente forman la MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Dentro de este grupo, una de las Familias principales fue la de los Transportadores de Hexosas (Nelissen y col., 1995).

Generalmente, estas permeasas consisten en una única proteína integral de membrana con dos conjuntos de seis  $\alpha$ -hélices transmembrana hidrófobas conectadas por un bucle hidrófilo. Muchos transportadores de monosacáridos en levaduras operan por difusión facilitada, un mecanismo independiente de la energía que cataliza el movimiento de una sola molécula de soluto por vez a favor de su gradiente de concentración, a través de una membrana (Leandro, Fonseca y Gonçalves, 2009).

Actualmente y en base a datos filogenéticos y funcionales, los transportadores de membrana de los seres vivos son clasificados dentro de importantes bases de datos. El Sistema de Clasificación de Transportadores (TC) se utiliza como un catálogo de proteínas transportadoras transmembrana. Entre estas bases de datos se encuentran “Regulatory Sequence Analysis Tools” (RSAT) y “Transporter Classification Data Base” (TCDB), entre otros

(Leandro, Fonseca y Gonçalves, 2009). Este último sistema codifica los transportadores de membrana de manera semejante al Sistema Internacional para Enzimas (EC), con números que indican *clase, subclase, familia (o superfamilia), subfamilia (o familia en el caso anterior de superfamilia) y sistema de transporte* (Saier y col., 2014).

La familia 2.A.1, llamada Superfamilia Principal de Transportadores (MFS), está formada por permeasas que exhiben especificidad para azúcares, polioles, medicamentos, neurotransmisores, metabolitos del ciclo de Krebs, productos intermedios glicolíticos fosforilados, aminoácidos, péptidos, osmolitos, sideróforos (eflujo), sideróforos de hierro (absorción), nucleósidos, aniones orgánicos, aniones inorgánicos, etc. La mayoría de los transportadores de hexosas presentes en la membrana de *Saccharomyces* se encuentran dentro de este grupo ([www.tcdb.org](http://www.tcdb.org)).

Dentro de esta Superfamilia, *S. cerevisiae* cuenta con una familia de genes que codifica 20 proteínas transmembrana transportadoras de hexosas y otras proteínas relacionadas. Esta familia está basada en la similitud de secuencias, en la función relacionada al transporte de hexosas y en su regulación funcional (Boles y Hollenberg, 1997). De esta familia de genes, sólo los que codifican los transportadores *HXT1-HXT7* son importantes para el crecimiento y el metabolismo de la glucosa (Reifenberger, Freidel y Ciriacy, 1995; Diderich y col., 1999). De todos estos genes, la sola expresión de *HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6* o *HXT7* es suficiente para permitir la utilización sustancial de la glucosa, aunque en diferentes grados, lo que no sucede con el resto de los transportadores (Reifenberger, Freidel y Ciriacy, 1995).

El transportador de galactosa, codificado por *GAL2*, es también un miembro de la familia de genes *HXT* (Nehlin, Carlberg y Ronne, 1989; Szkutnicka y col., 1989). Dos miembros de la familia, codificados por *SNF3* y *RGT2*, han perdido la capacidad de transporte de hexosas; en su lugar, funcionan como sensores de la concentración extracelular de glucosa. Esta señal de glucosa está implicada en la regulación de la expresión de diversos genes *HXT* (Özcan y Johnston, 1999). Los restantes miembros de la familia (*HXT8-HXT17*) son fenotípicamente silenciosos, y no se pueden expresar en condiciones fisiológicas normales (Diderich y col., 1999; Dickinson y Kruckeberg, 2006). La presencia en *Saccharomyces* de un sistema de transporte de azúcares tan complejo puede reflejar la necesidad de este microorganismo de hacer frente a la extremadamente amplia gama de concentraciones a las que está expuesto en su hábitat natural. De hecho, las células de levadura pueden metabolizar la glucosa de manera eficiente en un amplio intervalo de concentraciones de azúcares, desde unos pocos micromolares hasta por encima de 1,5 M (Busti y col., 2010).

Las células de levadura expresan sólo los transportadores de glucosa más apropiados para la cantidad de azúcar disponible en todo momento en el medio ambiente. Este patrón es debido a la acción combinada de diferentes mecanismos de regulación, incluyendo la regulación transcripcional de los genes principales *HXT* en respuesta a la glucosa (Özcan, Dover y Johnston, 1998; Johnston y Kim, 2005) y la inactivación de proteínas Hxtp en condiciones apropiadas. Por otra parte, la velocidad de transporte de azúcares está determinada tanto por la actividad como por el número de transportadores de hexosas en la membrana plasmática (Luyten, Riou y Blondin, 2002).

Ubicadas en la membrana externa celular, estas 20 proteínas transportadoras de hexosas están compuestas por 12 segmentos transmembrana altamente conservados (Figura 9). Un agrupamiento de al menos cinco de estas hélices transmembrana forma un poro acuoso, capaz de transportar glucosa a través de uniones de Hidrógeno a los oxhidrilos y amidas de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la pared de este canal. Las regiones amino y carboxilo terminal están del lado citosólico de la membrana (Boles y Hollenberg, 1997).

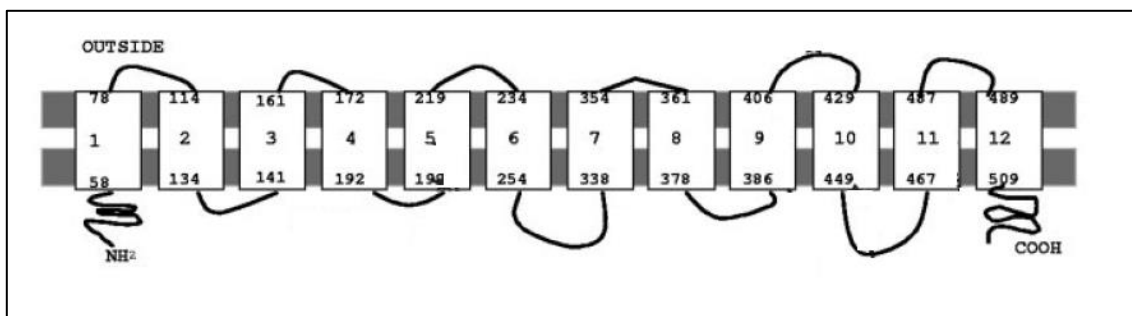


Figura 9: Modelo propuesto para los transportadores de hexosas. (Adaptado de Guillaume y col., 2007)

La expresión de cualquiera de los genes *HXT1, 2, 3, 4, 6* ó *7*, es suficiente para permitir la utilización sustancial de la glucosa, aunque en varios niveles diferentes, indicando que las proteínas codificadas por estos 6 genes son los principales transportadores de glucosa en *S. cerevisiae* (Boles y Hollenberg, 1997). Los patrones de expresión y las funciones de los transportadores de hexosa codificados por los genes *HXT8* a *HXT17* aún no están apropiadamente definidos (Horák, 2013).

La afinidad de cada transportador Hxtp por la glucosa es diferente. Hxt1p y Hxt3p tienen una baja afinidad ( $K_m \approx 100$  mM), mientras que Hxt2p, Hxt6p, y Hxt7p tienen una alta afinidad ( $K_m \approx 1$  mM) (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997). Los transportadores de baja afinidad se expresan a altas concentraciones de glucosa (por ejemplo, al inicio en un cultivo en glucosa por

lotes o en cultivo en quimiostato con altas concentraciones de glucosa residuales), mientras que los transportadores de alta afinidad se expresan a bajas concentraciones de glucosa (Diderich y col., 1999). De esta forma, la afinidad del transporte celular para la glucosa es adecuada según la concentración de glucosa en el medio ambiente. Esta regulación se consigue por la acción combinada del sistema de transducción de señales *Snf3/Rgt2* (Özcan y Johnston, 1999) y por la represión por glucosa de los genes de los transportadores de glucosa de alta afinidad.

Así, el ajuste de la afinidad al transporte de glucosa se realiza a través de:

1. La regulación de la expresión de los transportadores de hexosas.
2. La remoción e inactivación de las proteínas transportadoras.
3. La modulación de la afinidad de transportadores específicos.
4. La interacción entre distintas proteínas transportadoras.

Según Busti y colaboradores (2010), la regulación de la expresión de estos transportadores por diferentes niveles de glucosa, estaría dada por cinco mecanismos diferentes:

- I. **Inducción por altas concentraciones de glucosa:** *HXT1* (Özcan, 1995; Diderich, 1999; Zaman, 2009).
- II. **Inducción sólo por niveles bajos de glucosa:** *HXT2* y *HXT4* (Ozcan, 1996; Zaman, 2009).
- III. **Inducción independiente de la concentración de glucosa:** *HXT3* (Özcan, 1995; Diderich, 1999; Zaman, 2009).
- IV. **Represión por altos niveles de glucosa:** *HXT6* y *HXT7* (Liang, 1996; Diderich, 1999; Ye, 2001; Zaman, 2009).
- V. **Regulación independiente de la concentración de glucosa:** *HXT5* (Diderich, 1999; Diderich, 2001; Zaman, 2009; Greatrix, 2006).

Actualmente se considera que la Familia *HXT* consta de dos grupos bien definidos y que cada grupo contiene elementos comunes a varias líneas fúngicas, sugiriendo que estos dos grupos se formaron antes de la divergencia entre estas líneas. El primer grupo contiene 18 genes *S. cerevisiae HXT* (*HXT1-17* y *GAL2*) y sus homólogos en otras especies. Este grupo constituye la "Subfamilia Transportadores", porque la mayoría de los productos de estos genes en *S. cerevisiae* están directamente involucrados en el transporte de glucosa a través de la membrana celular (Boles y Hollenberg, 1997). El segundo grupo está formado por los genes *Snf3* y *Rgt2* de *S. cerevisiae* y sus homólogos en otros linajes de hongos. Debido a que las proteínas que codifican *Snf3* y *Rgt2* son sensores que reconocen la concentración de glucosa extracelular en *S. cerevisiae* (Boles y Hollenberg, 1997; Ozcan y Johnston, 1999), este grupo se denomina

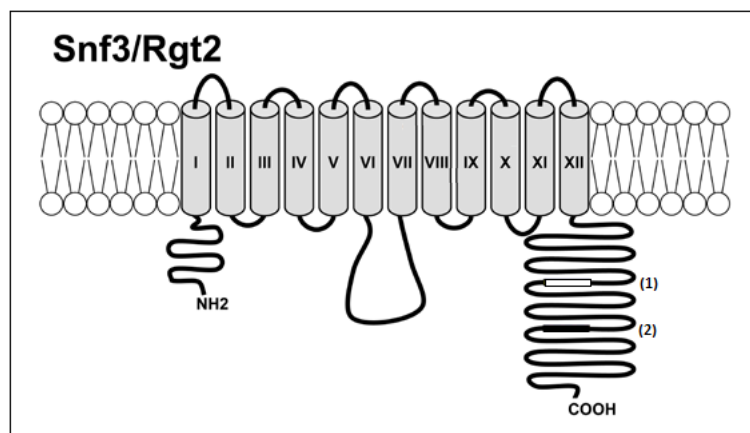
“Subfamilia Sensores”. Este grupo contiene sólo dos copias de los genes en la mayoría de las especies estudiadas. En contraste, el número de genes de la “Subfamilia Transportadores” varía extensamente entre las levaduras, en *S. cerevisiae* algunos de sus miembros tienen hasta 18 copias (Lin y Li, 2011).

### 1.5.1 Subfamilia Sensores

#### *Snf3 y Rgt2*

A pesar de su alta similitud con los transportadores de glucosa (Hxt), Snf3 y Rgt2 parecen haber perdido la capacidad de importar azúcares dentro de la célula (Wieczorke y col., 1999), (Ozcan, Dover y Johnston, 1998) y funcionan como receptores que sensan la glucosa extracelular. En particular, Rgt2 parece ser un receptor de altas concentraciones de glucosa necesario para la inducción máxima de *HXT1* (transportador de baja afinidad), mientras que Snf3 es un sensor de alta afinidad, necesario para la transcripción de los genes *HXT2* y *HXT4* (transportadores de afinidad moderada) capaz de responder a los bajos niveles de la glucosa (Ozcan, Dover y Johnston, 1998), (Ozcan y Johnston, 1996).

En la Figura 10 se muestra un esquema de ambos sensores. Los dominios transmembrana estimados aparecen numerados del I al XII. El recuadro blanco (1) indica una secuencia repetida de 25 aminoácidos en la cola carboxilo-terminal de ambos Rgt2p y Snf3. Una segunda copia, sombreada en color negro (2), también está presente en el extremo carboxilo terminal de Snf3.



**Figura 10:** Esquema topológico en dos dimensiones de los sensores de glucosa Rgt2p y Snf3p, basado en el modelo de los transportadores de glucosa GLUT1 de mamíferos (Ver texto). Adaptado de Busti y col., 2010.



La activación de Rgt2p por altas concentraciones de glucosa media la inducción del gen *HXT1*. Las señales generadas en la membrana plasmática se traducen a Rgt1p, una proteína zinc-finger perteneciente a una familia de factores de transcripción que se une directamente a los promotores de *HXT1*, 2 y 4. Rgt1p puede actuar como activador (en presencia) o represor de la transcripción, en ausencia de glucosa.

Normalmente, Snf3p es activado sólo por bajos niveles de glucosa, en tanto que Rgt2p es activado sólo por altos niveles de glucosa, produciendo una fuerte señal que convierte a Rgt1p en un activador transcripcional. Altos niveles de glucosa reprimen la transcripción de *Snf3* mientras que la expresión de *Rgt2* es constitutiva, (Boles y Hollenberg, 1997).

### **1.5.2 Subfamilia Transportadores**

#### ***HXT1***

El gen *HXT1* codifica una proteína de 569 aminoácidos con capacidad de transportar hexosas a través de la membrana. Su localización está en el brazo derecho del cromosoma VIII (Boles y Hollenberg, 1997). Este transportador es miembro de la Superfamilia de Transportadores de Hexosas (código TCDB 2.A.1.1.108).

Este transportador muestra una extremada baja afinidad por glucosa, fructosa y manosa ( $Km_{(gluc)} = 100 \text{ mM}$ ;  $Km_{(fruct)} > 300 \text{ mM}$ ) (Boles y Hollenberg, 1997; Reifengerger, Boles y Ciriacy, 1997; Maier y col., 2002). La expresión de *HXT1* es inducida unas 300 veces por altos niveles de glucosa ( $>200 \text{ mM} \approx 36 \text{ gL}^{-1}$ ), pero no por galactosa, maltosa o rafinosa. Por su baja afinidad, este transportador está presente en el crecimiento a altas concentraciones de glucosa (Özcan y Johnston, 1995; Boles y Hollenberg, 1997). Sin embargo, algunos autores encontraron que la pérdida del gen *HXT1* conduce a la disminución en el transporte de alta afinidad de la glucosa y manosa, pero no fructosa (Lewis y Bisson, 1991).

Esta inducción parece estar regulada no sólo por la concentración de hexosa, sino también por el estado de crecimiento (Ko, Liang y Gaber, 1993), ya que no se expresa durante la fase estacionaria, aun cuando las concentraciones de azúcares sean elevadas (Luyten, Riou y Blondin, 2002). En estudios de fermentaciones en mosto sintético, su expresión fue muy alta al comienzo de la fermentación y disminuyó rápidamente durante la fase de crecimiento, sin jugar ningún papel durante la fase estacionaria (Perez y col., 2005).

Se ha demostrado que el gen *HXT1* es inducible por estrés osmótico y que se requiere de los efectos combinados de la glucosa y el estrés osmótico (vía HOG) para su plena inducción, por lo que se expresa altamente en las primeras horas de la fermentación (Tomás-Cobos y col., 2004). Estos autores determinaron que la regulación de la expresión *HXT1* se logra por dos

factores de transcripción independientes, Rgt1 y Sko1, controlados por la vía de inducción por glucosa y por la vía de señalización HOG, respectivamente. De esta forma, la inducción de la expresión génica de *HXT1* en respuesta a la glucosa y en respuesta al estrés osmótico (proporcionado por la glucosa presente) requiere la actividad coordinada de dos vías de señalización independientes que convergen en el nivel de promotor de *HXT1*.

Hxt1p es el principal contribuyente al transporte de azúcar en el comienzo del crecimiento, pero no durante la fase estacionaria en la que desaparece totalmente, lo que podría implicar la degradación bajo condiciones de inanición de nitrógeno en presencia de azúcares por endocitosis y autofagia, como fue evidenciado para *HXT7* (Krampe y Boles, 2002), y explicando en cierta medida el patrón de expresión Hxt1p (Perez y col., 2005).

Se encontró que la exposición de las células a etanol 5 % V/V produce una disminución de 6,6 veces en la expresión del gen *HXT1* (Chandler y col., 2004). Estos autores estiman que probablemente los cambios en la membrana lipídica producidos por el etanol podrían afectar el transporte de la glucosa, disminuyendo su captación más allá de la concentración real en el medio. Este efecto llevaría a la célula a entrar en un estado de “pseudo inanición” frente al estrés por etanol, reprimiendo la expresión de los transportadores de menor afinidad e induciendo los de afinidades más elevadas. Por otra parte, Santos y col. (2008), trabajando con un medio que simulaba una detención en la fermentación, conteniendo fructosa y etanol, encontraron que cepas que expresaban sólo *HXT1* tuvieron una disminución en la Velocidad máxima de un 49% cuando estudiaron las células en fase exponencial y de un 64% en células en fase estacionaria, en concordancia con la inhibición de este transportador hacia el final de la fermentación.

## **HXT2**

El gen *Hxt2*, se encuentra localizado en el brazo derecho del cromosoma XIII. Su expresión genera una proteína de 541 aminoácidos que funciona como un transportador de alta afinidad para glucosa, fructosa y manosa (Boles y Hollenberg, 1997).

A diferencia del resto de los transportadores de hexosas la afinidad de Hxt2p es dependiente de las condiciones de crecimiento. Luego de crecimiento en 100 mM de glucosa ( $18 \text{ gL}^{-1}$ ) el valor para el  $K_m$  es de 10 mM. Sin embargo, las células crecidas en bajas concentraciones de glucosa (5 mM,  $0,9 \text{ gL}^{-1}$ ) mostraron cinéticas de captación bifásicas con un componente de alta afinidad ( $K_m = 1,5 \text{ mM}$ ) y uno de baja afinidad ( $K_m = 60 \text{ mM}$ ). De esta forma, se deduce que los parámetros cinéticos de este transportador pueden ser modulados según las condiciones de crecimiento (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997; Maier y col., 2002).

Hxt2p es una proteína integral de la membrana plasmática. Migra en SDS-PAGE como una banda ancha o una banda doble con un  $M_r = 47000$ . Una posible causa de esta amplia movilidad electroforética es la glicosilación ligada a N en los residuos 82 y 299 (Kruckeberg y Bisson, 1990; Wendell y Bisson, 1993).

La expresión de este transportador es inducida por bajos niveles de glucosa y reprimida por altas concentraciones de este azúcar (Özcan y Johnston, 1995). Se expresa en forma transitoria en la fase de latencia, sugiriendo un papel importante en la iniciación de la fase de crecimiento (Perez y col., 2005).

La transcripción de *HXT2* está bajo control de la vía general de represión por glucosa y por la vía de inducción de baja glucosa de Snf3-Rgt1p. En presencia de altos niveles de glucosa, la transcripción de *HXT2* está reprimida por Mig1p. La liberación de la represión por glucosa requiere a función de Snf1p. En ausencia de glucosa, la expresión de *HXT2* está reprimida por el represor Rgt1p (Özcan y Johnston, 1999).

Hxt2p estaría involucrado en el inicio del crecimiento a pesar de la alta concentración de azúcares en el medio (Luyten, Riou y Blondin, 2002), retornando a bajos niveles durante la fase de crecimiento (Perez y col., 2005). Esta inducción transitoria de *HXT2* es algo contradictoria teniendo en cuenta la regulación conocida de este gen, ya que se ha demostrado que es reprimido por altas concentraciones de glucosa. *HXT2* parecía ser capaz de evitar la represión por glucosa durante la fase de latencia, pero vuelve a un estado reprimido cuando el crecimiento comienza nuevamente. Por el contrario, no se observó una inducción de *HXT2* al final de la fermentación, cuando la concentración de hexosa disminuye a niveles inferiores a los necesarios para reprimir el gen (Perez y col., 2005).

### ***HXT3***

Ubicado en el brazo derecho del cromosoma IV, *HXT3* codifica para una proteína de 567 aminoácidos, con un 86,4% de identidad con Hxt1p. Su producto, Hxt3p, es un transportador de hexosas de baja afinidad, con una  $K_m$  muy alta para glucosa, cercana a 60 mM (Boles y Hollenberg, 1997). La presencia de glucosa genera una señal suficiente para inducir la expresión de *HXT3* aproximadamente 10 veces (Maier y col., 2002). Su inducción por bajos niveles de glucosa es parcialmente dependiente de la vía Snf3p-Rgt1p. A altos niveles de glucosa, la inducción de la transcripción de *HXT1* y *HXT3* es diferente (Boles y Hollenberg, 1997). Aunque

su afinidad sea semejante a la de Hxt1p, la presencia de Hxt3p es esencial para la fermentación normal (Luyten, Riou y Blondin, 2002). Se ha demostrado que este gen tiene su máxima expresión al comienzo de la fase estacionaria durante la fermentación del vino, cuando comienza la detención del crecimiento (Riou y col., 1997), y esto puede explicar la mayor capacidad de este transportador para mantener una alta velocidad de fermentación a lo largo de esta fase. Luego, su abundancia disminuye (Perez y col., 2005).

La inducción de *HXT3* en la primera parte de la fermentación es consistente con la expresión de este gen y está generada por altas cantidades de azúcares (Perez y col., 2005). Estos autores encontraron que la inducción de *HXT3* es bastante lenta, y se produce bajo un patrón que sugiere que la expresión de este gen depende de la etapa de crecimiento, asociándose ligeramente con la detención del mismo. Aunque con ligeras diferencias, la expresión de *HXT3* parece ser constitutiva (Greatrix y van Vuuren, 2006).

Santos y col. (2008), estudiando el efecto de un medio que simulaba la detención de una fermentación, compuesto por fructosa y etanol, observaron una fuerte inhibición de la Velocidad máxima en células que expresaban a *HXT3* como único transportador, de un 59% en células en fase exponencial y de un 75% en células en fase estacionaria, correspondiéndose al perfil presentado para un transportador de baja afinidad.

#### ***HXT4***

El gen *HXT4* se encuentra ubicado en el brazo derecho del cromosoma VIII. El transportador Hxt4p es una proteína que consta de 576 aminoácidos, con una similitud de un 83,4% con *HXT6/7*. Hxt4p tiene una afinidad moderadamente alta por la glucosa ( $K_m \approx 9$  mM) y baja afinidad por fructosa ( $K_m \approx 50$  mM). Su expresión, como transportador único, no permite restablecer el crecimiento de la cepa nula *hxt1-7* (Boles y Hollenberg, 1997).

El gen *HXT4* es inducido por bajos niveles de glucosa y está bajo el control de la inducción por glucosa-Snf3p-Rgt1p y por la vía general de represión por glucosa.

Su regulación transcripcional se parece a la de *HXT2* (Boles y Hollenberg, 1997). Al igual que este transportador, su expresión es inducida por bajos niveles de glucosa y reprimida por altas concentraciones de este azúcar (Özcan y Johnston, 1995). Sin embargo, en un medio con baja cantidad de hexosa y conteniendo etanol, células que expresaban *HXT4* como único transportador, mostraron una inhibición de la velocidad máxima de crecimiento de un 74% cuando fueron estudiadas en fase exponencial y de un 54% cuando fueron estudiadas en fase estacionaria (Santos y col., 2008), exhibiendo una mayor resistencia en fase estacionaria.

Al igual que *HXT2*, su expresión se induce cuando las concentraciones de azúcares extracelulares son menores al 2% (Greatrix y van Vuuren, 2006).

### **HXT5**

El gen *HXT5* se encuentra en el brazo derecho del cromosoma VIII, y codifica para una proteína de 592 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997), unos 20 aminoácidos más largo, principalmente en el dominio amino terminal intracelular, que el resto de los otros transportadores (Verwaal y col., 2002). Hxt5p es un transportador de hexosa funcional con una afinidad moderada por la glucosa ( $K_m = 10$  mM) que se expresa al máximo en condiciones que causan un crecimiento lento, como aumentos en la temperatura o la osmolaridad (Gasch y col., 2000), así como el crecimiento en presencia de etanol o glicerol (Greatrix y van Vuuren, 2006) o un agotamiento de la glucosa (Diderich y col., 2001; Verwaal y col., 2002). La inducción de *HXT5* cuando la glucosa se agota es una función de la tasa de crecimiento y es independiente de la vía de activación por disminución de glucosa.

El promotor de *HXT5* contiene dos elementos de respuesta a estrés (STREs) y dos sitios de HAP2/3/4/5, que median la regulación de la transcripción de genes implicados en la respiración y otras funciones según las fuentes de carbono. Su delección produce la incapacidad para crecer en fuentes de carbono no fermentables, donde la fosforilación oxidativa es esencial para la producción de energía (Olesen y Guarente, 1990). Contiene además un elemento de unión PDS (Post Diauxic Shift) que media la activación transcripcional en respuesta a la limitación nutricional (Boorstein y Craig, 1990). De esta forma, estos elementos transcripcionales pueden incluso ser activados bajo condiciones que causan bajas tasas de crecimiento para inducir la expresión de *HXT5* (Verwaal y col., 2002; Verwaal y col., 2004).

### **HXT6 y HXT7**

Los genes *HXT6* y *HXT7* están unidos en tándem en el brazo derecho del cromosoma IV (Maier y col., 2002). Hxt6p y Hxt7p están altamente relacionados. Ambos son proteínas de 570 aminoácidos y difieren en sólo 2 residuos, 293(Val/Ile) y 556(Thr/Ala) (Boles y Hollenberg, 1997). Sin embargo, diferencias corriente arriba en estos genes, indican que su regulación es diferente (Reifenberger, Freidel y Ciriacy, 1995).

A diferencia de los otros genes *HXT*, *HXT6* y *HXT7* son altamente expresados también en fuentes de carbono no fermentables, como glicerol y etanol, así como en maltosa y galactosa (Boles y Hollenberg, 1997). Hxt6p y Hxt7p son casi idénticas, sin embargo, la expresión de *HXT6* es muy baja comparada con *HXT7* (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997).

Hxt6p y Hxt7p son transportadores de alta afinidad con un valor de  $K_m$  de 1-2 mM (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997; Maier y col., 2002).

Estos transportadores muestran perfiles de expresión similares, su expresión se induce al entrar en fase estacionaria persistiendo a lo largo de toda esta fase. La inducción se produce a pesar de la presencia de altas cantidades de hexosas (alrededor de  $150 \text{ gL}^{-1}$ ), y se mantiene estable aún frente a escasez de nitrógeno (Perez y col., 2005).

Por otra parte, estos autores estiman que existen mecanismos de regulación en esta etapa que permiten a estos genes “escapar” de la represión de glucosa.

Se encontró que estos genes son activados frente a exposición de las células a etanol 5%V/V. *HXT6* mostró un aumento en su expresión en 7,5 veces y *HXT7* en 8 veces el valor inicial previo a la exposición (Chandler y col., 2004). Al ser estudiados en un medio que simulaba una parada en una fermentación *Hxt6p* mostró una disminución en su velocidad máxima en un 68% cuando las células fueron estudiadas en fase exponencial y en un 56% en células en fase estacionaria, en tanto que *Hxt7p* disminuyó en un 76% en células en fase exponencial y un 56% en fase estacionaria (Santos y col., 2008). Estas observaciones concuerdan con la funcionalidad de estos transportadores, inducidos frente a bajas concentraciones de hexosas, hacia el final de una fermentación donde la cantidad de etanol en el medio se vuelve significativa.

*HXT6* es altamente expresado en medios que contienen rafinosa, bajo nivel de glucosa, o fuentes de carbono no fermentables, pero se reprime en presencia de altas concentraciones de glucosa (Liang y Gaber, 1996).

Así como *HXT2*, la expresión de *HXT7* está influenciada por el aumento de pH a través de la vía calcio-calcineurina (Ruiz, Serrano y Ariño, 2008). Sin embargo, *HXT7* es uno de los transportadores de hexosas más abundantemente expresado a bajas concentraciones de glucosa y representa una proporción significativa de la capacidad de transporte de alta afinidad expresado por la levadura. La actividad del centro catalítico de *Hxt7p* es alrededor de cuatro veces mayor que la actividad del centro catalítico previamente determinada para una proteína *Hx2p* (Kruckeberg y col., 1999). Por lo tanto, la contribución de *Hxt7* al total de transporte de glucosa de alta afinidad no es simplemente debido a su alto nivel de expresión, sino que también refleja la alta actividad intrínseca de esta molécula transportadora (Ye y col., 2001). Luego de la caída en la concentración de glucosa, los niveles de RNAm disminuyen rápidamente. Sin embargo, la proteína *Hxt7p* se mantiene estable por un tiempo para ser finalmente endocitada y degradada en vacuola.

## **HXT8 – HXT17**

Aunque filogenéticamente estos genes son semejantes a los de las proteínas transportadoras nombradas hasta ahora, estos transportadores no contribuyen significativamente al transporte catabólico de glucosa.

El gen *HXT8*, se encuentra en la región subtelomérica izquierda del cromosoma X. Hxt8p es una proteína transmembrana de 569 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997) y tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa y manosa (Wieczorke y col., 1999). Sin embargo, no contribuye en forma importante al transporte catabólico de glucosa (Boles y Hollenberg, 1997).

Los genes *HXT9*, *HXT11* y *HXT12*, codifican a un grupo de proteínas muy relacionadas, con más del 97% de identidad entre ellas. Incluso la homología entre las secuencias de sus promotores sugiere que estos genes comparten las mismas señales regulatorias. Bajo condiciones estándar, ninguno de estos tres transportadores contribuye con el transporte catabólico de la glucosa (Boles y Hollenberg, 1997). Hxt9p es un transportador funcional de glucosa, pero su expresión es totalmente independiente de la concentración de glucosa extracelular. Tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa, manosa y galactosa (Wieczorke y col., 1999). *HXT9*, junto con *HXT11*, demostraron responder a factores de transcripción que codifican para proteínas que confieren resistencia a drogas (Pdr1 y Pdr3). La sobreexpresión de estos transportadores produjo en las células una mayor susceptibilidad a drogas como la cicloheximida, sulfometuron metilo, y N-óxido de 4-nitroquinolina, en tanto que la delección de estos genes, aumentó la resistencia a estas drogas (Nourami y col., 1997).

El gen *HXT10* se encuentra ubicado en el brazo izquierdo del cromosoma VI, cerca del centrómero. Al expresarse, genera una proteína transmembrana de 546 aminoácidos, con un 78,8% de identidad con Hxt2p (Boles y Hollenberg, 1997). Este transportador tiene la capacidad de transportar glucosa, fructosa, manosa y galactosa, aunque no bajo condiciones normales (Wieczorke y col., 1999).

El intento de expresar la proteína codificada en el gen *HXT12* no dio resultado, apoyando la hipótesis de que en realidad se trata de un pseudogen (Wieczorke y col., 1999; Lin y Li, 2011). La incapacidad de Hxt12p para restaurar el crecimiento en cepas donde fueron anulados los otros transportadores es causada probablemente por la interrupción de la secuencia el gen *HXT12* por una inserción de 2 pares de bases (Horák, 2013).

Hxt13p contiene 564 aminoácidos y el gen que lo codifica, *HXT13* se encuentra ubicado cerca de la región subtelomérica del cromosoma V (Boles y Hollenberg, 1997). Tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa y manosa pero no galactosa (Wieczorke y col., 1999). La inducción de *HXT13* aumenta frente al crecimiento en etanol o glicerol o ambos (Greatrix y van

Vuuren, 2006). Según estos autores, este sería un transportador de alta afinidad semejante a *HXT2*, *HXT4* o *HXT6/7*.

*Hxt14*, ubicado en el brazo izquierdo del cromosoma XIV, codifica para un transportador de 540 aminoácidos. *Hxt14p* es el miembro más distante de la familia, con menos del 38% de identidad con respecto a los otros transportadores (Boles y Hollenberg, 1997; Lin y Li, 2011).

La ubicación del gen *HXT15* es en la región subtelomérica del cromosoma IV. *Hxt15p* es una proteína de 567 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997). Tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa y manosa pero no galactosa (Wieczorke y col., 1999). Este transportador demostró ser inducido frente a fuentes de carbono no fermentables, como etanol o glicerol o una combinación de ambos (Greatrix y van Vuuren, 2006).

Ubicado en la región subtelomérica del cromosoma X, *HXT16* codifica para una proteína transmembrana de 567 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997). Tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa y manosa pero no galactosa (Wieczorke y col., 1999).

El gen que codifica para *Hxt17* se encuentra en la región subtelomérica del cromosoma XIV. Al expresarse, *HXT17* genera una proteína de 564 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997). Tiene capacidad de transportar glucosa, fructosa y manosa pero no galactosa (Wieczorke y col., 1999). La actividad de este promotor mostró un aumento de unas doce veces en cultivos con rafinosa y galactosa a pH 7,7 (Greatrix y van Vuuren, 2006).

## **GAL2**

El transportador *Gal2p* transporta galactosa por medio de difusión facilitada. Tiene una cinética de captación bifásica, lo que sugiere que la captación de galactosa por *Gal2p* está modulada por otras proteínas. La vía de activación de esta proteína (*Gal1p*-*Gal80p*-*Gal14p*) requiere de galactosa intracelular, lo que sugiere que la galactosa debe entrar primero por otra vía (HXTs en muy baja cantidad). La inactivación de *Gal2p* se produce por proteólisis vacuolar luego de internalización por endocitosis. Su diferencia con los transportadores HXTps es de sólo 2 aminoácidos (Boles y Hollenberg, 1997). Este transportador también es capaz de transportar la glucosa con alta afinidad con los mismos valores de *K<sub>m</sub>* que tienen *Hxt6p* y *Hxt7p*. La expresión del gen *GAL2* sólo se produce en presencia de galactosa (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997; Platt y Reece, 1998).

De esta forma, los transportadores implicados en el consumo catabólico de hexosas pueden ser agrupados en tres grupos. *Hxt6* y *Hxt7* incluyendo *GAL2* como transportadores de



alta afinidad, Hxt2 y Hxt4 como transportadores de mediana afinidad y Hxt3 y Hxt1 como transportadores de baja afinidad (Maier y col., 2002).

Las principales características de cada transportador se presentan en forma resumida en la Tabla 2.

**Tabla 2. Características de los principales transportadores de azúcares en levaduras**

Transportador de hexosa	Afinidad por Glucosa <sup>a</sup>	Regulación por glucosa <sup>b</sup> (cepas de laboratorio)	Expresión durante la fermentación <sup>c</sup> (cepas vínicas)
Hxt1	Baja	Inducido por alta [glucosa]	Comienzo de la fermentación
Hxt2	Moderada	Inducido por alta [glucosa] Reprimido por alta [glucosa]	Fase Lag
Hxt3	Baja	Inducido por alta y baja [glucosa]	A lo largo de la fermentación
Hxt4	Moderada	Inducido por baja [glucosa] Reprimido por alta [glucosa]	Inducido durante la fase de crecimiento
Hxt5	Moderada Alta	No regulado por glucosa Regulado por la velocidad de crecimiento	No inducible
Hxt6	Alta	Inducido por baja [glucosa] Reprimido por alta [glucosa]	Inducido en fase estacionaria
Hxt7	Alta	Inducido por baja [glucosa] Reprimido por alta [glucosa]	Inducido en fase estacionaria

<sup>a</sup>Reifenberger y col. (1997), Maier y col. (2002), Verwaal y col. (2002)

<sup>b</sup>Boles & Hollenberg (1997), Özcan & Johnston (1999)

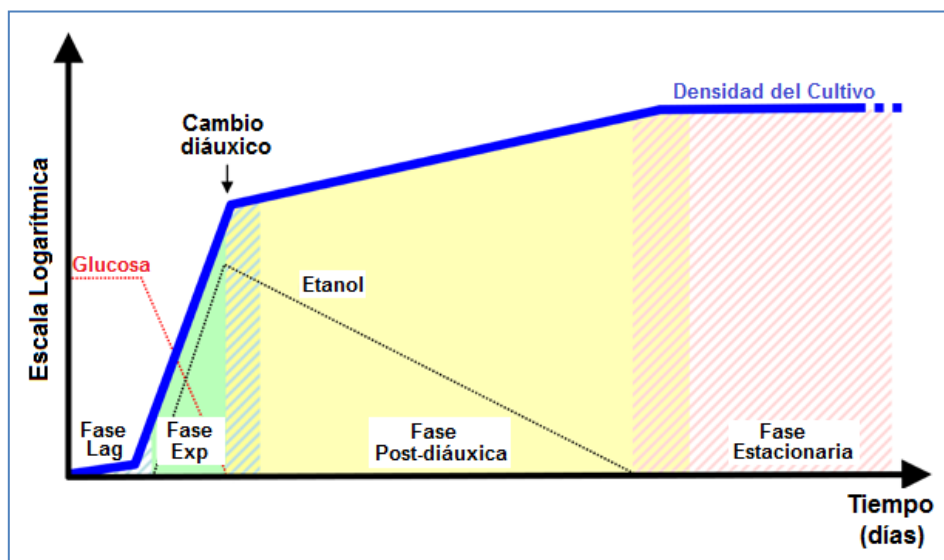
<sup>c</sup>Luyten y col. (2002), Perez y col. (2005)

Adaptado de König, Unden y Frohlich, "Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine", 2009.

## 1.6 Metabolismo Fermentativo/Respiratorio: El cambio diáuxico

Se define de esta forma a la remodelación metabólica que se produce en las levaduras al pasar de un metabolismo totalmente fermentativo a un metabolismo respiratorio.

Cuando células de levadura quiescentes en estado estacionario son incorporadas a un medio rico en azúcares (glucosa), exhiben una Fase Lag inicial de longitud variable. Durante la Fase Exponencial posterior, proliferan rápidamente por fermentación de la glucosa a etanol. Cuando la glucosa se vuelve limitante, las células detienen transitoriamente su crecimiento ajustando su metabolismo de un modo fermentativo a uno respiratorio (Cambio Diáuxico). Luego del cambio a metabolismo respiratorio, las células reinician su crecimiento a una velocidad reducida, consumiendo lentamente el etanol acumulado en el medio. Cuando el etanol también se extingue, las células cesan de dividirse y entran en un estado de reposo denominado Estado Estacionario (Figura 11) (Busti y col., 2010; Galdieri y col., 2010).



**Figura 11:** Perfil de las Fases Metabólicas de células de *S. cerevisiae* en un medio rico en glucosa. Adaptado de Busti y col. (2010).

Cuando las células se aproximan al cambio diáuxico y a la fase estacionaria, acumulan moléculas de almacenamiento como glucógeno, trehalosa, triacilgliceroles y probablemente también polifosfato. Aunque la acumulación de glucógeno ocurre antes de la caída en la concentración de glucosa y tiene un pico en el cambio diáuxico, la trehalosa se acumula después del cambio diáuxico, en la fase estacionaria temprana.

La transición de la fermentación anaeróbica de la glucosa a etanol a la respiración oxidativa del etanol requiere una remodelación a gran escala del aparato metabólico. De hecho, la reprogramación metabólica que tiene lugar durante el cambio diáuxico está asociada con un importante cambio en el patrón de la expresión génica. Antes del cambio, la expresión es máxima para aquellos genes involucrados en el alto flujo y la baja eficiencia metabólica que lleva a la fermentación. Al mismo tiempo, los transportadores y kinasas de baja afinidad tienen su máxima transcripción. En cambio, los genes sujetos a represión por glucosa son mínimamente expresados. Cuando el cambio diáuxico se ha completado, el patrón de expresión cambia a favor de los transportadores y kinasas de alta afinidad y a los genes de alta eficiencia y bajo flujo que de la vía de oxidación respiratoria (Brauer y col., 2005). Dado que la glucosa en el medio de crecimiento continúa disminuyendo, este cambio fisiológico a un modo respiratorio maximiza la eficiencia en la obtención de energía.

De esta forma, Brauer y col. (2005) proponen la existencia de dos diferentes tipos de mecanismos regulatorios que se ponen en juego cuando un cultivo experimenta el cambio diáuxico:

1. El ajuste metabólico homeostático, que involucra cambios que incluyen la sustitución de transportadores de afinidades mayores, cambios en el volumen celular, cambios en la expresión genética en respuesta a cambios en el flujo de metabolitos, etc., que incluye una disminución en la expresión de genes de enzimas glicolíticas y un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas del ciclo TCA, y algunos otros asociados a la fosforilación oxidativa.
2. La "remodelación metabólica". Dentro de este proceso, se incluye específicamente los cambios que resultan en una alteración del ciclo de división celular. En la inanición completa, ninguna célula es capaz de brotar. En el cambio diáuxico, las células, en lugar de detener completamente su ciclo, inician una remodelación metabólica, cambios en el ciclo celular que acompañan las respuestas al estrés que se traducen en toda una nueva velocidad de procesos, más lenta, con un crecimiento totalmente aeróbico en etanol.

Se encontró, además, que la expresión de los genes de transportadores de alta afinidad (*HXT2*, *HXT3* y *HXT4*), no mostró variación frente al cambio diáuxico, en tanto que la expresión de *HXT6/7* aumentó en forma considerable (Ye y col., 2001; Brauer y col., 2005).

## 1.7 Influencia de los transportadores durante la fermentación del vino

La abrupta caída de la concentración de azúcares a lo largo de la fermentación del mosto de uva, induce el recambio de las proteínas transportadoras de membrana capaces de incorporar hexosas a fin de adaptarse a los cambios externos sin que la velocidad del flujo de carbono intracelular se modifique.

Por otra parte, la afinidad del sistema de transporte es mayor para la glucosa que para la fructosa. No se sabe si el etanol afecta diferencialmente la afinidad del sistema de transporte para cada hexosa en particular.

Greatrix y col. (2006), dedujeron que *HXT1*, *HXT3* y *HXT5* parecen ser los principales transportadores a altas concentraciones de azúcar, haciéndolos más relevantes durante las primeras etapas de la fermentación del vino. Por el contrario, *HXT2*, *HXT4* y *HXT13* se expresan a bajas concentraciones de glucosa o fructosa extracelular, lo que sugiere estos transportadores podrían ser importantes al final de las fermentaciones de vino cuando sólo pequeñas cantidades de azúcares permanecen.

Alternativamente, puede haber interacciones proteína-proteína entre los diferentes transportadores *in vivo* que son necesarios para la función apropiada y estas interacciones pueden afectar a la actividad de estas proteínas cuando se estudian en el aislamiento (Diderich y col., 1999; Ozcan y Johnston, 1999).

Se han demostrado diferencias entre distintas cepas de *S. cerevisiae* de acuerdo a la velocidad con que son capaces de consumir azúcares en distintos medios (Berthels y col., 2004). Estas diferencias estarían relacionadas, en gran medida, a la expresión de las proteínas transportadoras de membrana, cuyo recambio sería particular en diferentes cepas.

Tecnológicamente, cepas capaces de consumir los azúcares llevando un vino a sequedad en un tiempo de fermentación óptimo, contarían con una dinámica en el recambio de transportadores apta para su utilización enológica. La expresión de transportadores determinados, como *HXT5*, permitiría una adaptación más rápida al ser inoculada al mosto, una mayor velocidad en la señalización para la expresión de transportadores que se adecúen a las concentraciones de azúcares presentes y una protección frente a los cambios osmóticos, equilibrándose inmediatamente frente a nuevos medios (Bermejo y col., 2013).

## 1.8 Análisis estadístico de los datos: Modelos No Lineales Mixtos

Los modelos estadísticos para conjuntos de datos son descripciones matemáticas de cómo se puede generar un grupo determinado de datos. Los modelos consisten en al menos dos partes: (1) una fórmula que relaciona la respuesta a todas las variables explicativas (por ejemplo, efectos), y (2) una descripción de la distribución de probabilidad asumida para caracterizar la variación aleatoria que afecta a la respuesta observada (Littell y col., 2006). Los modelos no lineales aparecen cuando la relación entre el valor esperado de la variable aleatoria y el tratamiento, o las variables explicativas o predictoras, es no lineal.

Los modelos no lineales pueden utilizar cualquier función y pueden emplearse cuando la variable de respuesta tiene, o no, una distribución normal.

Un efecto se llama fijo si los niveles en el estudio representan todos los posibles niveles del factor, o por lo menos todos los niveles sobre los que la inferencia va a hacerse. Los efectos son aleatorios si se utilizan en el estudio para representar sólo una muestra (idealmente, una muestra aleatoria) de un conjunto más amplio de niveles potenciales. Los efectos aleatorios representan el muestreo verdadero y se supone que tienen distribuciones de probabilidad. Un

modelo es Mixto cuando contiene efectos fijos y efectos aleatorios (Littell y col., 2006; Bates, 2010).

Los modelos no lineales de efectos mixtos para datos continuos (mediciones repetidas en cada uno de una serie de individuos) también conocidos como modelos lineales jerárquicos, son una plataforma útil para el análisis de datos cuando el interés se centra en las características específicas de cada individuo (Davidian y Giltinan, 2003). Estos modelos se utilizan en situaciones que comparten las siguientes características:

- I. Observaciones repetidas de una respuesta continua en cada uno de varios individuos en el tiempo u otra condición.
- II. La variabilidad en la relación entre la respuesta y el tiempo u otra condición entre los individuos.
- III. La disponibilidad de un modelo científicamente relevante que caracteriza el comportamiento individual en términos de parámetros significativos que varían entre los individuos y dictan variación en los patrones de respuesta en el tiempo.

Los objetivos son comprender el comportamiento "típico" de los fenómenos representados por los parámetros; el grado en que los parámetros, y por lo tanto estos fenómenos, varían en los individuos; y si algunas de las variaciones se asocian sistemáticamente con atributos individuales (Davidian y Giltinan, 2003).

Existen muchos métodos para encontrar los parámetros que describen un conjunto de datos ajustados como Modelos No Lineales Mixtos. Los más usados son los algoritmos que se aproximan por máxima verosimilitud a través de integraciones matemáticas. Estos algoritmos, si bien son utilizados actualmente por distintos programas informáticos, SAS o R, pueden ser computacionalmente costosos cuando se realiza cada iteración interna del algoritmo, por lo que la selección de los valores de partida es esencial. Por otra parte, la correcta interpretación de los resultados como descriptores de cada individuo o de la población general, debe ser cuidadosamente considerada por el investigador (Davidian y Giltinan, 2003).

## 2 Hipótesis de Trabajo

Las levaduras indígenas sacaromícéticas aisladas de una bodega de la zona del Añelo, región del Comahue, Patagonia Norte, poseen un metabolismo mejor adaptado que los cultivos iniciadores comerciales a las características agroecológicas de los cultivares locales y por lo tanto pueden contribuir a un mejor consumo del sustrato nativo, produciendo vinos de una calidad fisicoquímica superior.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Caracterizar el comportamiento fermentativo de levaduras ecotípicas de la Provincia del Neuquén, y su potencial utilidad en el desarrollo de cultivos iniciadores para vinificaciones en mostos sintéticos y naturales.

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la cinética del crecimiento de cepas de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de mostos de uvas pertenecientes a una bodega de la región del Añelo, provincia de Neuquén.
2. Caracterizar la capacidad fermentativa de estas cepas, a través de ensayos de consumo de glucosa y fructosa en distintos medios de cultivo.
3. Evaluar la expresión molecular de los transportadores de hexosas presentes a lo largo de la fermentación en las cepas seleccionadas, con el fin de detectar las cepas con perfiles que permitan un mejor aprovechamiento de los azúcares del medio.
4. Analizar las características fisicoquímicas de los vinos obtenidos por fermentación con las cepas seleccionadas.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Análisis Microbiológicos

#### 4.1.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En estudios previos, ocho bodegas representativas de distintas regiones ubicadas en las provincias de Río Negro y Neuquén fueron seleccionadas para la investigación de la biodiversidad de levaduras asociadas a viñedos de las variedades Malbec, Merlot y Pinot noir pertenecientes a las zonas de Ingeniero Huergo, General Roca, San Patricio del Chañar y Añelo.

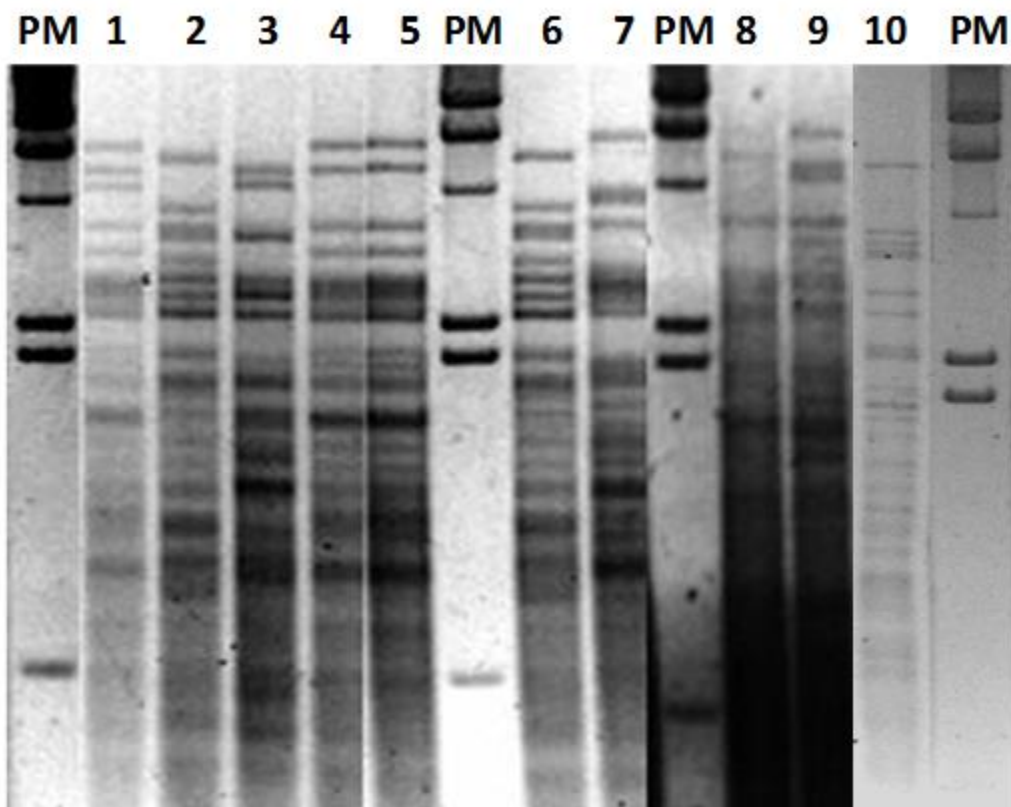
De la bodega Del Añelo, en la región del Comahue, provincia de Neuquén, Argentina (ubicada entre los 38.5° y 40° de latitud sur) se caracterizaron como autóctonas ocho cepas de *S. cerevisiae*, aisladas durante las vendimias del año 2005 y 2006, en variedades Merlot y Malbec, provenientes de un estudio regional, siendo conservadas a -20°C en glicerol al 15% hasta el momento del presente estudio. Estas cepas fueron previamente caracterizadas a nivel molecular por el grupo de investigación del laboratorio de Microbiología del PROBIEN (Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas. UNCO-CONICET, Neuquén). La diversidad intraespecífica de las poblaciones de *S. cerevisiae* asociadas a las vinificaciones en la bodega se presenta en las Tabla 3 y los perfiles moleculares de las cepas más representativas de cada bodega en la Figura 12.

A su vez se utilizó como control en todos los ensayos evaluados una cepa comercial del género *Saccharomyces* utilizada en la industria regional, denominada EC1118.

**Tabla 3. Levaduras Indígenas de la Bodega Del Añelo**

<i>Perfil Mitocondrial</i>	<i>Prevalencia</i>	<i>Individuo ensayado</i>
L	Fermentación Natural 2005 (Medio y Final)	ÑNM10*
LVI	Fermentación Conducida 2005 (Final) y 2006 (Inicial) Fermentación Natural 2005 (Medio y Final) Fermentación Natural 2006 (Medio y Final)	ÑIF8*
LIV	Fermentación Conducida 2006 (Final) Fermentación Natural 2006 (Final)	ÑNF8
LV	Fermentación Natural 2006 (Medio)	ÑNM16
LII	Fermentación Conducida 2005 (Final) Fermentación Natural 2006 (Medio y Final)	ÑIF5*
LVI	Fermentación Conducida 2005 (Final) y 2006 (Inicial) Fermentación Natural 2005 (M y F) y 2006 (M y F)	ÑNF7
LIII	Fermentación Natural 2006 (Medio y Final) Fermentación Conducida 2006 (Final)	ÑNF9
LII	Fermentación Conducida 2005 (Final) Fermentación Natural 2006 (Medio y Final)	ÑNF13

El asterisco indica procedencia de vinificaciones Merlot. Sin asterisco, vinificaciones Malbec. *Primera letra*: Bodega de procedencia (Ñ: del Añelo). *Segunda letra*: tipo de vinificación (N, natural; I, conducida). *Tercera letra*: estadio de la vinificación (I, inicial; M, medio; F, final). El número indica el orden del aislamiento dentro de cada serie.



**Figura 12:** Perfiles moleculares de las cepas más representativas de cada bodega del Añelo, obtenidos por ADNmit RFLP. 1: Perfil LIV (cepa nativa Merlot natural); 2: Perfil LIII (cepa nativa); 3: Perfil III (starter 3, Merlot natural, Malbec inoculada y natural); 4: Perfil LVI (cepa nativa Merlot natural); 5: Perfil LVI (cepa nativa Merlot natural); 6: Perfil LIII (cepa nativa Malbec inoculado); 7: Perfil LII (cepa nativa Malbec inoculado); 8: Perfil LI cepa nativa (Malbec inoculado y natural); 9: Perfil L (cepa nativa Malbec natural); 10: Perfil EC1118 (cepa comercial control).

#### **4.1.2 Resistencia Osmótica a Azúcares**

Las cepas que se encontraban conservadas en glicerol fueron activadas durante 48 h en caldo GPY (Glucosa-Peptona-Extracto de Levadura) a 28°C. Luego de esta activación, 5 µL de diluciones seriadas desde 10<sup>7</sup> ufc/mL fueron transferidos a placas conteniendo la mezcla de sales con aminoácidos y sulfato de amonio (Yeast Nitrogen Base, Difco; 0,67%); agar al 2 % (P/V) y como fuente carbonada 20 % (P/V) de glucosa, 20 % (P/V) de fructosa, 2 % (P/V) de glucosa o 2 % (P/V) de fructosa. El recuento de las unidades formadoras de colonias se realizó entre los 3 y 5 días de la siembra. La metodología se llevó adelante según estudios previos de estrés osmótico (Carrasco, Querol y del Olmo, 2001).



### **4.1.3 Microfermentaciones**

#### **4.1.3.1 Primera Etapa**

Con cada una de las cepas estudiadas y con la cepa control (cepa comercial del género *Saccharomyces* EC1118) se realizó un pre-inóculo en caldo GPY durante 48 h a 28°C. Luego de esta activación, las células fueron transferidas a viales con agua destilada durante 24 h a fin de inducir condiciones de inanición.

Posteriormente, de cada uno de estos viales se transfirió la cantidad necesaria a fin de llegar a  $10^5$  ufc/mL de cada una de estas cepas en tubos de 10 mL conteniendo:

- 1) Caldo YNB (Yeast Nitrogen Base, con aminoácidos y sulfato de amonio, marca Difco; 0,67%) suplementado con glucosa 20% (P/V) (n=3).
- 2) Caldo YNB (0,67%) suplementado con fructosa 20% (P/V) (n=3).
- 3) Caldo YNB (0,67%) suplementado con una mezcla de 10% (P/V) de ambos azúcares (n=4).

Todas las microfermentaciones se realizaron por 21 días a 28°C. En cada momento se analizó la evolución de la fermentación mediante la producción de CO<sub>2</sub> por diferencia de pesada (en g/día).

#### **4.1.3.2 Segunda Etapa**

Con las cepas autóctonas que presentaron los mejores perfiles de consumo en cada una de las pruebas de la etapa anterior (ÑNM10, ÑIF8, ÑNM16) y la cepa control comercial del género *Saccharomyces* EC1118, se continuó con fermentaciones en frascos color caramelo de 60 mL conteniendo:

- 1) Caldo YNB (0,67%) suplementado con una mezcla de 10% (P/V) de ambos azúcares (n=3).
- 4) Mosto natural Pinot Noir de la región del Comahue – Vendimia 2012/2013 (n=3).

Todas las microfermentaciones se realizaron por 21 días a 28°C. En cada momento se analizó la evolución de la fermentación mediante la producción de CO<sub>2</sub> por diferencia de pesada (en g/día) y el contenido de azúcares reductores del medio (glucosa y fructosa en gL<sup>-1</sup>) por kits enzimáticos (Megazyme International Ireland Ltd.), siguiendo las indicaciones del proveedor.

### **4.1.4 Tratamiento Estadístico y Modelado**

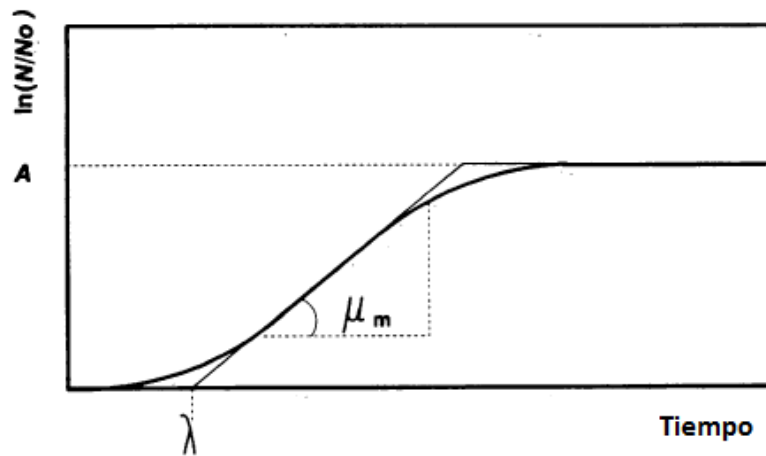
El tratamiento estadístico y modelado de los datos fue realizado con el paquete nlme del programa estadístico R (R Core Team, 2014), ajustando por Máxima Verosimilitud.

**4.1.4.1 Pérdida de Peso**

Los datos de Pérdida de Peso relativos a la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación fueron modelados según la ecuación de Gompertz Reparametrizada propuesta por Zwietering y col. (1990), donde

$$y = A \times \left( \exp \left( -\exp \left( \left( \frac{m \times 2.718282}{A} \right) * (\lambda - x) + 1 \right) \right) \right)$$

siendo el parámetro “A” la altura de la asíntota máxima de la curva modelada, “m” el indicador de la tasa de cambio durante la fase exponencial y “λ” el determinante de la fase lag (Zwietering y col, 1990). Estos parámetros graficados, describen, según estos autores, un crecimiento microbiano, donde sobre las ordenadas se grafica  $\ln(N/N_0)$  y en las abscisas *Tiempo* obteniéndose perfiles como el siguiente:



**Figura 13:** Gráfico de una curva de crecimiento bacteriano. Adaptado de Zwietering y col. (1990).

Para el modelado de los datos obtenidos, la ecuación de Gompertz Reparametrizada toma la siguiente forma:

$$\text{Pérdida de Peso (gL}^{-1}\text{)} = A \times \left( \exp \left( -\exp \left( \left( \frac{m \times 2.718282}{A} \right) * (\lambda - \text{Tiempo (días)}) + 1 \right) \right) \right) \quad (1)$$

Los modelos obtenidos para cada cepa fueron estimados según los datos de las Pérdidas de Peso, en gramos litro<sup>-1</sup>, para cada medio estudiado durante 21 días de fermentación. Las fermentaciones en los caldos con Glucosa 20% P/V y Fructosa 20% P/V fueron realizadas por triplicado y los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente.

El modelo contempló como efectos fijos la variable “Cepa” para cada uno de los parámetros. Por otra parte, la correlación de las medidas repetidas de un mismo medio (caldos

o mosto), se consideró introduciendo, luego de un proceso de selección, efectos aleatorios en los coeficientes A, m y l, tomando como niveles cada uno de los caldos o mosto.

El nivel de significancia de los parámetros A, m y l obtenidos para cada cepa fue analizado según el método de Wald y la comparación de a pares de medias a través del test de LSD.

#### 4.1.4.2 Consumo de Azúcares

Los datos correspondientes al consumo de azúcares fueron modelados estadísticamente según la ecuación desarrollada por Taoukis, Labuza y Saguy, *Kinetic of food deterioration and shelf-life prediction* (1997), para la disminución de la concentración de compuestos químicos en alimentos, modificada por Arroyo-López (Arroyo-López y col., 2008) para el ajuste de los parámetros de color superficial  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en alimentos a lo largo de tiempo. Así modificada, esta ecuación permitió la convergencia de las curvas de datos de azúcares residuales en caldo y mosto. El modelo presenta la siguiente forma:

$$S_t = S_0 \cdot e^{-K_c t} + D$$

donde  $D$  es la asíntota inferior (parámetro a  $t \rightarrow \infty$ ),  $S_0$  es el valor específico inicial para cada ajuste, y  $K_c$  es la tasa o velocidad de cambio, en días<sup>-1</sup>, como se muestra en la Figura 14.

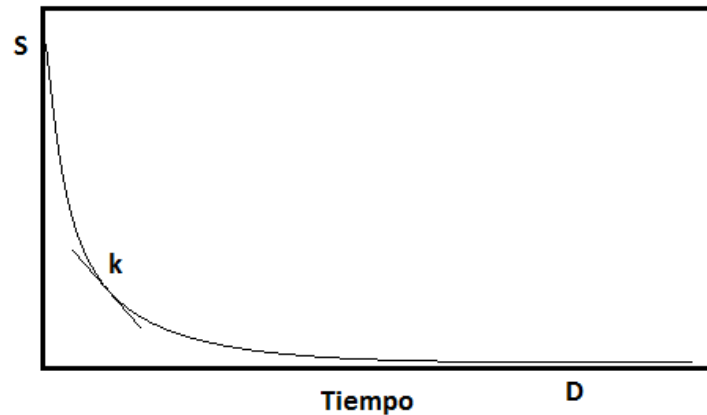


Figura 14: Gráfico de una curva decaimiento en función del tiempo.

Utilizando esta ecuación para el modelado de hexosas remanentes en caldo y mosto, estos parámetros toman un significado semejante, donde  $D$  describe nuevamente la asíntota inferior del modelo, en gramos litro<sup>-1</sup>,  $S_0$  es la concentración inicial modelada para cada azúcar, también en gramos litro<sup>-1</sup> y  $K_c$  la tasa de disminución, en días<sup>-1</sup>.

Para el modelado de los datos obtenidos, la ecuación de Taoukis toma la siguiente forma:

$$Conc_{\cdot día} (gL^{-1}) = Conc_{\cdot inicial} (gL^{-1}) \times e^{-Kc (días^{-1}) \times tiempo(días)} + D \quad (2)$$

El modelo final propuesto, luego de un proceso de selección, contempló, para cada parámetro, los efectos fijos en la variable “Cepa” y los efectos aleatorios en  $K_c$ , teniendo como niveles “Caldo Glucosa 10% - Fructosa 10%” o “Mosto”.

El nivel de significación de los efectos fijos D, S y K para cada cepa se analizó mediante el método de Wald y la comparación de a pares de medias a través del test de LSD.

Nuevamente, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el Programa R (R Core Team, 2014) con el paquete `nlme`, según un Modelo No Lineal a Efectos Mixtos y ajustados por Máxima Verosimilitud.

Algunos gráficos fueron realizados utilizando el programa estadístico *Infostat* (Di Rienzo y col., 2014).

## 4.2 Análisis Físico Químico de los Fermentados

Estos análisis se determinaron en los vinos obtenidos de las microvinificaciones de acuerdo a los protocolos propuestos por el INV (Instituto Nacional de Vitivinicultura) y las metodologías descritas por Ribereau-Gayon y col. (1982).

### 4.2.1 Determinación de Glucosa y Fructosa Remanentes

Se utilizó el kit enzimático “D-Fructose and D-Glucose” de Megazyme (K-FRUGL02/11), que utiliza Hexoquinasa, ATP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y fosfoglucosa isomerasa (PGI), según las instrucciones del fabricante. Las muestras analizadas fueron las correspondientes a la Segunda Etapa, realizadas en frascos color caramelo de 60 mL.

### 4.2.2 Determinación de Ácido Acético

Se utilizó el kit enzimático “Acetic Acid” de Megazyme (K-ACET02/11), que utiliza Acetyl-coenzima A sintetasa (ACS), ATP, CoA, Citrato sintasa (CS), y L-malato deshidrogenasa (L-MDH), según las instrucciones del fabricante (Marone y col., 2001).

#### **4.2.3 Determinación de Ácido Láctico**

Se utilizó el kit enzimático “L-Lactic Acid (L-Lactate)” de Megazyme (K-LATE07/11), que utiliza L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), NAD<sup>+</sup>, D-glutamato-piruvato transaminasa (D-GPT) en presencia de exceso de D-glutamato, según las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.4 Determinación de Glicerol**

Se utilizó el kit enzimático “Glycerol GK” de Megazyme (K-GCROLGK01/14), que utiliza Gliceroquinasa, ATP, ADP-Glucoquinasa, NAD<sup>+</sup>, D-Glucosa y Glucosa-6-Fosfato-deshidrogenasa (G6P-DH), según las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.5 Determinación de Etanol**

El etanol se determinó por cromatografía de gases del espacio de cabeza en un cromatógrafo Agilent 6890N gas (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar DB-ALC2 (Diam. Int: 0,32 mm, largo: 30 m, película: 1,20 µm). Las muestras se incubaron a 40°C y se centrifugaron a 250 revoluciones por minuto durante 5 min, y se inyectaron 250 µL del espacio de cabeza (temperatura de jeringa 40°C, modo de inyección “split”) utilizando un inyector automático CombiPAL Agilent G6500. Se utilizó nitrógeno como fase móvil con un caudal de 16 mL min<sup>-1</sup> y terbutanol como un estándar interno. La temperatura del inyector fue de 250°C y temperatura de la columna fue de 40°C durante 4 min, luego se incrementó a 120°C con una rampa de 20°C/min.

#### **4.2.6 Determinación del pH final de los vinos**

El pH final de los vinos se determinó por potenciometría empleando un pHmetro *Oakton Ion 510 Series* con electrodo de pH rango de 0 a 14.

Para el estudio estadístico de los datos fisicoquímicos, se realizó un Modelo Lineal General que considera una varianza residual diferente para cada una de las cepas. Para este procedimiento, se utilizó el programa estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2014).

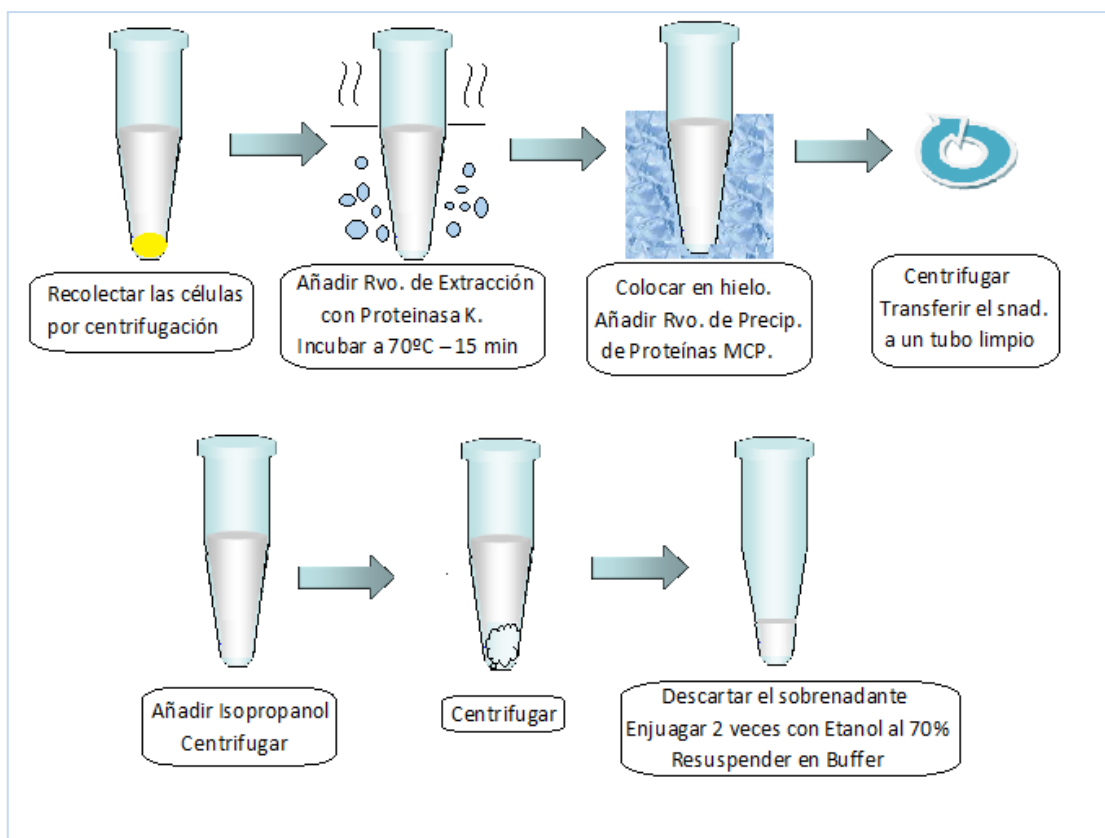
### **4.3 Análisis Molecular de la Expresión de los Transportadores de Hexosas**

#### **4.3.1 Aislamiento del ARN de las Levaduras**

Se extrajo el ARN total de las levaduras en los tiempos 0, 7, 14 y 21 días de las fermentaciones en mosto sintético suplementado con 10% (P/V) de glucosa y 10% (P/V) de fructosa. Para dicha extracción se utilizó el kit comercial “MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit” Epicentre®, Illumina®, según las indicaciones del fabricante. Este kit utiliza Proteinasa K, un

precipitante de proteínas, isopropanol, lavados con etanol al 70% (V/V) y un buffer de estabilización para proteger el ARN obtenido de la degradación por nucleasas. Los ARNs aislados fueron mantenidos a -80°C hasta su uso o utilizados inmediatamente para la obtención de ADNc.

En forma esquemática, el procedimiento de extracción se resume en la Figura 15:



**Figura 15:** Diagrama simplificado del procesamiento de obtención de ARN de las levaduras según el Kit “MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit” Epicentre®, Illumina®, utilizado a lo largo de esta tesis.

#### 4.3.2 Retrotranscripción

Los ARNs aislados fueron retrotranscritos a ADNc utilizando el kit comercial “qScript™ cDNA SuperMix, de Quanta Biosciences™”, compuesto por buffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, una proteína recombinante inhibidora de RNasas, transcriptasa reversa “qScript”, oligo (dT) primers y estabilizadores, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN obtenidas en cada paso, fueron tratadas con esta mezcla siguiendo el siguiente protocolo de retrotranscripción: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y un ciclo final a 4°C.

#### 4.3.3 Amplificación e Identificación

Los ADN copia (ADNc) de los transportadores Hxt1p a Hxt6/7p fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores específicos descritos por (Lee y Lee, 2008), Tabla 4, tomando como

molde 2  $\mu$ L de la reacción de retrortranscripción a los que se les añadió uno de los pares de cebadores correspondientes para cada transportador. Se utilizaron cebadores para la proteína actina como control interno. La reacción se condujo por 25 ciclos luego de una activación inicial de 15 min a 95°C. Cada ciclo se desarrolló de la siguiente manera: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. Luego del último ciclo se realizó un paso de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron por una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% (P/V) y las bandas se visualizaron con tinción con GelRed™. El peso aproximado de las bandas fue comparado contra un patrón de pesos moleculares (Genbiotech 100 bp DNA ladder).

Los geles obtenidos fueron examinados bajo luz UV con transiluminador y fotografiados con una cámara Kodak Easyshare D (Kodak) con adaptador 220V (Biodynamics).

**Tabla 4. Secuencias de primers utilizadas para la retrotranscripción.**

Nombre del Gen	Primer "Forward "	Primer "Reverso"	Tamaño del Producto (pb)
<i>ACT1</i>	5'-acatcggttatgtccgggtgt-3'	5'-agatggaccactttcgtcgt-3'	218
<i>HXT1</i>	5'-catcttcaaagggtgctgt-3'	5'-ggtagaacaccttcggcgta-3'	343
<i>HXT2</i>	5'-gtcaacttcgcatccactt-3'	5'-cagcaatagccatagcacga-3'	301
<i>HXT3</i>	5'-ccaagggtgctgtaactgt-3'	5'-tgagatgttgaacccatga-3'	370
<i>HXT4</i>	5'-tgtttcgcttctgttggtg-3'	5'-ccatggcaaacaccttct-3'	400
<i>HXT5</i>	5'-catcttcaaagggtgctgt-3'	5'-atggtgggatccatttgga-3'	372
<i>HXT6,7</i>	5'-gtctatgcttccgtgggtgt-3'	5'-ttctcccacatggttga-3'	384

Juegos de cebadores (*primers*) utilizados para la retrotranscripción y posterior amplificación por PCR de los transcritos de los transportadores de hexosas HXTs, y el gen utilizado como control, Actina. Adaptado de Lee y Lee (2008).

#### **4.3.4 Determinación semicuantitativa de la cinética de expresión de cada transportador de hexosas.**

La determinación semicuantitativa se llevó a cabo según describieran Marone y col., 2001. Se realizaron los controles de amplificación correspondientes y la intensidad relativa de la banda de cada transportador frente a la señal de actina, se cuantificó utilizando el programa de computación ImageJ 1.37V densitometric software (NIH, USA).

El análisis estadístico de las intensidades relativas de las bandas de los geles de agarosa se realizó con el programa StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (sistema informático de análisis de datos), versión 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)., promediando los valores de intensidad relativa y calculando su desvío estándar a través de un análisis ANOVA, llevando a grupos homogéneos según el test de LSD.

Para una mejor visualización de los datos obtenidos, los gráficos correspondientes a las Figuras 20, 21 y 22 se realizaron utilizando el software estadístico “Infostat” (Di Rienzo y col., 2014).

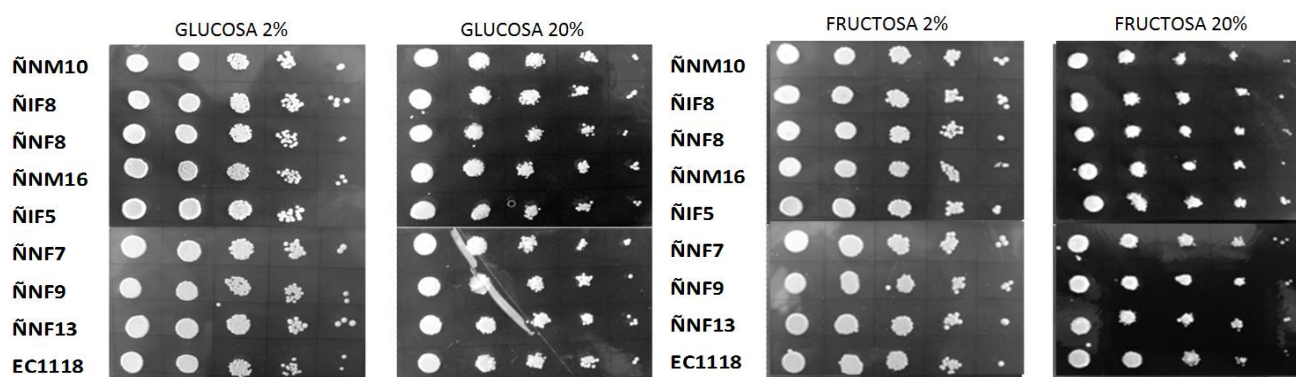


## 5 Resultados

### 5.1 Resistencia Osmótica a Azúcares

Antes de comenzar los estudios de fermentación, se midió la capacidad de las cepas de resistir las elevadas presiones osmóticas dadas por las altas concentraciones de los azúcares del mosto, presentes al principio de la vinificación.

Todas las cepas mostraron ser resistentes a las concentraciones estudiadas de ambos azúcares (Figura 16), mostrando desarrollo de colonias hasta la mínima dilución estudiada, Las colonias desarrolladas en las placas conteniendo Glucosa 2% (P/V) y Fructosa 2% (P/V) mostraron la apariencia típica de colonias desarrolladas por levaduras de la especie *S. cerevisiae*, blancas, circulares y ligeramente umbonadas.



**Figura 16.** Ensayo de Resistencia Osmótica de las cepas de *S. cerevisiae* luego de 7 días de incubación en placas de agar con YNB y glucosa al 2% y al 20% (P/V) o fructosa al 2% y al 20% (P/V). Cada columna corresponde a la siembra de 5  $\mu$ L de las diluciones 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>3</sup> ufc/mL de cada una de las cepas estudiadas (de izquierda a derecha, respectivamente).

Todas las cepas mostraron crecimiento tanto en el agar YNB con el agregado de 20% de Glucosa, como en el que contenía 20% de Fructosa. Sin embargo, todas las colonias desarrolladas en el medio conteniendo Fructosa 20% alcanzaron un tamaño menor a los desarrollados en los otros dos medios. Esto podría explicarse en base al estrés osmótico generado por una concentración de azúcares elevada, sumado a la dificultad mayor de llevar adelante las vías metabólicas partiendo desde Fructosa como única fuente carbonada disponible. Estos ensayos, se realizaron por duplicado, obteniendo las mismas características en ambos casos.

## 5.2 Caracterización de los Perfiles de Fermentación Iniciales

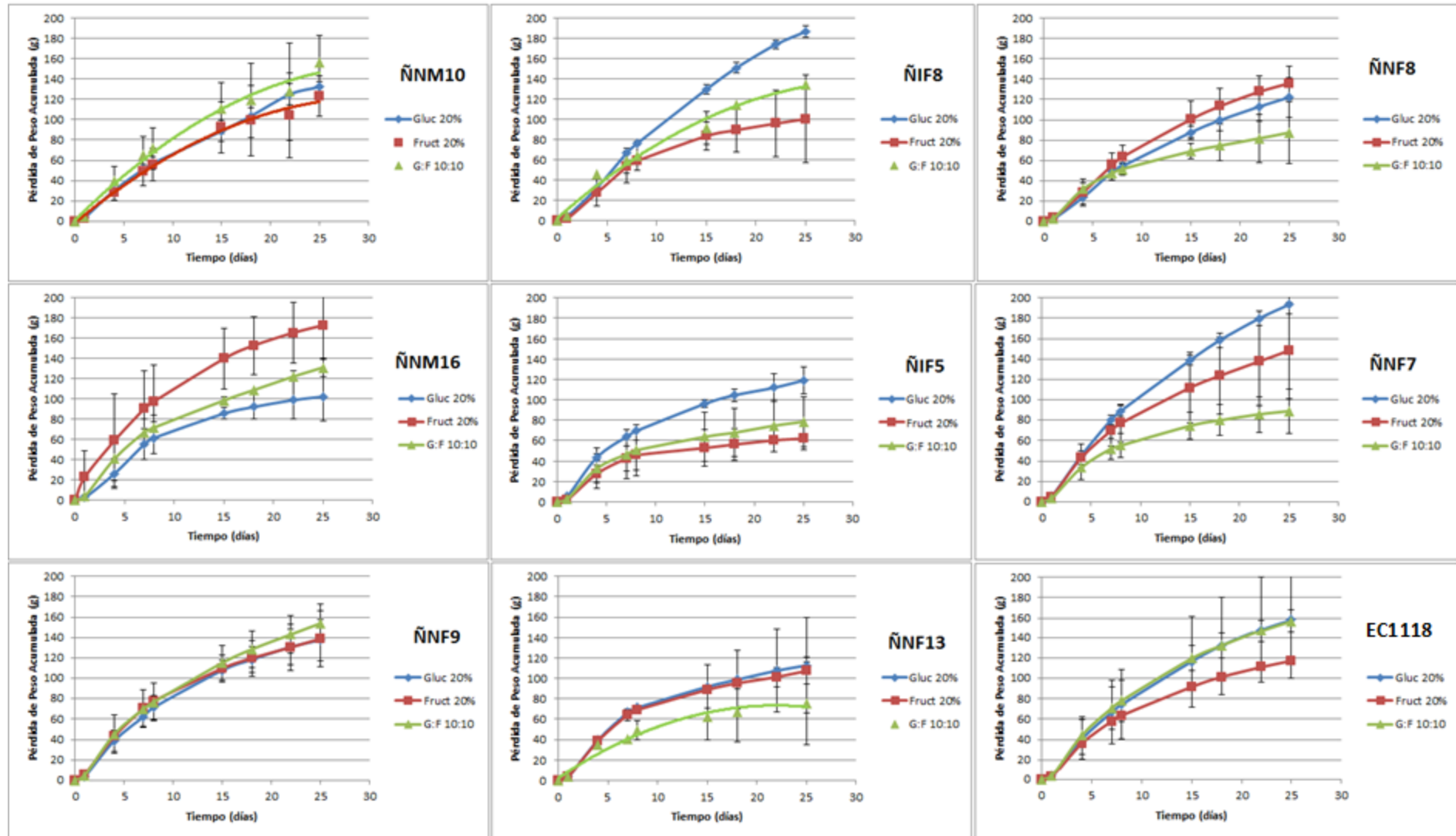
### 5.2.1 Mostos sintéticos

#### 5.2.1.1 Datos obtenidos

El CO<sub>2</sub> liberado durante las microvinificaciones es un parámetro que refleja la capacidad fermentativa de las distintas cepas estudiadas y fue evaluado como la pérdida de peso de los fermentadores (en gL<sup>-1</sup>). En la Figura 17 se muestran los gráficos comparativos de la “Pérdida de Peso Acumulada” de los ensayos realizados en tubos de 10 mL de caldo conteniendo YNB con glucosa al 20% (P/V), fructosa al 20% (P/V) y la mezcla de glucosa 10% (P/V) - fructosa 10% (P/V) de todas las cepas de *Saccharomyces* estudiadas.

Estos resultados muestran que existen tres comportamientos diferenciales.

- ✓ Cepas con preferencia a la fermentación de glucosa, insinuado una mayor velocidad fermentativa frente a este azúcar. Las cepas ÑIF8, ÑIF5 y ÑNF7 mostraron esta característica, con valores de producción de CO<sub>2</sub> diferencial con respecto a los medios de fructosa o de azúcares mixtos. Sin embargo, la cepa ÑIF5, mostró una menor capacidad fermentativa en comparación que otras dos cepas.
- ✓ Cepas con preferencia a la fermentación de fructosa: Sólo dos cepas mostraron ser capaces de fermentar más eficientemente la fructosa que la glucosa, ÑNF8 y ÑNM16. Sin embargo, esta última cepa, mostró una sorprendente capacidad fermentativa produciendo el 70% del total del CO<sub>2</sub> los 15 días de iniciada la fermentación.
- ✓ Cepas con carácter mixto: Tres de las cepas estudiadas, ÑNM10, ÑNF9 y ÑNF13, junto con la cepa control EC1118, no mostraron un comportamiento diferencial por la fermentación de alguno de los dos azúcares. Tanto las cepas ÑNM10 como ÑNF9, mostraron una capacidad fermentativa similar, en cuanto a la aptitud para fermentar ambos azúcares en mezclas equimolares, o cada uno por separado. Como era de esperar, la cepa comercial EC1118, mostró un desempeño muy bueno en la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> del caldo con glucosa y con la mezcla equimolar, aunque su capacidad de fermentación en el medio con fructosa fue netamente inferior.



**Figura 17.** Diagrama comparativo de la Pérdida de Peso Acumulada en función de los días de fermentación para las cepas ÑNM10, ÑIF8, ÑNF8, ÑNM16, ÑIF5, ÑNF7, ÑNF9, ÑNF13 y la cepa control EC1118. En cada gráfico, sobre los ejes de ordenadas se representa la Pérdida de Peso Acumulada ( $g \cdot L^{-1}$ ) y sobre los ejes de abscisas, los Días de Fermentación. Los puntos simbolizan los valores medios mientras que las barras expresan  $\pm 1$  Desvío Estándar.

### 5.2.1.2. Modelado estadístico

Frente a la primera caracterización de los perfiles de consumo presentados en la Figura 17, estas cepas fueron estudiadas para poder comparar su desarrollo estadísticamente. El modelado de los datos tomados a partir de la Pérdida de Peso Acumulada como  $\text{CO}_2$ , generó una familia de curvas, donde pueden verse las diferencias entre ellas a simple vista. Sin embargo, para la correcta comparación de las capacidades fermentativas reales de cada cepa, los parámetros  $A$ ,  $m$  y  $l$  arrojados por el programa de modelado, facilitaron la selección de la cepa con mejores rendimientos fermentativos en cada uno de los medios.

#### 1) Medio YNB con Glucosa 20% (P/V)

Los perfiles de las curvas modeladas según la Ecuación 1 (sección 4.1.4.1), para los datos de Pérdida de Peso Acumulada como  $\text{CO}_2$  en  $\text{g/L}^{-1}$  en el medio que contenía Glucosa 20% (P/V) se muestran en la Figura 18.

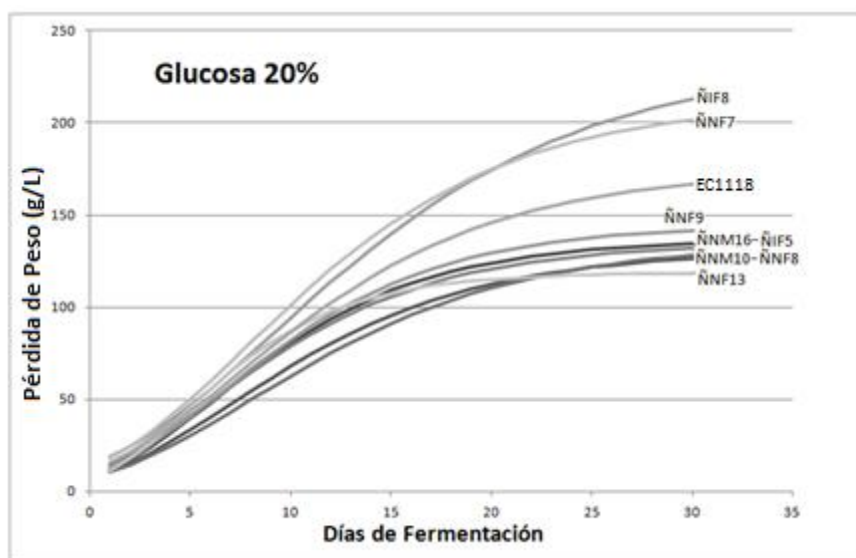


Figura 18. Curvas obtenidas por modelado para el crecimiento en caldo con Glucosa 20% (P/V) para las ocho cepas estudiadas y la cepa control.

De las ocho cepas nativas estudiadas, seis de ellas no logran consumir más del 75% de la glucosa del medio de cultivo, siendo superadas por la cepa control, EC1118. Sin embargo, para las dos cepas nativas restantes, ÑIF8 y ÑNF7, los valores calculados por la ecuación de Gompertz Reparametrizada más allá del día 25 de la fermentación, generaron un valor asintótico superior a los  $200 \text{ g/L}^{-1}$ , que, sin poseer un absoluto sentido físico, demuestran una capacidad de consumo más importante para la glucosa que las otras cepas. No obstante, esto sea probablemente un reflejo de un mayor valor de tasa fermentativa (representada por el parámetro  $m$ ), que permite

a estas cepas consumir la mitad de la glucosa presente en el medio hacia el décimo día de la fermentación.

En la Tabla 5 se muestran los parámetros arrojados por el programa que se ajustan a cada uno de los perfiles obtenidos experimentalmente.

**Tabla 5. Parámetros de la Ecuación de Gompertz Modificada para el crecimiento en caldo YNB Glucosa 20%.**

	<i>A</i>	<i>m</i>	<i>I</i>
<b>ÑNM10</b>	130,589 ± 25,705 <sup>d</sup>	7,089 ± 1,129 <sup>c</sup>	0,329 ± 0,563 <sup>a</sup>
<b>ÑIF8</b>	<b>233,378 ± 25,8485<sup>a</sup></b>	<b>9,785 ± 1,087<sup>ab</sup></b>	<b>0,367 ± 0,446<sup>a</sup></b>
<b>ÑNF8</b>	135,326 ± 28,842 <sup>cd</sup>	6,600 ± 1,238 <sup>c</sup>	0,471 ± 0,664 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	136,820 ± 25,467 <sup>cd</sup>	8,514 ± 1,150 <sup>abc</sup>	0,348 ± 0,506 <sup>a</sup>
<b>ÑIF5</b>	134,848 ± 28,452 <sup>cd</sup>	7,867 ± 1,274 <sup>bc</sup>	-0,211 ± 0,618 <sup>a</sup>
<b>ÑNF7</b>	212,585 ± 28,692 <sup>ab</sup>	10,407 ± 1,238 <sup>a</sup>	0,250 ± 0,499 <sup>a</sup>
<b>ÑNF9</b>	144,933 ± 28,436 <sup>cd</sup>	8,609 ± 1,272 <sup>abc</sup>	0,300 ± 0,576 <sup>a</sup>
<b>ÑNF13</b>	118,745 ± 28,350 <sup>d</sup>	9,893 ± 1,419 <sup>ab</sup>	0,380 ± 0,569 <sup>a</sup>
<b>EC1118</b>	174,474 ± 18,074 <sup>bc</sup>	8,733 ± 0,779 <sup>abc</sup>	0,055 ± 0,340 <sup>a</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Pérdida de Peso Acumulado en caldo con Glucosa 20% (P/V) para las 8 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Como puede observarse, la cepa **ÑIF8** muestra una muy buena combinación de los parámetros *A* y *m*, que describen su perfil fermentativo, demostrado en el gráfico anterior como la curva que alcanza valores superiores en la asíntota final, *A*, a lo largo del proceso de fermentación. Estadísticamente, este parámetro es diferente al de las otras cepas estudiadas, tanto nativas como la cepa control. Sin embargo, los valores arrojados por el programa para el parámetro *I*, no mostraron diferencias significativas entre las cepas.

## 2) Medio YNB con Fructosa 20% (P/V)

Con los datos obtenidos de Pérdida de Peso Acumulada como CO<sub>2</sub> en gL<sup>-1</sup> en el medio que contenía Fructosa 20% (P/V), el modelado estadístico según la Ecuación 1 produjo los perfiles que se muestran en la Figura 19.

Con las curvas obtenidas por el modelado de los datos según la ecuación de Gompertz Reparametrizada, se obtiene un patrón semejante al caldo con Glucosa 20% (P/V), mostrando un consumo final para cinco de las cepas cercano al 75% del azúcar contenido en el caldo. Nótese que, a diferencia de las curvas obtenidas en el medio anterior, en ningún caso existen cepas cuyo modelado genere asíntotas superiores que alcancen la máxima cantidad de Fructosa (200 gL<sup>-1</sup>) contenida en el medio.

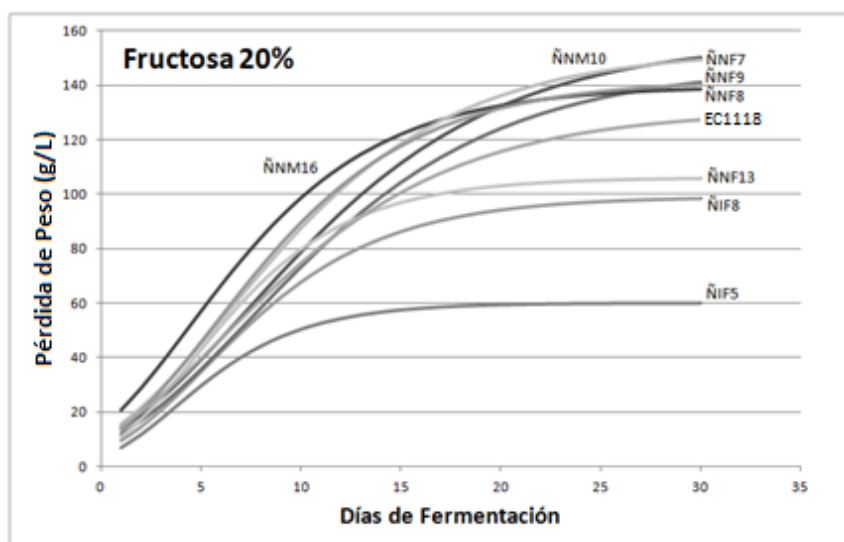


Figura 19. Curvas obtenidas por modelado para el crecimiento en caldo con Fructosa 20% (P/V) para las ocho cepas estudiadas y la cepa control.

Dos de las cepas nativas, ÑNF13 y ÑIF8, alcanzan a metabolizar sólo el 50% de la fructosa presente en el medio, en tanto que la cepa ÑIF5, muestra una eficiencia metabólica inferior a todas las otras cepas.

Por otra parte, si bien las curvas fermentativas de las distintas cepas mostraron valores asintóticos finales similares, la cepa ÑNM16 fue seleccionada por la combinación de los parámetros *A* y *l* arrojados por el modelado. Los valores que describen los perfiles de cada cepa en este medio se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de la Ecuación de Gompertz Modificada para el crecimiento en caldo YNB Fructosa 20%

	<i>A</i>	<i>m</i>	<i>l</i>
ÑNM10	156,549 ± 27,947 <sup>a</sup>	8,101 ± 1,813 <sup>a</sup>	0,226 ± 0,510 <sup>a</sup>
ÑIF8	99,033 ± 27,791 <sup>bc</sup>	7,376 ± 1,849 <sup>a</sup>	0,294 ± 0,576 <sup>a</sup>
ÑNF8	147,114 ± 31,280 <sup>ab</sup>	7,664 ± 2,034 <sup>a</sup>	0,371 ± 0,608 <sup>a</sup>
ÑNM16	<b>139,636 ± 27,801<sup>ab</sup></b>	<b>9,731 ± 1,844<sup>a</sup></b>	<b>-0,854 ± 0,500<sup>b</sup></b>
ÑIF5	60,203 ± 31,012 <sup>c</sup>	6,185 ± 2,153 <sup>a</sup>	0,167 ± 0,802 <sup>ab</sup>
ÑNF7	152,803 ± 31,164 <sup>a</sup>	8,818 ± 2,042 <sup>a</sup>	-0,085 ± 0,568 <sup>ab</sup>
ÑNF9	142,220 ± 31,093 <sup>ab</sup>	9,411 ± 2,067 <sup>a</sup>	0,132 ± 0,568 <sup>ab</sup>
ÑNF13	106,049 ± 31,034 <sup>abc</sup>	9,007 ± 2,115 <sup>a</sup>	0,226 ± 0,609 <sup>ab</sup>
EC1118	130,955 ± 19,697 <sup>ab</sup>	7,299 ± 1,284 <sup>a</sup>	-0,428 ± 0,381 <sup>ab</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Pérdida de Peso Acumulado en caldo con Fructosa 20% (P/V) para las 8 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Observando los datos de la tabla, al modelar estadísticamente los datos obtenidos por las fermentaciones en este medio, el parámetro *m*, que cuantifica la velocidad metabólica, no presentó diferencias significativas entre las cepas. Es de notar, que el menor tiempo de

acostumbramiento al medio, cuantificado por el parámetro  $I$ , corresponde a la cepa ÑNM16, siendo estadísticamente diferente de las otras cepas estudiadas.

### 3) Medio YNB con Glucosa 10% (P/V) - Fructosa 20% (P/V)

Para el modelado de las fermentaciones desarrolladas en el caldo YNB conteniendo la mezcla de Glucosa 10% - Fructosa 10%, se utilizaron los valores obtenidos en las fermentaciones en tubos de 10 mL (Primera Etapa) y en las fermentaciones en frascos color caramelo de 60 mL (Segunda Etapa). Esto permitió aumentar la cantidad de datos para su tratamiento estadístico, generando parámetros capaces de ajustar el modelo con más precisión a los valores reales obtenidos por los comportamientos fermentativos naturales de las cepas. En la Figura 20 se muestran los perfiles de las curvas modeladas para cada cepa en este medio.

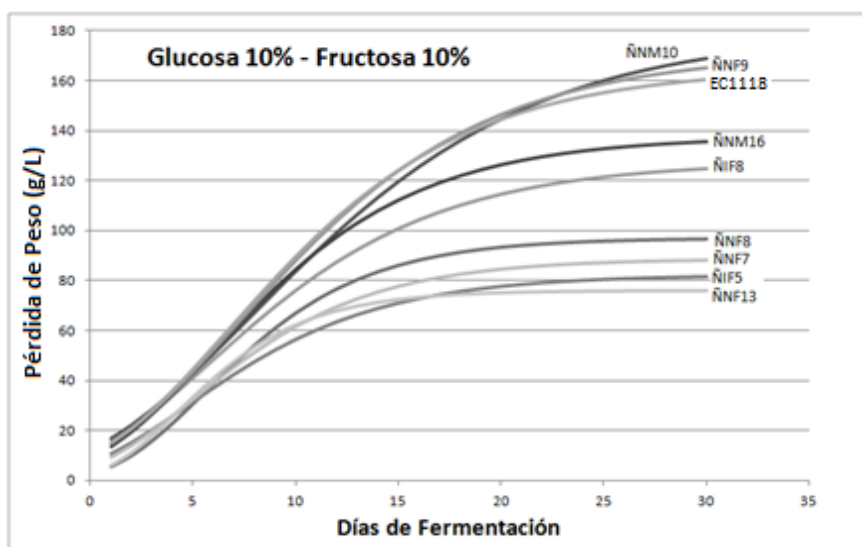


Figura 20. Curvas obtenidas por modelado para el crecimiento en caldo con Glucosa 10% (P/V) - Fructosa 10% (P/V) para las ocho cepas estudiadas y la cepa control.

El modelado de las fermentaciones este medio, generó tres patrones de curvas. Entre las cepas con mayor Pérdida de Peso Acumulada, se encontraron la usada como control, EC1118, y las nativas ÑNM10 y ÑNF9. Sin embargo, ninguna de las cepas nativas, ni aún la cepa usada como control, superaron una Pérdida de Peso Acumulada equivalente al consumo del 90% de los azúcares totales en el caldo. Cuatro cepas nativas, ÑNF8, ÑNF7, ÑNF5 y ÑNF13, no mostraron consumos superiores al 50% de los azúcares del medio y sólo dos, ÑNM16 y ÑIF8 superan el 60%.

De esta forma, en este medio sintético, poseyendo la concentración de azúcares más parecida a un mosto natural, la cepa ÑNM10 mostró un valor asintótico final superior a las otras cepas estudiadas, siendo seleccionada para continuar con la Segunda Etapa.

En las Tabla 7, se muestran los valores obtenidos para los parámetros **A**, **m** y **l** para cada una de las cepas en el medio conteniendo la mezcla equimolar de hexosas, acompañados por sus desvíos estándares y letras que denotan grupos estadísticamente homogéneos.

**Tabla 7. Parámetros de la Ecuación de Gompertz Modificada para el crecimiento en caldo YNB Glucosa 10%-Fructosa 10%**

	<b>A</b>	<b>m</b>	<b>l</b>
<b>ÑNM10</b>	<b>179,512 ± 18,718<sup>a</sup></b>	<b>8,342 ± 1,477<sup>ab</sup></b>	<b>-0,061 ± 0,593<sup>ab</sup></b>
<b>ÑIF8</b>	127,483 ± 18,061 <sup>c</sup>	7,367 ± 1,515 <sup>ab</sup>	-0,569 ± 0,700 <sup>b</sup>
<b>ÑNF8</b>	97,131 ± 20,218 <sup>cd</sup>	8,097 ± 1,874 <sup>ab</sup>	1,176 ± 0,801 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	137,383 ± 18,063 <sup>bc</sup>	8,795 ± 1,531 <sup>ab</sup>	0,118 ± 0,612 <sup>ab</sup>
<b>ÑIF5</b>	82,338 ± 20,198 <sup>d</sup>	5,668 ± 1,726 <sup>b</sup>	-0,589 ± 0,944 <sup>b</sup>
<b>ÑNF7</b>	88,338 ± 19,770 <sup>d</sup>	6,613 ± 1,767 <sup>ab</sup>	0,084 ± 0,901 <sup>ab</sup>
<b>ÑNF9</b>	171,468 ± 20,733 <sup>ab</sup>	9,109 ± 1,678 <sup>a</sup>	0,252 ± 0,660 <sup>ab</sup>
<b>ÑNF13</b>	76,179 ± 19,861 <sup>d</sup>	7,971 ± 2,051 <sup>ab</sup>	0,798 ± 0,945 <sup>ab</sup>
<b>EC1118</b>	165,058 ± 12,860 <sup>ab</sup>	9,249 ± 1,062 <sup>a</sup>	0,186 ± 0,410 <sup>ab</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Pérdida de Peso Acumulado en caldo con Glucosa 10% (P/V)-Fructosa 10% (P/V) para las 8 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Analizando los datos arrojados por el modelado en este medio, el valor del parámetro **A** de la cepa **ÑNM10**, mostró ser estadísticamente diferente del resto de las cepas estudiadas.

Notablemente, a diferencia de los otros medios que contenían sólo un tipo de hexosa, los errores estándares en los parámetros alcanzaron valores menores, indicando una menor dispersión de los resultados obtenidos en las distintas repeticiones, a pesar de que para el modelo se utilizaron los registros extraídos de las fermentaciones en tubos de 10 mL (n=3) y en frascos color caramelo de 60 mL (n=4).

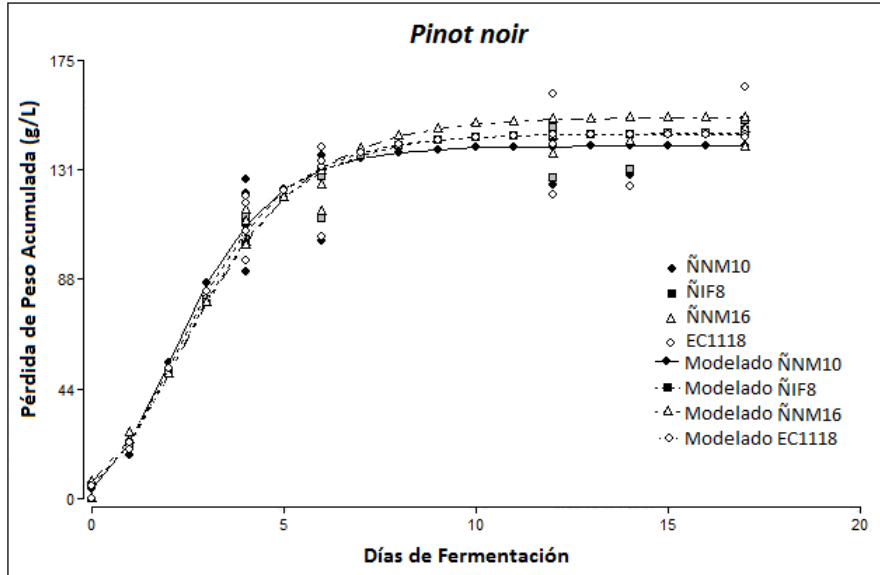
De las tablas anteriores, los valores expresados en negrita mostraron ser las combinaciones más importantes, tanto en la capacidad asintótica final de consumo (**A**) como en lo referente a la tasa de consumo (**m**), referenciando la aptitud de la cepa en presentar una mayor velocidad de fermentación.

En base a los parámetros obtenidos, cepas con los mejores perfiles de utilización de glucosa, de fructosa y de ambos azúcares en forma simultánea fueron seleccionadas. De esta forma, se eligió a la cepa **ÑIF8** por su mejor crecimiento en glucosa, a la cepa **ÑNM16** por su mejor crecimiento en fructosa y a la cepa **ÑNM10** como la mejor fermentadora de la mezcla equimolar de los dos azúcares, para continuar con los ensayos de caracterización.



**5.2.2 Mosto de Uvas variedad Pinot noir:**

Posteriormente se evaluó el comportamiento de las tres cepas nativas seleccionadas en una fermentación a escala laboratorio sobre mosto de uvas variedad Pinot noir. Los datos obtenidos y sus correspondientes perfiles modelados de Pérdida de Peso Acumulada se muestran en la Figura 21.



**Figura 21.** Datos experimentales y curvas obtenidas por modelado para el crecimiento en Pinot noir para las cepas seleccionadas y la cepa control.

Notablemente, las tres cepas nativas seleccionadas muestran un comportamiento semejante al de la cepa control comercial al ser inoculadas en un medio natural. Sin embargo, en contraste con los mostos sintéticos, se observa una clara transición entre las fases exponencial y estacionaria de la curva, definida entre los días 5 y 6 de la fermentación para las cuatro cepas. No obstante, teniendo en cuenta que las concentraciones iniciales de glucosa y fructosa en este mosto eran de  $140,31 \text{ gL}^{-1}$  y de  $158,27 \text{ gL}^{-1}$  respectivamente, las Pérdidas de Peso Acumuladas en este medio, apenas alcanzan el 50% de la suma de los azúcares presentes en el mismo. En la Tabla 8 se muestran los parámetros arrojados por el modelado que ajustan la Ecuación 1 a los datos obtenidos.

**Tabla 8.** Parámetros de la Ecuación de Gompertz Modificada para el crecimiento en Mosto Natural de uvas variedad Pinot noir.

	<i>A</i>	<i>m</i>	<i>l</i>
<b>ÑNM10</b>	$145,629 \pm 4,498^a$	$32,034 \pm 4,913^a$	$0,373 \pm 0,436^a$
<b>ÑIF8</b>	$140,793 \pm 6,336^a$	$34,141 \pm 7,322^a$	$0,415 \pm 0,618^a$
<b>ÑNM16</b>	$145,74 \pm 6,395^a$	$30,722 \pm 6,860^a$	$0,384 \pm 0,610^a$
<b>EC1118</b>	$152,249 \pm 6,440^a$	$28,989 \pm 6,528^a$	$0,278 \pm 0,590^a$

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Pérdida de Peso Acumulado en mosto de uvas variedad Pinot noir para las 3 cepas nativas seleccionadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Notablemente, estos parámetros siendo muy similares entre ellos, no demuestran diferencia estadística significativa, manifestando un comportamiento similar en las cuatro cepas, indicando que la capacidad de fermentación de las levaduras nativas seleccionadas de la Patagonia norte no es estadísticamente diferente a la del control comercial al ser comparadas en un mosto de uvas variedad Pinot noir.

Por otra parte, el parámetro  $m$ , asociado a la tasa fermentativa, es muy superior, tanto en las cepas nativas como en la cepa control, a los arrojados por el modelo cuando fue estimado sobre el desarrollo en cualquiera de los caldos.

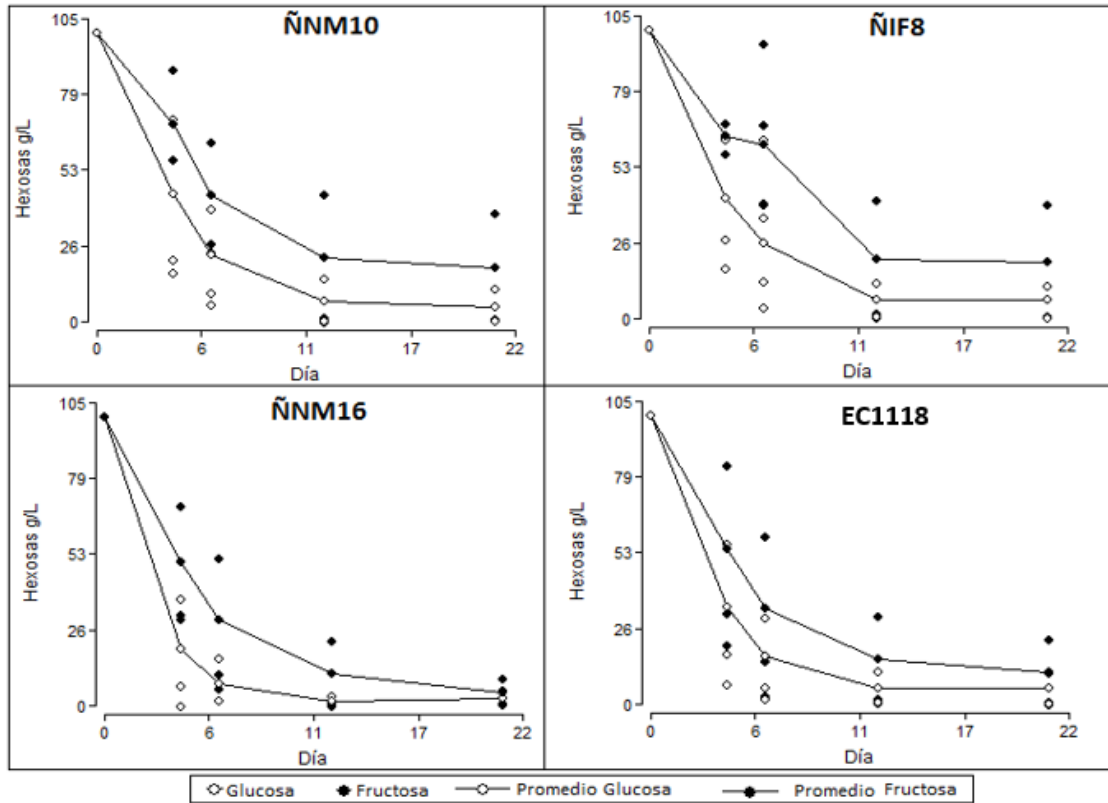
De una forma semejante a lo encontrado en el caldo YNB con la mezcla equimolar de hexosas, los errores estándares en el parámetro  $A$ , son muy bajos, siendo menores al 5%.

### 5.3 Análisis del Consumo de Azúcares

#### 5.3.1 Caldo YNB Glucosa 10% (P/V) – Fructosa 10% (P/V)

Las concentraciones de glucosa y fructosa disminuyeron rápidamente al comienzo de la fermentación a 28°C para las cuatro cepas estudiadas. Esto fue indicativo de una fase de retardo corta para todas las levaduras, aún en las cantidades inoculadas. Hacia el final de la fermentación, las concentraciones de glucosa remanente fueron por lo general inferiores a las de fructosa remanente. Los datos de azúcares residuales en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10% se presentan en la Figura 22.

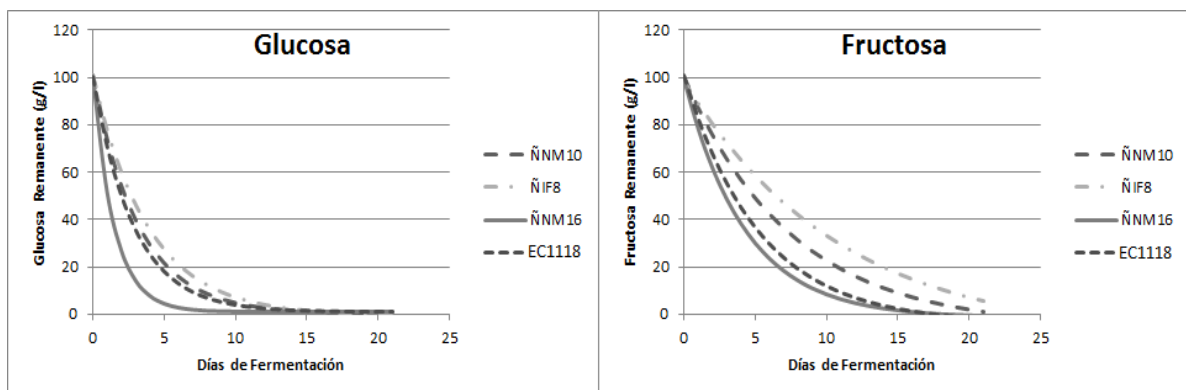
Como se observa, en las cuatro cepas estudiadas la glucosa remanente (círculos blancos) mostró valores inferiores en promedio a la fructosa remanente (círculos negros) para el mismo día de fermentación, más allá de la dispersión de los datos. Este patrón fue común a las tres cepas nativas y la cepa control. Las mediciones realizadas en las cepas ÑNM16 y EC1118, revelaron un consumo superior al 90% de la concentración inicial de glucosa al día 4to de la fermentación. En la cepa ÑIF8, una detención en el consumo de fructosa hacia el día 6to de la fermentación, se encontró en más de una de las corridas experimentales, aunque llegó a valores finales semejantes a la cepa ÑNM10 en la concentración de esta hexosa.



**Figura 22:** Consumo de azúcares en las cuatro cepas estudiadas en Caldo Glucosa 10% - Fructosa 10%. • Glucosa; o Fructosa. Sobre las curvas, los valores promedios.

Es interesante notar que en la cepa ÑNM16, los valores tanto de glucosa como de fructosa residuales hacia el día 4to de la fermentación, fueron inferiores que los medidos en los caldos donde se encontraban las otras cepas, reflejando una mayor tasa de consumo.

Los perfiles de las curvas de consumo de azúcares en mosto sintético (caldo) modeladas según la Ecuación 2, se muestran en la Figura 24.



**Figura 24:** Curvas de Glucosa y Fructosa Remanentes en caldo Glucosa 10%-Fructosa 10% modeladas para las cepas estudiadas y la cepa control.

En las curvas modeladas según la Ecuación 2 (sección 4.1.4.2), en el caso de Glucosa Remanente, se aprecian dos patrones de consumo. Uno con pendientes moderadas, compartido por las cepas ÑNM10, ÑIF8 y EC1118, y otro patrón mucho más abrupto, mostrado por la cepa ÑNM16.

En el caso de Fructosa Remanente, las pendientes de consumo son más suaves, denotando una tasa metabólica menor para la fermentación de este azúcar. No obstante, las diferencias entre el comportamiento de cada cepa son más importantes.

En la tabla 9, se muestran los valores de las variables de la Ecuación 2 arrojadas por el programa estadístico que describen las curvas modeladas.

**Tabla 9. Parámetros de la Ecuación de Taoukis para el consumo de Glucosa en caldo.**

	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>K<sub>c</sub></i>
<b>ÑNM10</b>	0,045 ± 2,899 <sup>a</sup>	100,626 ± 3,087 <sup>a</sup>	0,311 ± 0,149 <sup>b</sup>
<b>ÑIF8</b>	-0,437 ± 3,081 <sup>a</sup>	101,300 ± 4,391 <sup>a</sup>	0,258 ± 0,148 <sup>b</sup>
<b>ÑNM16</b>	1,219 ± 2,577 <sup>a</sup>	98,343 ± 4,456 <sup>a</sup>	<b>0,672 ± 0,172<sup>a</sup></b>
<b>EC1118</b>	0,716 ± 2,019 <sup>a</sup>	99,590 ± 4,235 <sup>a</sup>	0,352 ± 0,107 <sup>b</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Glucosa Remanente en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10% para las 3 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Tanto en los valores de *D*, la asíntota a tiempo infinito, como en los valores de *S*, arrojados por el programa para el ajuste de las pendientes, no aparece diferencia significativa entre cada una de las cepas estudiadas.

Notablemente, el parámetro que describe la pendiente exponencial negativa, *K<sub>c</sub>*, es significativamente diferente para la cepa ÑNM16, indicando una tasa de consumo más importante que el resto de las cepas estudiadas.

En la tabla 10, se muestran los valores ajustados por el programa que describen el consumo de Fructosa en caldo.

**Tabla 10. Parámetros de la Ecuación de Taoukis para el consumo de Fructosa en caldo.**

	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>K<sub>c</sub></i>
<b>ÑNM10</b>	-5,460 ± 6,585 <sup>a</sup>	105,918 ± 7,693 <sup>a</sup>	0,133 ± 0,0689 <sup>ab</sup>
<b>ÑIF8</b>	-9,856 ± 8,530 <sup>a</sup>	108,391 ± 9,107 <sup>a</sup>	0,092 ± 0,068 <sup>b</sup>
<b>ÑNM16</b>	-1,242 ± 5,350 <sup>a</sup>	100,271 ± 6,944 <sup>a</sup>	<b>0,233 ± 0,072<sup>a</sup></b>
<b>EC1118</b>	-3,461 ± 3,982 <sup>a</sup>	104,403 ± 5,046 <sup>a</sup>	0,190 ± 0,050 <sup>ab</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Fructosa Remanente en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10% para las 3 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

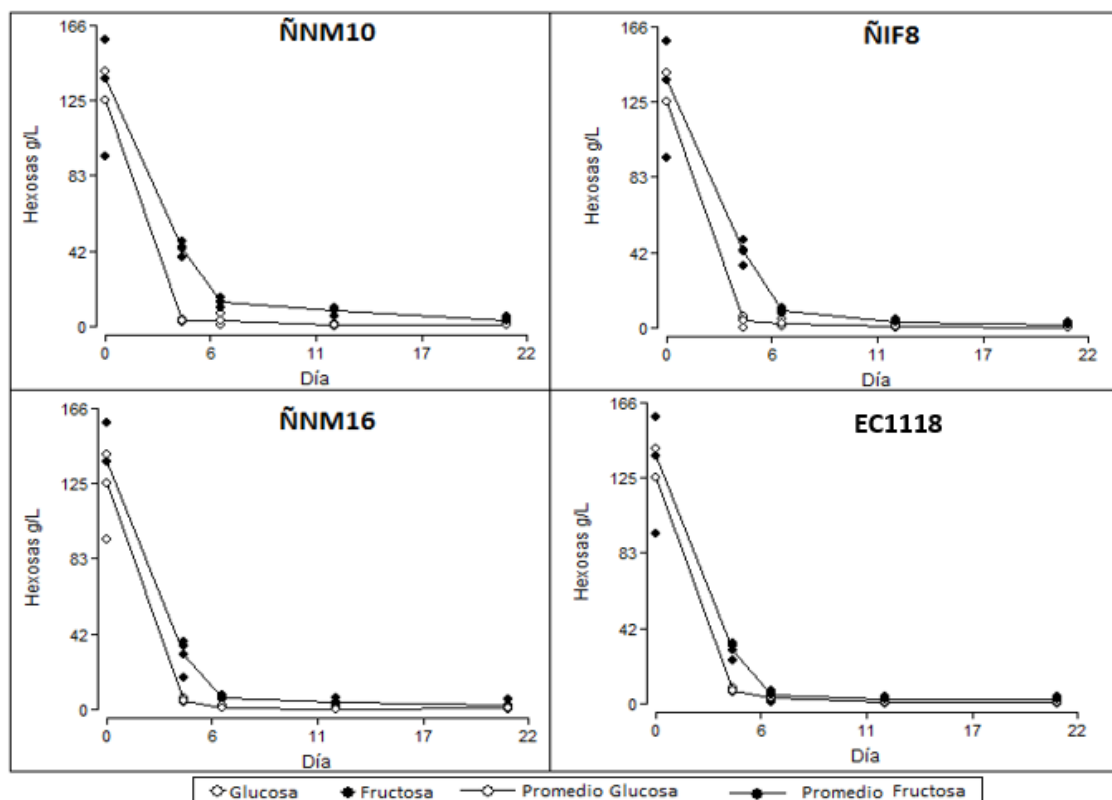
Reiteradamente, tanto los valores de  $D$  como de  $S$ , no muestran diferencias significativas entre las cepas. No obstante, para el parámetro  $K_c$ , aparecen tres grupos diferenciables estadísticamente. Al igual que en el modelado para el consumo de Glucosa, la cepa ÑNM16 muestra el valor más elevado en este coeficiente, correspondiendo a una curvatura más pronunciada en el modelo ajustado a los datos de Fructosa Remanente en caldo.

En el caso de los resultados arrojados para la asíntota inferior,  $D$ , dado que las aperturas de las curvas modeladas son pequeñas, el programa de ajuste genera valores negativos (concentraciones menores a cero), sin sentido físico.

### 5.3.2 Mosto de uvas variedad Pinot noir

Las fermentaciones conducidas en mosto de uvas variedad Pinot noir, produjeron reducciones en los valores de las concentraciones de las hexosas remanentes más importantes que los hallados en el caldo YNB con ambos azúcares para el mismo día de prueba, a pesar de que el contenido de ambos monosacáridos era superior en este medio natural.

Los datos de glucosa y fructosa residuales de las fermentaciones llevadas a cabo en mosto de uvas variedad Pinot noir, se presentan en la Figura 23.



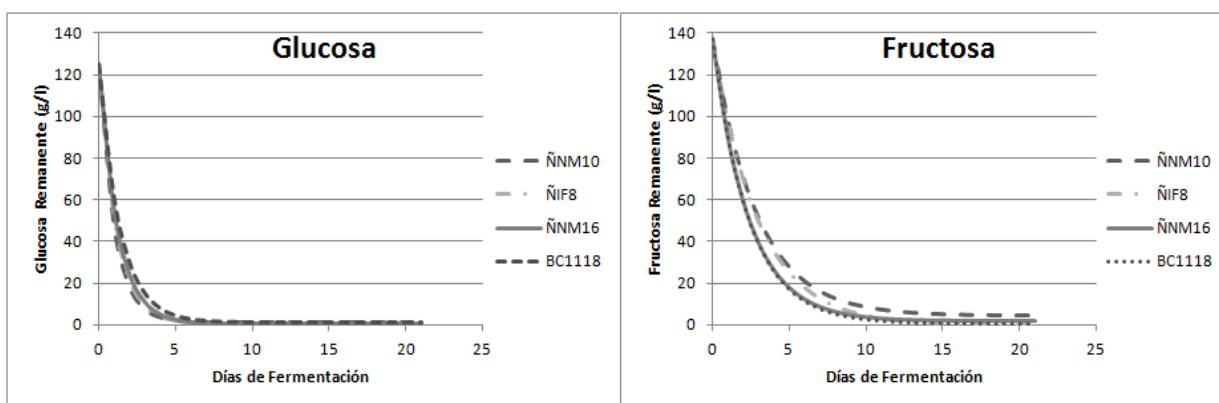
**Figura 23:** Consumo de azúcares por las cuatro cepas estudiadas en mosto de uvas variedad Pinot noir. • Glucosa; o Fructosa. Sobre las curvas, los valores promedios.

Los perfiles de consumo en el medio nativo, mostraron diferencias con respecto al medio sintético. Si bien las muestras de mostos utilizadas diferían en sus concentraciones iniciales de hexosas, la concentración de Glucosa al día 4to de la fermentación, disminuyó en un 90% en todas las repeticiones ( $n=3$ ) que se realizaron con cada una de las cepas.

En el caso de las concentraciones de Fructosa, la reducción observada alcanzó al 70% para el mismo día en todos los ensayos, excepto en el caso de ÑNM10, en la cual, en una de las experiencias, la disminución de la concentración de Fructosa al día 4to sólo alcanza a un 50%.

Para los días siguientes de la fermentación, a excepción de la cepa ÑNM10 al día 6to, las concentraciones de ambos azúcares registraron valores netamente inferiores al 10% de la cantidad medida en el mosto inicial, alcanzando al día 12 valores menores a  $2 \text{ gL}^{-1}$  en la concentración de Glucosa y a  $9 \text{ gL}^{-1}$  en el de Fructosa en todos los casos.

Los perfiles de las curvas de consumo de azúcares en mosto natural de uvas variedad Pinot noir modeladas según la ecuación descrita en la Ecuación 2 se muestran en la Figura 25.



**Figura 25:** Curvas de Glucosa y Fructosa Remanentes en mosto de uvas variedad Pinot noir modeladas para las cepas estudiadas y la cepa control.

El modelado de los datos por el programa estadístico, generó perfiles de fermentación muy semejantes para las tres cepas nativas y la cepa control, mostrando una disminución muy pronunciada en la concentración de Glucosa, aunque un poco menos marcada en la de Fructosa, correspondiendo con las concentraciones reales medidas a lo largo de la fermentación.

Por otra parte, la caída en los valores de consumo en el primer caso, revela un comportamiento más uniforme de las levaduras en este medio, mostrando una ligera variabilidad en el caso de la utilización de Fructosa.

Los valores de los parámetros estimados por el modelo que ajustan a la Ecuación 2, se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Parámetros de la Ecuación de Taoukis para el consumo de Glucosa en mosto Pinot noir.**

	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>K<sub>c</sub></i>
<b>ÑNM10</b>	1,215 ± 5,774 <sup>a</sup>	123,503 ± 10,758 <sup>a</sup>	0,989 ± 0,870 <sup>a</sup>
<b>ÑIF8</b>	0,738 ± 5,819 <sup>a</sup>	123,979 ± 10,780 <sup>a</sup>	0,887 ± 0,615 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	0,394 ± 5,850 <sup>a</sup>	124,327 ± 10,796 <sup>a</sup>	0,827 ± 0,515 <sup>a</sup>
<b>EC1118</b>	0,897 ± 4,180 <sup>a</sup>	123,818 ± 7,656 <sup>a</sup>	0,727 ± 0,287 <sup>a</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Glucosa Remanente en mosto de uvas variedad Pinot noir para las 3 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Como se advierte en la tabla, para ninguno de los tres parámetros arrojados por el ajuste, aparecen diferencias significativas entre las cepas estudiadas.

Por otra parte, el modelado para este medio, produjo valores de *K<sub>c</sub>* más importantes que en el caso anterior (caldo), generando resultados en la asíntota inferior *D*, más congruentes con la realidad.

En la tabla 12, se muestran los valores de los parámetros que ajustan la Ecuación 2 para las concentraciones de Fructosa Remanentes.

**Tabla 12. Parámetros de la Ecuación de Taoukis para el consumo de Fructosa en mosto Pinot noir.**

	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>K<sub>c</sub></i>
<b>ÑNM10</b>	4,346 ± 9,863 <sup>a</sup>	132,920 ± 16,272 <sup>a</sup>	0,347 ± 0,133 <sup>a</sup>
<b>ÑIF8</b>	-0,019 ± 9,911 <sup>a</sup>	137,405 ± 16,291 <sup>a</sup>	0,338 ± 0,130 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	1,950 ± 9,562 <sup>a</sup>	135,108 ± 16,150 <sup>a</sup>	0,427 ± 0,153 <sup>a</sup>
<b>EC1118</b>	0,385 ± 6,771 <sup>a</sup>	136,702 ± 11,423 <sup>a</sup>	0,422 ± 0,106 <sup>a</sup>

Parámetros obtenidos por el modelado de las curvas de Fructosa Remanente en Vino variedad Pinot noir para las 3 cepas estudiadas y la cepa control con sus correspondientes errores estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

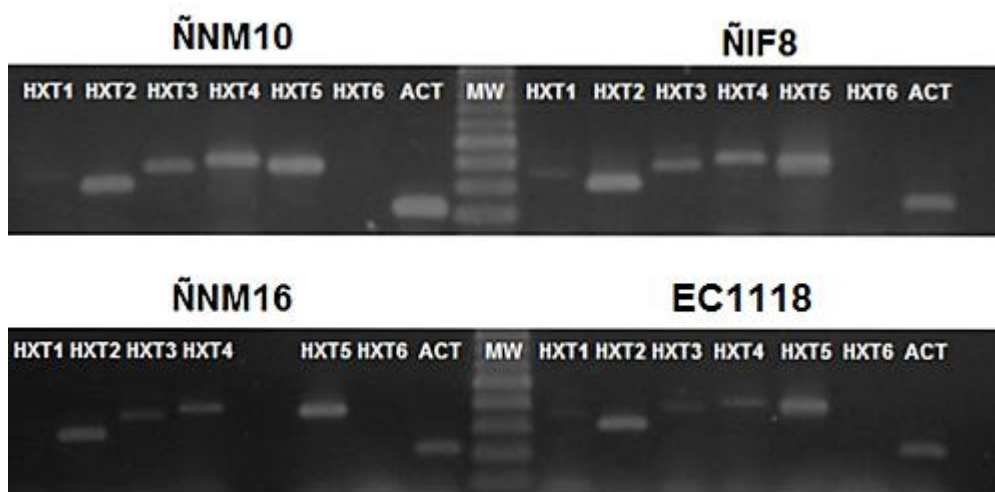
Al igual que para las concentraciones de Glucosa Remanente, no se observan diferencias significativas entre las cepas para los valores obtenidos en cada uno de los parámetros.

Notablemente, los valores de *K<sub>c</sub>* se muestran netamente inferiores en el caso del modelado de Fructosa que en el de Glucosa, evidenciando una menor tasa de consumo para este azúcar a lo largo de la fermentación.

## 5.4 Análisis de la expresión de los Transportadores de Hexosas a lo largo de la fermentación.

De las cepas con mejores perfiles de consumo de hexosas (ÑNM10, ÑIF8, ÑNM16 y EC1118), se estudió la expresión de los transportadores de membrana a lo largo de la fermentación. La expresión de los seis transportadores de hexosas fue estudiada al inicio de la fermentación (antes de su inoculación), y a los días 7, 14 y 21 de las fermentaciones.

En la Figura 26 se muestran las bandas representativas obtenidas de la amplificación de los ARNs de los seis transportadores al inicio (día 0) de la fermentación, luego de que las levaduras estuvieran sometidas a un período de inanición (suspensión en agua destilada) durante 48 horas.

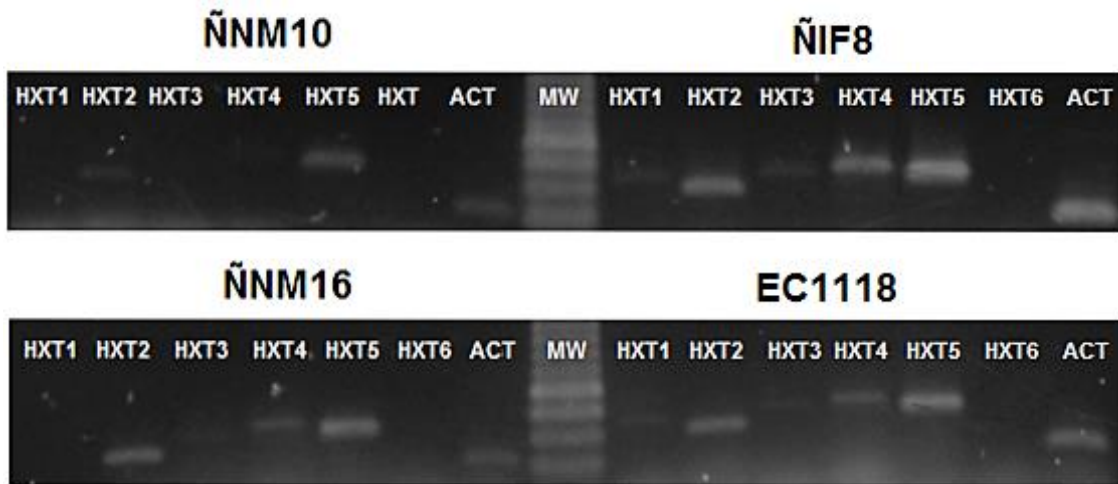


**Figura 26:** Fotografía de un gel representativo resultante de la corrida electroforética de los amplificadores de los seis transportadores principales de las levaduras seleccionadas al inicio de la fermentación. La banda de actina se utilizó como patrón de expresión y amplificación. (HXT1-6: Transportadores de Hexosas; ACT: Actina; MW: Marcador de Peso Molecular).

Luego de una privación de nutrientes por 48 h, se observa una banda muy tenue correspondiente a la transcripción de HXT1, patrón común a todas las cepas. Para los transportadores HXT2 y HXT5, se observan bandas intensas en todas las cepas, en tanto que las bandas correspondientes a HXT3 y HXT4, aparecen muy suaves, denotando una baja transcripción. Notablemente, la banda correspondiente al transcripto de *HXT6/7*, no aparece visible. En la última calle, las bandas correspondientes al control de transcripción constitutiva de Actina, se observan claramente en las cuatro cepas.

En la Figura 27, se observan las bandas obtenidas por aislamiento y amplificación de los *HXTs* al día 14 de la fermentación.





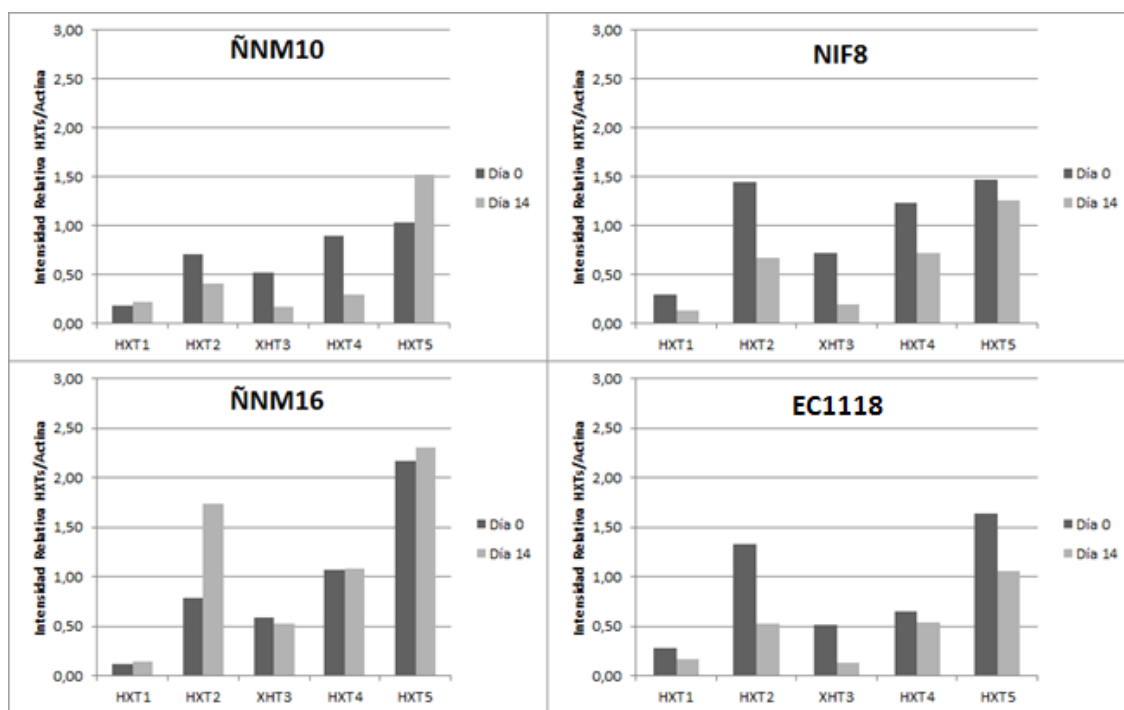
**Figura 27:** Fotografía de un gel representativo resultante de la corrida electroforética de los amplificadores de los seis transportadores principales de las levaduras seleccionadas al día 14 de la fermentación. La banda de actina se utilizó como patrón de expresión y amplificación. (HXT1-6: Transportadores de Hexosas; ACT: Actina; MW: Marcador de Peso Molecular).

Al día 14 de la fermentación, la expresión de los transportadores aparece con patrones diferentes. La expresión de *HTX1* es apenas visible a simple vista en las cepas estudiadas, en tanto que *HTX2* y *HTX5* muestran una intensidad notable respecto a las otras bandas. Para esta etapa de la fermentación, la expresión de *HTX3* no produce una banda intensa, de la misma forma que *HTX4*. En la última calle, se observa claramente la banda de Actina, utilizada como control de transcripción.

Notablemente, en ninguno de los estudios, se evidencia la expresión del gen de transportador *HXT6/7*, incluso bajo distintas condiciones de amplificación probablemente por algún fallo en la secuencia del primer utilizado.

Las intensidades de las bandas de los transportadores fueron referidas a las intensidades del patrón de actina para cada cepa, según los valores obtenidos a través del programa ImageJ.

En la Figura 28 se muestran estos valores relativos (Intensidad del *HXT*/Intensidad de Actina) para los estadíos 0 y 14 de la fermentación, ya que fueron los momentos en los que se evidenció una mayor diferencia de expresión entre las distintas cepas.



**Figura 28:** Intensidades Relativas (Intensidad del HXT/Intensidad de Actina) para las cepas estudiadas a los días 0 (cero) y 14 (catorce) de la fermentación.

Dichas relaciones de intensidad se compararon estadísticamente entre las cuatro cepas para los días 0 (cero), 7 (siete), 14 (catorce) y 21 (veintiuno) de las fermentaciones en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10%. A continuación, se detalla el comportamiento de los transportadores estudiados a lo largo de la fermentación:

**HXT1:** Tanto en las tres cepas nativas como en la cepa control, los valores de las relaciones de intensidades HXT1/Actina mostraron un patrón semejante, con valores superiores hacia el día 7 de la fermentación y con expresiones menores en las muestras tomadas en los días 0 (al inicio), 14 y 21 de la fermentación. Sin embargo, no se demostró diferencia significativa entre las cepas estudiadas.

**HXT2:** Este transportador de alta afinidad asociado a fase lag, tiene una expresión importante cuando en el medio la concentración de hexosas es baja. En las cepas ÑNM10, ÑIF8 y EC1118, la expresión de dicho transportador evidenció valores superiores en momentos previos al cultivo, día cero, que durante la fermentación. Sorprendentemente, en la cepa ÑNM16, la relación de intensidades *HXT2*/Actina al día catorce es estadísticamente superior ( $p < 0,05$ ). Si se observan los valores de glucosa y fructosa medidos en el medio de cultivo en ese día, los mismos son los más bajos de las cuatro cepas para esa etapa de la fermentación. Este dato, podría interpretarse como la capacidad de la cepa de consumir los azúcares y llegar con menores cantidades de los mismos antes que las otras cepas estudiadas.

**HXT3:** La expresión del transportador *HXT3* se considera constitutiva a lo largo de la fermentación, aunque pudo observarse en este caso, una disminución de su expresión hacia el día 14, resultado común a las cuatro cepas estudiadas.

**HXT4:** Los resultados obtenidos al medir la expresión de este transportador fueron semejantes en las muestras tomadas a lo largo de toda la fermentación. Por otra parte, este patrón no demostró diferencias significativas entre las cuatro cepas estudiadas.

**HXT5:** Asociado a condiciones de estrés, su transcripción demostró ser significativamente más alta al inicio de la fermentación en dos de las cepas nativas y en la cepa control, revelando el hambreado por 24 horas a que fueron sometidas estas levaduras antes de la inoculación, y al día 14, cuando las concentraciones de azúcares se volvieron limitantes y las cepas comenzaban a estar nuevamente en inanición. Por el contrario, cuando las muestras fueron estudiadas al día 7 de la fermentación, cuando aún había suficiente fuente carbonada, la expresión de *HXT5* mostró ser estadísticamente más baja. Probablemente hacia el día 21, la misma reducción del metabolismo general de las levaduras llevó a encontrar niveles más bajos en la expresión de este transportador que los registrados al día 14.

De los transportadores estudiados, sólo *HXT2* y *HXT5* mostraron diferencias significativas entre las cepas estudiadas. Estos resultados se muestran en las Tablas 13 y 14 respectivamente.

**Tabla 13. Intensidades Relativas HTX2/Actina**

	<i>Día 0</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 14</i>	<i>Día 21</i>
<b>ÑNM10</b>	0,545 ± 0,138 <sup>bc</sup>	0,442 ± 0,310 <sup>bc</sup>	0,515 ± 0,150 <sup>bc</sup>	0,517 ± 0,153 <sup>abc</sup>
<b>ÑIF8</b>	1,008 ± 0,538 <sup>ab</sup>	0,410 ± 0,127 <sup>bc</sup>	0,603 ± 0,275 <sup>abc</sup>	0,421 ± 0,197 <sup>bc</sup>
<b>ÑNM16</b>	0,722 ± 0,458 <sup>abc</sup>	1,104 ± 0,824 <sup>ab</sup>	1,205 ± 0,855 <sup>a</sup>	0,888 ± 0,397 <sup>abc</sup>
<b>EC1118</b>	0,818 ± 0,558 <sup>abc</sup>	0,325 ± 0,062 <sup>c</sup>	0,547 ± 0,279 <sup>bc</sup>	0,496 ± 0,238 <sup>bc</sup>

Promedios de las intensidades relativas para cada una de las cepas estudiadas y la cepa control a lo largo de las fermentaciones con sus correspondientes desvíos estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Como se observa, no aparece una diferencia significativa que coloque a la expresión del transportador HTX2 al día cero en grupos heterogéneos entre las cepas. Al día siete, la relación de intensidades muestra un grupo de menor expresión en EC1118. Notablemente, al día 14 de la fermentación, ÑNM16 muestra valor superior al resto de las cepas en la expresión de este gen. Sin embargo, al día 21, las diferencias de intensidades relativas de HTX2, vuelven a presentarse como grupos homogéneos.

**Tabla 14. Intensidades Relativas HTX5/Actina**

	<i>Día 0</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 14</i>	<i>Día 21</i>
<b>ÑNM10</b>	0,835 ± 0,467 <sup>b</sup>	0,364 ± 0,085 <sup>b</sup>	0,734 ± 0,686 <sup>b</sup>	0,381 ± 0,205 <sup>a</sup>
<b>ÑIF8</b>	1,051 ± 0,522 <sup>ab</sup>	0,433 ± 0,150 <sup>b</sup>	0,918 ± 0,475 <sup>ab</sup>	0,409 ± 0,128 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	1,164 ± 0,940 <sup>ab</sup>	0,375 ± 0,181 <sup>b</sup>	1,428 ± 1,264 <sup>a</sup>	0,579 ± 0,355 <sup>a</sup>
<b>EC1118</b>	1,231 ± 0,454 <sup>ab</sup>	0,433 ± 0,044 <sup>b</sup>	1,121 ± 0,387 <sup>ab</sup>	0,734 ± 0,829 <sup>a</sup>

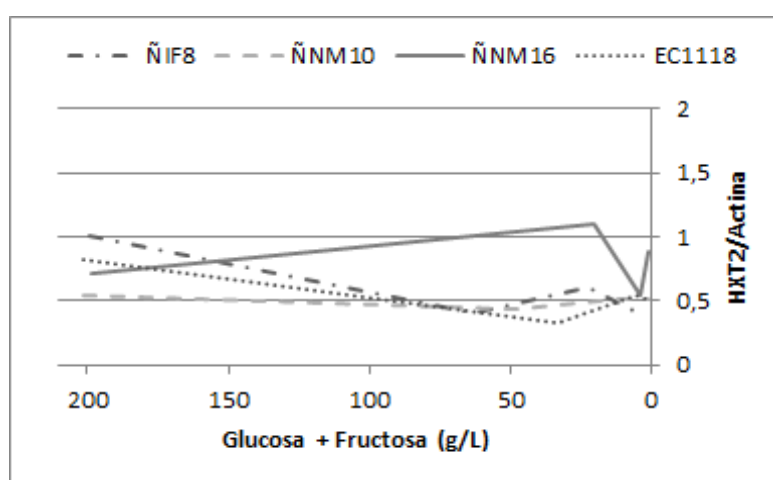
Promedios de las intensidades relativas para cada una de las cepas estudiadas y la cepa control a lo largo de las fermentaciones con sus correspondientes desvíos estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

El análisis de las intensidades relativas de las bandas para la expresión de HXT5, no mostró diferencias significativas entre las cepas para los días 0 y 7. Sin embargo, se alcanza a apreciar un aumento de intensidad en esta banda estadísticamente diferente para ÑNM16 al día 14, revelando un incremento en la transcripción de este transportador en esta etapa de la fermentación. Al día 21, nuevamente, no aparecen diferencias significativas en la expresión de este transportador entre las cepas estudiadas.

## 5.5 Relación de la Expresión de los transportadores en función de las concentraciones de hexosas

Por combinación de los datos obtenidos, se confrontaron los cambios en las intensidades relativas de las bandas de expresión de los dos transportadores seleccionados en función concentraciones de Glucosa más Fructosa, a lo largo de la fermentación.

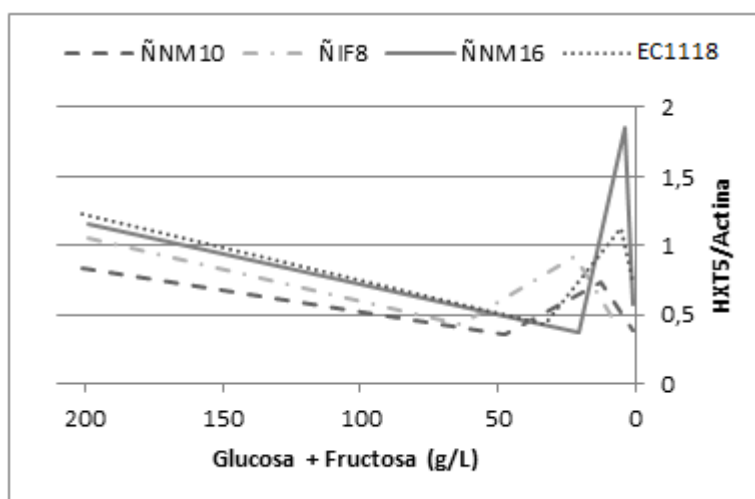
En la Figura 29, se muestra el cambio de las intensidades relativas de HXT2 en función de la concentración total de hexosas.



**Figura 29:** Cambio de la Relación en la expresión de *HXT2* con respecto a la expresión de Actina en función de los cambios de concentración de azúcares medidos en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10% para cada una de las cepas.

La expresión de *HXT2* exhibe un motivo semejante en las cepas ÑNM10, ÑIF8 y EC1118, con una transcripción importante en el momento de la inoculación al caldo, proviniendo de un medio sin ninguna fuente nutritiva. Es de notar, que la cantidad de azúcares al momento de la inoculación en caldo, sumaba un valor de 200 gL<sup>-1</sup>. Hacia concentraciones de azúcares menores, de unos 50 gL<sup>-1</sup>, como las encontradas alrededor del séptimo día de fermentación, la expresión de *HXT2* disminuye sensiblemente para luego aumentar. Sin embargo, este patrón no es compartido por la cepa ÑNM16, donde la transcripción de este gen parece incrementar a bajas concentraciones de hexosas, hacia el final de la fermentación.

Por otra parte, analizando las expresiones relativas a Actina de *HXT5*, los valores más importantes para las cuatro cepas estudiadas se encontraron en el momento de la inoculación y hacia fines de la fermentación (Figura 30).



**Figura 30:** Cambio de la Relación en la expresión de *HXT5* con respecto a la expresión de Actina en función de los cambios de concentración de azúcares medidos en caldo Glucosa 10% - Fructosa 10% para cada una de las cepas.

De esta manera, el patrón de expresión de este gen en las cuatro cepas mostró una disminución a lo largo de la fermentación, donde los azúcares eran abundantes, aumentando nuevamente hacia la finalización de la misma. Sin embargo, es destacable el pico producido en la expresión de este transportador en la cepa ÑNM16, pasando, de menos de un 50%, a casi el doble de la relación respecto a la expresión del gen constitutivo de Actina. Hacia el día 21, donde las concentraciones de azúcares son cercanas a cero, la expresión de estos transportadores nuevamente decrece.

## 5.5 Análisis Físicoquímicos de los Vinos

El análisis físicoquímico de los vinos al finalizar la fermentación alcohólica se realizó conforme a los parámetros y métodos establecidos por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). Para la caracterización final del producto de la fermentación sobre mosto de uvas variedad Pinot noir de cada una de las tres cepas seleccionadas, ÑNM10, ÑIF8 y ÑNM16, y de la cepa control EC1118, se analizaron por duplicado las concentraciones de ácido acético, glicerol, ácido láctico, pH, etanol (% etanol V/V), Azúcares Reductores Totales ( $\text{gL}^{-1}$ ) y ácido málico, importantes en la caracterización final de un vino (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros Físicoquímicos al Final de la Fermentación Alcohólica.

	<b>Acético (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>Glicerol (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>Láctico (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>pH</b>	<b>Etanol(% V/V)</b>	<b>ART (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>Málico (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>
<b>ÑNM10</b>	0,74 ± 0,08 <sup>a</sup>	12,76 ± 2,15 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,052 <sup>a</sup>	14,40 ± 0,85 <sup>a</sup>	6,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>ÑIF8</b>	0,75 ± 0,11 <sup>a</sup>	12,26 ± 1,48 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,56 ± 0,021 <sup>a</sup>	14,00 ± 0,57 <sup>a</sup>	3,63 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>ÑNM16</b>	0,68 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,15 ± 0,49 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,055 <sup>a</sup>	14,60 ± 1,13 <sup>a</sup>	4,40 ± 1,63 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,51 <sup>a</sup>
<b>EC1118</b>	0,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	12,21 ± 1,24 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,43 <sup>a</sup>	3,56 ± 0,082 <sup>a</sup>	14,40 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,82 ± 1,83 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,40 <sup>a</sup>

Parámetros físicoquímicos obtenidos al final de la fermentación vinica con sus correspondientes desvíos estándares. En cada columna, letras equivalentes indican pertenencia a un mismo grupo a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Los vinos fermentados con las cuatro cepas evaluadas mostraron adecuados parámetros enológicos, compatibles con un vino del varietal Pinot noir. El análisis estadístico, reveló que no existen diferencias significativas entre cada una de las cepas para cada uno de los análisis realizados.

## 6 Discusión

Esta tesis fue llevada a cabo bajo la hipótesis de que cepas de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de mostos de una bodega de la región Norte de la Patagonia presentan un metabolismo mejor adaptado que los cultivos iniciadores comerciales a las características agroecológicas de los cultivares locales y por lo tanto pueden contribuir a un mejor consumo del sustrato nativo, rindiendo vinos de una calidad fisicoquímica superior.

De esta forma se compararon los comportamientos fermentativos de ocho cepas aisladas de una bodega de la región del Comahue, a fin de evaluar su potencial utilización en la producción vínica local, en primera instancia y, en un estudio un poco más profundo, identificar la presencia y recambio de los principales transportadores de hexosas, como elementos determinantes de la cinética de la fermentación, dado que el transporte de azúcares en la membrana de la levadura es el paso limitante en la velocidad de este proceso metabólico.

La secuencia de pruebas permitió poner en evidencia los procesos adaptativos de las cepas y su potencial utilización en el área tecnológica.

### 6.1 Resistencia Osmótica

Los resultados obtenidos en el ensayo de Resistencia Osmótica a altas concentraciones de azúcares revelaron que todas las cepas estudiadas toleran dichas condiciones de forma similar, sin diferencias significativas entre ellas, indicando que las mismas se encuentran adaptadas a las concentraciones de azúcares que frecuentemente presentan los mostos de uva, como las simuladas en el ensayo.

Si bien estas cepas fueron aisladas de mostos, su capacidad de participar en fermentaciones vínicas debía confirmarse. En los tres tratamientos estudiados a fin de evidenciar la osmotolerancia, agar YNB con 20% de Glucosa, agar YNB con 20% de Fructosa, se observó desarrollo de colonias. Concentraciones tan elevadas de un metabolito como las encontradas en estos medios, generan estrés debido a la Presión Osmótica alcanzada, con una importante reducción en el agua disponible ( $a_w$ ) menor a 0,85 (ICMSF, 1980). Según Combina y col. (2008), la combinación de esta alta concentración de azúcares junto a un bajo pH permite que sólo un reducido número de microorganismos como levaduras osmotolerantes y mohos pueden llegar a desarrollarse en jugos concentrados de uva, matriz semejante al mosto utilizado para vinificación.

Aun habiendo podido crecer, las colonias desarrolladas en el medio con 20% de Fructosa, no alcanzaron cualitativamente los mismos tamaños que en los otros dos medios.

Posiblemente, sumado al estrés que condicionaba a las células a modificar su metabolismo con la producción de sustancias osmóticamente activas como glicerol o trehalosa (Sharma, 1997), la conocida preferencia de las células de levadura por glucosa sobre fructosa (Berthels y col., 2004) y las limitantes nutricionales de crecer en un medio sintético definido, podrían haber generado una menor eficiencia en la producción de energía a través de la vía fermentativa, retrasando el crecimiento de las levaduras en este medio. Por otra parte, Brauer y col. (2005), observaron una disminución en el volumen celular en respuesta a condiciones de estrés, aunque la capacidad de división no cesase.

En este contexto, se ha evaluado en trabajos previos que, en el caso de levaduras creciendo en anaerobiosis en mosto de uva, la producción de glicerol es el único mecanismo que permite la regeneración del NAD<sup>+</sup> necesario para la biosíntesis, y como consecuencia esta vía resulta en un menor rendimiento de ATP y en una baja producción de biomasa. Estas mismas levaduras creciendo en aerobiosis, regeneran el NAD<sup>+</sup> en la respiración celular y el glicerol producido es menor que en anaerobiosis. Sin embargo, si existe la necesidad de producir glicerol debido de las condiciones del medio y a la presión que ejerce el estrés osmótico del mismo, esto lleva entonces a las células crecidas en aerobiosis a disminuir su tasa de crecimiento, efecto que podrían estar sufriendo las levaduras en estos ensayos (Ciani y col., 2000).

## 6.2 Fermentaciones en Mostos Sintéticos y Naturales

Las cepas nativas de la región norte de la Patagonia que fueron estudiadas a lo largo de esta Tesis, mostraron desempeños fermentativos muy buenos en mostos sintéticos, mejores aún al ser estudiadas sobre mostos naturales.

Tanto en el mosto sintético (caldo Glucosa 10%-Fructosa 10%) como en el mosto de uvas variedad Pinot noir, la disminución en la concentración de glucosa precedió a la de fructosa, con valores superiores de fructosa remanente que de glucosa remanente para el mismo día de muestreo. Este comportamiento fue observado de la misma forma para las tres cepas nativas y la cepa control.

Para llevar a cabo el ensayo del consumo de los azúcares en cada condición estudiada se trabajó con inóculos iniciales de las levaduras de 10<sup>5</sup> ufc/mL. Esta cantidad llevó a que las fermentaciones fueran menos bruscas, permitiendo identificar los parámetros de la curva de crecimiento de forma más definida y precisa. La utilización de caldos conteniendo un solo tipo de hexosa (glucosa o fructosa) o una mezcla equimolar de ambas, mostró diferencias



importantes en cuanto a las características del transporte, estableciendo así una “preferencia” por uno u otro azúcar o la mezcla de ambos.

De las ocho cepas nativas estudiadas en la Primera Etapa de acuerdo a sus perfiles de desarrollo en caldo, tres fueron seleccionadas para continuar con el estudio de expresión de transportadores y fermentación en una matriz de mosto de uvas variedad Pinot noir. Así, las cepas ÑNF8, ÑIF5, ÑNF7, ÑNF9 y ÑNM13, fueron descartadas para continuar con los estudios a nivel molecular y en mosto.

**Cepa ÑNM10:** Su capacidad fermentativa promedio fue considerable, llegando a velocidades de Pérdida de Peso Acumulada como CO<sub>2</sub> superiores en el caldo que contenía la mezcla equimolar de glucosa y fructosa, aunque también mostró un buen desempeño en los caldos que contenían cualquiera de los dos azúcares por separado. Esta característica la llevó a ser seleccionada como representante de la mejor actividad de consumo en el medio cuya fuente carbonada era la mezcla de glucosa y fructosa.

**Cepa ÑIF8:** Esta cepa mostró una capacidad de fermentación en el caldo con glucosa muy superior a todas las otras cepas estudiadas. Fue seleccionada como representante de perfil glucofílico para los estudios que se realizarían posteriormente, aunque su desempeño en el consumo de los azúcares en los otros caldos, fructosa y la mezcla glucosa/fructosa, también fue muy aceptable. Paralelamente, en fermentaciones a escala piloto realizadas por el grupo de investigación sobre mostos Pinot noir, Merlot y Malbec, esta cepa condujo la fermentación hacia un producto de características organolépticas superiores al control (Simes, Caballero y del Mónaco, 2015), generando un vino con cuerpo y redondez sensorial distintivo, preferido por los consumidores de distintos orígenes y en distintos años de fermentación.

**Cepa ÑNM16:** Al desarrollar los perfiles metabólicos de las fermentaciones en distintos medios, esta cepa mostró un perfil de preferencia por la fructosa, superior a los otros. Esto fue evidenciado por un nivel asintótico más alto, una tasa de crecimiento más importante y una menor fase lag al modelar su desempeño según los resultados de las pruebas realizadas en el caldo con fructosa, frente a los correspondientes parámetros modelados en base a los resultados arrojados por las pruebas en caldo glucosa y la mezcla glucosa/fructosa. Por otra parte, al ser inoculada en el mosto de uvas variedad Pinot noir, la velocidad de consumo de los azúcares presentes, no fue estadísticamente diferente a la de las otras cepas comparadas, incluso frente a la cepa control. Esta observación sería concordante con las observaciones de (Luyten, Riou y Blondin, 2002), donde los autores proponen que los resultados obtenidos sobre mostos sintéticos, podrían diferir de los observables en fermentaciones sobre mostos naturales ya que las cepas presentan diferentes estados nutricionales y se encuentran bajo prácticas

enológicas específicas. Además, el medio natural resulta siempre más complejo que los medios sintéticos, aportando a las levaduras compuestos no estudiados que pueden ser importantes para su desarrollo.

Estudios posteriores a escala piloto, se desarrollan actualmente a fin de evaluar las aptitudes fisicoquímicas y sensoriales de un producto terminado utilizando esta cepa como conductora de la fermentación. Esta cepa, fue seleccionada por su capacidad de consumir fructosa para continuar con los estudios moleculares posteriores.

**Cepa EC1118:** Las fermentaciones realizadas con esta cepa fueron principalmente con fines comparativos para evaluar el comportamiento de las cepas nativas frente a un patrón estudiado intensamente, del cual pueden encontrarse resultados en la bibliografía tanto con aplicaciones enológicas como en microbiología básica. Su comportamiento en caldo mostró buenos perfiles de consumo para glucosa y para la mezcla de azúcares, aunque con un desempeño un poco menos vigoroso en el caldo con fructosa.

### 6.3 Pérdida de Peso como CO<sub>2</sub> (Modelada según Ecuación de Gompertz Reparimetrizada)

Cuando las levaduras nativas y control fueron estudiadas en caldo Glucosa 20% como única fuente carbonada, mostraron tasas de desarrollo más importantes (parámetro *m* en la ecuación de Gompertz Reparimetrizada), que generaron valores asintóticos (*A*) superiores incluso a la concentración real del caldo, 200 gL<sup>-1</sup>, que los registrados y modelados para los otros medios estudiados. Esta característica mostró la preferencia por la glucosa como fuente carbonada en las levaduras sacaromycéticas analizadas, aunque con distintas velocidades de desarrollo, según la cepa.

Los valores de los parámetros *A* y *m* que modelan estas curvas fueron inferiores en los caldos con Glucosa 10%-Fructosa 10% y en los caldos Fructosa 20% respectivamente, evidenciando un metabolismo menos favorecido. Por otra parte, los transportadores de hexosas de la membrana celular de las levaduras, presentan afinidades mayores para la glucosa

De las cepas que fueron seleccionadas según su desempeño en caldo para ser estudiadas en mosto, ÑNM10 mostró una capacidad fermentativa regular en los caldos de Glucosa 20% y de Fructosa 20%. Sin embargo, en el caldo conteniendo la mezcla de ambos azúcares su desempeño fue superior. Bajo estos resultados, su sistema fermentativo parecería ser más eficiente al contar con la presencia de ambas hexosas a la vez o, de otra forma, la menor

concentración de glucosa estaría produciendo una menor inhibición de los transportadores y de su regulación funcional.

La cepa que presentó el mejor perfil para la utilización de la glucosa fue la ÑIF8. Aunque su capacidad fermentativa en caldo Fructosa 20% no fue tan buena, en mosto de uvas variedad Pinot noir mostró un muy buen desempeño. Esta cepa arrojó valores finales de los metabolitos medidos, altamente semejantes a la cepa comercial EC1118, mostrando un muy buen potencial para su uso en el área enológica. De hecho, esta levadura fue seleccionada para estudios a escala piloto de fermentaciones en mostos patagónicos, como se mencionara previamente (Simes, Caballero y del Mónaco, 2015).

En las primeras fermentaciones, ÑNM16 mostró una preferencia significativa por la fructosa. Esta cepa parecería tener un potencial enológico muy importante. Los perfiles de consumo de azúcares en caldo y vino mostraron una alta eficiencia, degradando tanto glucosa como fructosa con parámetros cinéticos diferenciales. En los análisis de expresión de los transportadores en función de la concentración de azúcares totales, entre las características más notorias de esta cepa, la expresión de *HXT2* y *HXT5*, transportadores asociados al estrés (Ruiz, Serrano y Ariño, 2008) arrojó valores estadísticamente superiores. Datos de este tipo inducen a la idea de que los mecanismos asociados al estrés, en esta cepa, son superiores a los de las otras cepas estudiadas, insinuando una mayor probabilidad de supervivencia frente a condiciones estresantes como la deshidratación e inanición. El aumento en la expresión de ambas proteínas de membrana registrado el día 14, hacia el final de la fermentación, concordaría con la teoría de que la célula estaría preparándose a entrar en estado de inanición comenzado a utilizar hexosas para la formación de metabolitos osmóticos, como glicerol o trehalosa, además de tener en membrana un transportador de alta afinidad listo para competir por azúcares cuando el medio vuelva a ser favorable (Gasch, y col., 2000; Verwaal, y col., 2002; Ruiz, Serrano y Ariño, 2008).

#### **6.4 Consumo de Azúcares (Modelado según Ecuación de Taoukis modificada por Arroyo-López)**

Al modelar el consumo de fructosa en el caldo Glucosa 10%-Fructosa 10%, el parámetro  $k_c$ , asociado a la velocidad de utilización o tasa de cambio en la concentración de fructosa remanente, generó valores muy pequeños, comparados con los de otros medios. Cambios tan pequeños en la velocidad de consumo, llevaron a la obtención de valores negativos para el parámetro  $D$ , la asíntota de la curva a  $t \rightarrow \infty$ , en las cuatro cepas estudiadas, alcanzando una

estabilidad teórica a valores de concentración inferiores a 0 (cero), sin sentido físico. Estos datos indicarían que, en estas condiciones, cuando en el medio hay glucosa y fructosa la utilización de la primera es preferencial. Si bien las levaduras pueden utilizar concomitantemente la fructosa, éste no es el azúcar preferido y por lo tanto, la velocidad de consumo se ve enlentecida (Berthels y col., 2004). Asociado a esto, las afinidades de los transportadores expresados, en todos los casos, eran mayores para glucosa (Reifenberger, Boles y Ciriacy, 1997), favoreciendo de esta manera, la utilización de este sustrato. Sin embargo, los valores de modelado para este azúcar en vino fueron diferentes, con un sentido físico concreto. Estos datos estarían demostrando que, en un entorno de origen natural tan complejo como el mosto de uvas, con otros componentes nutritivos, como vitaminas, polifenoles, lípidos y otros azúcares disponibles, la maquinaria fermentativa de las células se comporta de manera más robusta, aumentando la eficiencia en el consumo de ambos azúcares en una proporción similar en todas las cepas ensayadas, excepto en la ÑNM16; en esta cepa en particular el aumento en la tasa de consumo fue relativamente mayor para la fructosa (80%) que para la glucosa (20%) (Tablas 7, 8, 9 y 10), poniéndose en evidencia nuevamente el mayor carácter fructofílico de esta cepa ya demostrado en los ensayos con medio sintético.

Berthels y col., (2004) observaron que los altos niveles de etanol generalmente inhiben la utilización de hexosas, pero con un efecto diferencial sobre la utilización de glucosa y de fructosa. En mostos suplementados con etanol encontraron que la utilización de fructosa estaba significativamente más inhibida que la utilización de glucosa, demostrando una mayor robustez en el sistema de utilización de la glucosa bajo condiciones de alto estrés por etanol. Esto sustenta la idea de que la reducción de la utilización de fructosa hacia finales de la fermentación podría ser una de las principales causas de las fermentaciones lentas y paradas en la fermentación. Probablemente este efecto sería el responsable de los resultados obtenidos en la medición de glucosa y fructosa en el caldo conteniendo los dos azúcares, donde se observan valores finales superiores de fructosa que de glucosa. Por otra parte, el etanol también favorece un cambio en el equilibrio tautomérico de fructopiranososa a fructofuranosa (Flood, Johns y White, 1996), y esto podría reducir aún más la afinidad de los transportadores de fructosa, disminuyendo la velocidad de ingreso de esta hexosa a la célula. Apoyando nuestros resultados, Tronchoni y col., (2009) encontraron que el tiempo necesario para consumir el 50% de la fructosa es mayor que el tiempo necesario para consumir el 50% de la glucosa, demostrando el carácter glucofílico de las levaduras de la especie *Saccharomyces*.

Varios son los motivos por los cuales la fructosa permanecería elevada hacia finales de la fermentación. De esta forma, uno de los desafíos en la selección de cepas para la fermentación vínica es encontrar individuos fructofílicos capaces de conducir o colaborar en este proceso.

## 6.5 Cinética de los Transportadores de Hexosas

La técnica de semicuantificación de transcriptos por RT-PCR relativa utilizando el gen de Actina como control interno, ha sido ampliamente utilizada en la literatura en distintos modelos celulares (Favre y col., 1997; Medhurst y col., 2000; Jeong y col., 2003; Gravot y col., 2004, Eis y col., 2005, entre muchos otros trabajos) incluidas las levaduras (Eckhardt y col., 2001, Santiago & Ben Mamoun, 2003; Fernandes y col., 2004; entre otros). Se considera que este gen “housekeeping” que genera una proteína del citoesqueleto celular permanece en concentraciones constantes a lo largo de la vida de los diferentes organismos. Sin embargo, en algunos trabajos se ha cuestionado su uso en determinados modelos en los que se ha observado variabilidad de la expresión del gen de la actina dependiendo de estímulos específicos (Serazin-Leroy y col., 1998; Harrison y col., 2000; Glare y col., 2002). Para evitar cometer errores relativos a la técnica, en este trabajo se realizaron todos los controles correspondientes y se analizó la linealidad de la expresión del gen de actina que permitieron inferir datos a partir de los resultados obtenidos.

Según Guillaume y col., (2007), las diferencias de velocidades de utilización de glucosa y fructosa por diferentes cepas de *S. cerevisiae* durante una fermentación vínica, serían atribuibles a las diferencias en la eficiencia del transporte de estos dos azúcares. Así, estimando que en un medio con cantidades equimolares de glucosa y fructosa los transportadores tuvieran una mayor afinidad por la primera, hacia el final de una fermentación, las cantidades de fructosa serían superiores. Probablemente la cepa ÑNM16 estaría demostrando una mayor adaptación a medios con estas características a través de un aumento en la expresión de *HTX2*, como queda demostrado al ser comparado con la expresión de un gen constitutivo como el de Actina.

Greatrix y van Vuuren (2006) encontraron que la inducción de *HXT2* fue dos veces mayor en un cultivo al 2% de fructosa que en uno al 2% de glucosa. Estos hallazgos insinuarían una preferencia en la expresión de este transportador en situaciones donde la fructosa se acerca a estas concentraciones, como las encontradas, por ejemplo, a finales de una fermentación vínica (Figura 24).

Ruiz y col., (2008) demostraron que el gen *HXT2* es rápida y potentemente inducido por alcalinización del medio ambiente, y esto requiere tanto las vías de Snf1 y de calcineurina. La calcineurina es una proteína fosfatasa de Ser/Thr que puede ser activada por un aumento transitorio en el calcio citosólico generado por estrés. La regulación por calcineurina está mediada por el factor de transcripción Crz1, que se trasloca rápidamente al núcleo frente a

condiciones de estrés y actúa a través de un elemento de unión Crz1 (elemento de respuesta dependiente calcineurina) sobre el promotor de *HXT2*.

La expresión de *HXT2* hacia el final de la fermentación en la cepa ÑNM16 podría presentarse como una variación adaptativa que le permita desarrollarse mejor en medios que la condicionan al estrés y con mayor relación de concentración de fructosa con respecto a la glucosa. Oliva Hernández y col., (2012), reportan varios cambios en la secuencia de aminoácidos en los transportadores de hexosas, que permitirían adaptaciones de las cepas al medio ambiente.

El cambio en la expresión de los Transportadores de Hexosas a lo largo de las fermentaciones reveló diferencias interesantes en la respuesta de cada cepa frente a la caída de las concentraciones de azúcares en el medio circundante. De los ARNs de los Transportadores estudiados, *HXT2* y *HXT5* son los que mostraron cambios importantes en las cepas patagónicas. Notablemente, estos dos transportadores son los que, normalmente, aparecen asociados a circunstancias de estrés (Ruiz, Serrano y Ariño, 2008; Vewaal y col., 2004) y al analizar la expresión de éstos frente a las concentraciones de glucosa y fructosa a lo largo de las fermentaciones en caldo estudiadas, se pueden observar patrones de comportamiento diferenciales entre cada una de las cuatro cepas.

Esta característica revela un interesante comportamiento en cuanto al disparo de los mecanismos que permitirían a estas levaduras la supervivencia en condiciones de estrés. El glucógeno y la trehalosa son carbohidratos de reserva que la levadura acumula frente a procesos en los que el ciclo celular se ve afectado (Silljé y col., 1997), cambios en la velocidad del crecimiento celular, escasez de nitrógeno o estrés. Se ha sugerido que, además de funcionar como factores de almacenamiento y protectores de estrés, estos hidratos de carbono pueden ser necesarios para la progresión del ciclo celular a bajas tasas de crecimiento debido a una limitación de las fuentes de carbono (Paalman, 2001). Verwaal y col. (2002) observaron un aumento en la inducción de *HXT5* cada vez que la célula acumulaba trehalosa, incluso en diferentes condiciones de cultivo. De la misma forma, en análisis genómicos frente a condiciones de estrés, se encontró que *HXT5* es inducido en forma concomitante con genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos de reserva (Gasch y col., 2000). Según los resultados de Verwaal y col. (2002), ningún otro transportador de hexosas presentó estas características y, teniendo en cuenta la gran diferencia en el dominio amino terminal intracelular de Hxtp5, esta proteína tendría una función específica en la acumulación y metabolismo de carbohidratos de reserva, como la captación de glucosa destinada a la producción de trehalosa frente a condiciones que inducen una disminución en la velocidad de crecimiento. Además, se demostró que *HXT5* es inducido frente a escasez de nitrógeno (condición semejante a la presente a finales

de una vinificación), cuando los transportadores de afinidad semejante, Hxt6p y Hxt7p, son degradados por proteólisis bajo las mismas condiciones (Krampe, Stamm y col., 1998; Buziol y col., 2002).

Según Diderich y col. (1999), Htx5p parece inactivo bajo condiciones enológicas. Sin embargo, esto probablemente pueda deberse a la falta de expresión de los genes debido a que sólo se expresa al máximo después de agotamiento completo de azúcar (Wieczorke y col., 1999). No obstante, las cuatro cepas de *S. cerevisiae* estudiadas, presentaron un aumento en la expresión de este gen hacia finales de la fermentación, cuando los azúcares ya se estaban agotando (Verwaal y col., 2004). Así, al entrar las células en estado de inanición, la producción de estas proteínas, ancladas ya en membrana, cesaría, cayendo así nuestros registros en la expresión de ARN.

Por otra parte, células que expresaban *HXT5* como único transportador de hexosas, al ser estudiado en un medio conteniendo etanol, su velocidad máxima disminuyó en un 66% en células en fase exponencial y un 44% en células en fase estacionaria. De todos los siete transportadores estudiados, Hxt5p fue el que menor inhibición mostró en fase estacionaria, en concordancia con su función como transportador de hexosas en condiciones de estrés (Santos y col. 2008). A su vez, Hxt5p es responsable de una importante actividad de captación de glucosa en células en inanición (Bermejo y col., 2010). En estudios realizados *in vivo* se vio que las levaduras indujeron expresión de *HTX5* en ausencia de glucosa. Esta observación parecería no ser concordante con el metabolismo en inanición, dado que su producción requiere energía, que es limitada, y el transportador estaría inactivo cuando falta el sustrato. El gasto sólo sería útil si el transportador provee una ventaja competitiva, por ejemplo, si permite a la célula tomar glucosa inmediatamente cuando una nueva fuente vuelva a estar disponible (Bermejo y col., 2013).

Así, siendo de origen patagónico, la cepa ÑNM16 habría desarrollado, entre otra de sus adaptaciones evolutivas, un aumento en la producción de *HXT5*, proteína de transporte que le habría permitido sobrevivir en el clima reinante en estas zonas y ligado usualmente a condiciones de estrés. Su resistencia a condiciones de estrés, sumada a su corta fase de acostumbramiento a un nuevo medio (fase lag), es un fuerte indicio para estudiar su capacidad de supervivencia a condiciones de deshidratación, como las que se llevan a cabo en una formulación de tipo comercial, seguida de una pronta activación y conducción de una fermentación vínica.

## 6.6 Análisis fisicoquímico de los vinos

Los vinos fermentados con las cuatro cepas evaluadas mostraron parámetros fisicoquímicos esperados para la fermentación de un vino varietal Pinot noir (Catania y Avagnina, 2010). Los resultados obtenidos evidencian que las levaduras indígenas presentan propiedades adecuadas para ser utilizadas con propósitos enológicos, capaces de ser utilizadas como cultivos iniciadores para el control de una fermentación vínica.

Según Swigers y col. (2005) ácido acético y glicerol son los subproductos de la fermentación de hexosas más importantes. La concentración de ácido acético depende de la variedad de uva y el estilo de vino, así como los demás compuestos que lo acompañan en el contexto del mosto elegido. En nuestros experimentos, este compuesto se encontró por debajo del umbral de detección sensorial que se considera objetable ( $0,8-1,1 \text{ gL}^{-1}$ ), establecido además en el Código internacional de prácticas enológicas 2013/01 (revisada) de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV 2015) Sin embargo, se considera que un contenido moderado de este compuesto, puede aumentar la complejidad percibida de un vino.

Por otra parte, cuando la concentración de glicerol es cercana a  $5,2 \text{ gL}^{-1}$ , el vino posee un sabor dulzón y una impresión en boca suavizada (Noble y Bursick, 1984). Los valores de glicerol obtenidos para las cuatro cepas se encuentran dentro del rango esperable en fermentación de vinos por *S. cerevisiae* (Scanes, Hohmann y Priori, 1998) pero, sin embargo, la capacidad de las cepas patagónicas de superar este umbral sensitivo mencionado puede considerarse una ventaja para su uso en enología contribuyendo a la suavidad y viscosidad del vino, y mejorando favorablemente las características organolépticas del mismo (Berovic y Herga, 2007).

El ácido láctico es un ácido orgánico que contribuye a la acidez total del vino. La razón por la que es tan atractivo para los productores de vino se debe a su mucho más suave en el paladar que el ácido málico, (el componente ácido principal del vino) y se convierte en un componente altamente deseable en algunos vinos hasta los  $3 \text{ gL}^{-1}$ . Los valores obtenidos en los vinos fermentados por las levaduras patagónicas respetan esa cantidad (Fleet, 2003).

Los mostos de uva que se obtienen en las regiones frías poseen alta acidez y bajos valores de pH. Sin embargo, el pH final obtenido en cada microvinificación resultó aceptable y similar al producido por la cepa control. Esto contribuye a la estabilidad microbiológica y a la complejidad organoléptica (del Mónaco y col., 2014).

En los últimos años el nivel de alcohol en los vinos ha aumentado por varias razones. La más importante es que las temperaturas climáticas globales han aumentado debido al calentamiento global. El hecho de que climas cálidos puedan dar lugar a uvas con una mayor



concentración de azúcares, genera vinos con altas concentraciones de etanol por encima de 15% V/V (Ozturk y Anli, 2014). La concentración de alcohol del vino es importante por varias razones. El etanol es indispensable para el envejecimiento, la estabilidad y las propiedades organolépticas del vino. El alcohol en el vino también juega un papel importante en la resolución de compuestos aromáticos y colorantes. Sin embargo, se considera que los vinos con altos niveles de etanol son negativos, tanto para la salud humana, como para la calidad y composición sensorial del mismo (Contreras y col., 2015). La tendencia en los últimos años es entonces producir vinos con menores contenidos de etanol siendo el rango aceptado en las legislaciones de distintos países entre 9 y 15% (Ozturk y Anli, 2014). Particularmente para la variedad de Pinot noir el promedio del contenido de etanol oscila entre 11 y 14%. Los valores hallados en los vinos experimentales respetaron esos valores máximos en todas las condiciones.

Los resultados obtenidos hasta el momento evidencian que las levaduras indígenas evaluadas en el presente trabajo, presentan propiedades adecuadas para ser utilizadas con propósitos enológicos, conformando cultivos iniciadores para el control de la fermentación alcohólica.

## 7 Conclusiones

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de trabajo que dio origen a este estudio. El aumento en la transcripción, de estos dos transportadores asociados a estrés, *HTX2* y *HTX5*, al final de la fermentación, demuestra, en la cepa ÑNM16, la adquisición evolutiva de un sistema de resistencia a condiciones ambientales desfavorables más robusto como las encontradas en la región de la Patagonia Norte. Este sistema, permite a esta cepa resistir condiciones de deshidratación y probablemente bajas temperaturas durante lapsos de tiempo en los que los nutrientes son escasos o incluso están ausentes. Más aún, en los momentos en que los nutrientes vuelven a estar disponibles, la presencia en su membrana de cantidades más elevadas del transportador *Hxt2p*, asociado a fase lag, le permite comenzar la adquisición de fuentes carbonadas y avanzar frente a otras cepas en la competencia por un nicho.

Desde el punto de vista tecnológico, la cepa de *S. cerevisiae* ÑNM16, presenta características metabólicas interesantes a tener en cuenta en una fermentación enológica, como la velocidad de consumir azúcares en un medio como el mosto de uvas de la variedad Pinot noir, donde demostró ser semejante a la de una cepa comercial, lo que permite abrir las puertas a nuevos estudios a escala piloto para determinar su capacidad de conducción de una fermentación exitosa.

Estudios a escala piloto, revelarán las capacidades de conducción de una fermentación que podría poseer *S. cerevisiae* ÑNM16 en mayores volúmenes de mosto. Además, determinaciones a nivel enológico podrían ampliar el conocimiento sobre las potenciales características tecnológicas que promete esta cepa.

## 8 Bibliografía

1. Anjos, J., Rodrigues de Sousa, H., Roca, C., Cássio, F., Luttik, M., Pronk, J., . . . Gonçalves, P. (2013). Fsy1, the sole hexose-proton transporter characterized in *Saccharomyces* yeasts, exhibits a variable fructose:H<sup>+</sup> stoichiometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828: 201–207.
2. Arroyo-López, F., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M., & Garrido-Fernández, A. (2008). Effects of ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium chloride on freshness retention and microbial growth during the storage of Manzanilla-Aloren<sup>™</sup> a cracked table olives. *LWT Food Science and Tehnology*, 551–560.
3. Barrio, E., González, S., Arias, A., Belloch, C., & Querol, A. (2006). Yeast in Food and Brevages. En G. Fleet, *The Yeast Handbook* (págs. 153-174). Berlin: Springer.
4. Bates, D. M. (25 de Junio de 2010). Obtenido de <http://lme4.r-forge.r-project.org/IMMwR/lrgprt.pdf>
5. Bates, D. M. (s.f.). *lme4: Mixed-effects modeling*. Recuperado el 16 de Febrero de 2015, de <http://lme4r-forger-projectorg/book/>
6. Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D., & Frommer, W. (2010). Dynamic Analysis of Cytosolic Glucose and ATP Levels in Yeast with Optical Sensors. *Biochemical Journal*, 432(2): 399–406.
7. Bermejo, C., Haerizadej, F., Sadoine, M., Chermak, D., & Frommer, W. (2013). Differential regulation of glucose transport activity in yeast by specific cAMP Signatures. *Biochemical Journal*, 452(3): 489–497.
8. Berovic, M., & Herga, M. (2007). Heat shock on *Saccharomyces cerevisiae* inoculum increases glycerol production in wine fermentation. *Biotechnology Letters*, 29 (6):891–894.
9. Berthels, J., Cordero Otero, R., Bauer, F., Thevelein, J., & Pretorius, I. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4: 683-689.
10. Bisson, L., Waterhouse, A., Ebeler, S., Walker, M., & Lapsley, J. (2002). The present and future of the international wine industry. *Nature*, 418, 696–99.
11. Boles, E., & Hollenberg, C. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 85-111.
12. Boorstein, W., & Craig, E. (1990). Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO Journal*, 9: 2543–2553.

13. Brauer, M., Saldanha, A., Dolinski, K., & Botstein, D. (2005). Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 2503–2517.
14. Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors* 2010, 10: 6195-6240.
15. Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, 10: 6195-6240.
16. Buziol, S., J., B., Baumeister, A., Jung, S., Mauch, K., Reuss, M., & Boles, E. (2002). Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 283-291.
17. Caballero, A., Sangorrín, M., Lopes, C., Rodríguez, M., Zajonskovsky, I., Barbagelata, R., & Lavallo, T. (2008). Evaluación de la aptitud enológica y selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* indígenas de la UNComahue. Informe Final PFIP 028/05 Agencia UNComahue y MINCYT., Neuquén.
18. Carrasco, P., Querol, A., & del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175 :450–457.
19. Catania, C., & Avagnina, S. (2010). *La Interpretación Sensorial del Vino*. Mendoza: INTA-Caviar Bleu.
20. Chandler, M., Stanley, G., Rogers, P., & Chambers, P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 54: 427-454.
21. Ciani, M., Ferraro, L., & Fatichenti, F. (2000). Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (9): 698–703.
22. Combina, M., Daguerre, C., Massera, A., Mercado, L., Strum, M., Ganga, A., & Martinez, C. (2008). Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 192-197.
23. Combina, M., Daguerre, C., Massera, A., Mercado, L., Strum, M., Ganga, A., & Martinez, C. (2009). Identificación de Levaduras en Jugo Concentrado de Uva en Argentina. *Enología*.
24. Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofre, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1055-1061.

25. Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A., Tavares, R., Sousa, M., . . . Gerós, H. (2007). Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food*, 1: 1-22.
26. Consejo de la Unión Europea. (2007). Reglamento CENº 843/2007.
27. Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P., Curtin, C., & Varela, C. (2015). The application of *non-Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 7–15.
28. Coons, D., Vagnoli, P., & Bisson, L. (1997). The C-terminal Domain of Snf3p is Sufficient to Complement the Growth Defect of snf3 Null Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: SNF3 Functions in Glucose Recognition. *Yeast*, 13: 9–20.
29. Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piskur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res*, 14: 826-832.
30. Davidian, M., & Giltinan, D. (2003). Nonlinear Models for Repeated Measurement Data: An Overview and Update. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 8: 420-437.
31. de Barros Lopes, M., Bellon, J., Shirley, N., & Ganter, P. (2002). Evidence for multiple interespecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Research*, 323-331.
32. del Mónaco, S. B., Rubio, N., & Caballero, A. (2014). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 117: 451-464.
33. del Mónaco, S., Simes, A., Bravo, S., Curilen, Y., Carreño, V., & Caballero, A. (2016). Wild Yeasts Selection for High Quality Patagonian Wines. En N. Olivera, D. Libkind, & E. Donati, *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Germany: Springer.
34. Di Rienzo, J., Casanoves, F., M.G., B., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2014). *InfoStat*. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
35. Dickinson, R., & Kruckeberg, A. (2006). Chapter 8. Carbohydrate Metabolism. En A. Querol, & G. Fleet, *Yeast in Food and Beverages (The Yeast Handbook Volume 2)*. Berlín: Springer.
36. Diderich, J., Schepper, M., van Hoek, P., Luttik, M., van Dijken, J., Pronk, J., . . . Kruckeberg, A. (1999). Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:15350–15359.

37. Diderich, J., Schuurmans, J., Van Gaalen, M., Kruckeberg, A., & Van Dam, K. (2001). Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2001, 18: 1515–1524.
38. Dlugai, S., Hippler, S., Wieczorke, R., & Boles, E. (2001). Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Letters*, 505: 389-392.
39. Eckhardt, U., Mas Marques, A., & Buckhout, T. (2001). Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Molecular Biology*, 45: 437–448.
40. Eis, P., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Zongdong, L., Gomez, M., . . . Dahlberg, J. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10):3627-32.
41. Europea, C. d. (2007). Reglamento CE N° 843/2007. Sobre la Producción y Etiquetado de Productos Alimenticios. Unión Europea.
42. Favre, N., Bordmann, G., & Rudin, W. (1997). Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods*, 204: 57–66.
43. Fernandes, P., Domitrovic, T., Kao, C., & Kurtenbach, E. (2004). Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Letters*, 556: 153-160.
44. Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., & Delrot, S. (1999). Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry. *Plant Physiology*, 120: 1083-1093.
45. Fleet, G. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 101-117.
46. Fleet, G. (2001). Wine. En M. Doyle, L. Beuchat, & T. Montville, *Food Microbiology* (págs. 747-772). Washington, D.C.: ASM Press.
47. Fleet, G. (2006). The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production. En G. F. Amparo Querol, *Yeasts in Food and Beverages*. Berlín: Springer.
48. Flood, A., Johns, M., & White, E. (1996). Mutarotation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallisation. *Carbon Research*, 288, 45-56.
49. Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Microbiology of Wine. Practical Applications and Procedures*. Nueva York: Springler.
50. Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. (2010). Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS*, 14: 629-638.

51. Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., & Dequin, S. (2010). FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H<sup>+</sup> symporter. *Microbiology* (2010), 156, 3754–3761.
52. Gasch, A., Spellman, P., Kao, C., Carmel-Harel, o., Eisen, M., Storz, G., . . . Brown, P. (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 4241–4257.
53. Glare, E., Divjak, M., Bailey, M., & Walters, E. (2002). B-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57:765–770.
54. Gonçalves, P., Rodriguez de Sousa, H., & Spencer-Martins, I. (2000). FSY1, a Novel Gene Encoding a Specific Fructose/H<sup>+</sup> Symporter in the Type Strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Bacteriology*, 5628–5630.
55. González, S., Barrio, E., Gafner, J., & Querol, A. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzavii* in wine fermentations,. *FEMS Yeast Research* 6, 1221–1234.
56. Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., & Richaud, P. (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Letters*, 561: 22-28.
57. Greatrix, B., & van Vuuren, H. (2006). Expression of the HXT13, HXT15 and HXT17 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the HXT1 gene transcript by sugar-induced osmotic stress. *Current Genetics*, 49: 205–217.
58. Group, S. L. (13 de Enero de 2015). Transporter Classification Database. Obtenido de [www.tcdb.org](http://www.tcdb.org)
59. Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J., & 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*, 2432-2439.
60. Harrison, D., Medhurst, A., Bond, B., Campbell, C., Davis, R., & Philpott, K. (2000). The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia — caspase-3 as a case study. *Molecular Brain Research*, 75: 143–149.
61. Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Current Genetics*, 59:1–31.
62. Hyma, K., Saerens, S., Verstrepen, K., & Fay, J. (2011). Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 11:540-551.

63. ICMSF. (1980). Bebidas no alcohólicas, zumos de frutas naturales, concentrados y mermeladas. En *Ecología Microbiana de los Alimentos* (págs. Volumen II. 652–677). Zaragoza: Acribia.
64. Jackson, R. S. (1994). *Wine Science. Principles and Applications*. San Diego: Elsevier.
65. Jeong, C., Ahn, K., Rho, N., Park, Y., Lee, D., Lee, J., & Lee, E. Y. (2003). Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clinical & Experimental Allergy*, 33:1717–1724.
66. Johnston, M., & Kim, J. (2005). Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 33: 247-252.
67. Ko, C., Liang, H., & Gaber, R. (1993). Roles of Multiple Glucose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 638-648.
68. König, H., Uden, G., & Frohlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlín: Springer.
69. Krampe, S., & Boles, E. (2002). Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Letters*, 513: 193-196.
70. Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C., & Boles, E. (1998). Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Letters*, 441: 343-347.
71. Kruckeberg, A., & Bisson, L. (1990). The HXT2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Is Required for High-Affinity Glucose Transport. *Molecular and Cellular Biology*, 5903-5913.
72. Le June, C., Erny, C., Demuyter, C., & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23: 709-716.
73. Leandro, M., Fonseca, C., & Gonçalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res*, 9: 511-525.
74. Lee, Y., & Lee, C. (2008). Transcriptional Response According to Strength of Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*, 26: 299-307.
75. Lewis, D., & Bisson, L. (1991). The HXT1 Gene Product of *Saccharomyces cerevisiae* Is a New Member of the Family of Hexose Transporters. *Molecular and Cellular Biology*, 3804-3813.
76. Liang, H., & Gaber, R. (1996). A Novel Signal Transduction Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* Defined by Snf3-regulated Expression of HXT6. *Molecular Biology of the Cell*, 7: 1953-1966.



77. Lin, Z., & Li, W. (2011). Expansion of Hexose Transporter Genes Was Associated with the Evolution of Aerobic Fermentation in Yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1):131–142.
78. Littell, R., Milliken, G., Stroup, W., & Wolfinger, R. S. (2006). *SAS for Mixed Models*. Cary, NC, EEUU: SAS Press.
79. Lopes, C., Rodriguez, M., Sangorrín, M., Querol, A., & Caballero, A. (2007). Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34: 139-149.
80. Luyten, K., Riou, C., & Blondin, B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast*, 19: 713–726.
81. Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. ((2002)). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research* 2 , 539-550.
82. Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research* 2, 539-550.
83. Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., & Scambia. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures*, 3(1): 19-25.
84. Meadus, W. (2003). A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression. *Biological Procedures Online*, 5(1): 20-28.
85. Medhurst, A., Harrison, D., Read, S., Campbell, C., Robbins, M., & Pangalos, M. (2000). The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *Journal of Neuroscience Methods*, 98: 9-20.
86. Moriya, H., & Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *PNAS*, 101: 1572-1577.
87. Naumov, G., James, S., Naumova, E., Louis, E., & Roberts, I. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1931–1942.
88. Nehlin, J., Carlberg, M., & Ronne, H. (1989). Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene*, 85(2):313-319.

89. Nelissen, B., Mordant, P., Jonniaux, J., De Wachter, R., & Goffeau, A. (1995). Phylogenetic classification of the major superfamily of membrane transport facilitators, as deduced from yeast genome sequencing. *FEBS Letters*, 337: 232-236.
90. Noble, A., & Bursick, G. (1984). The Contribution of Glycerol to Perceived Viscosity and Sweetness in White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35 (2): 110-112.
91. Nourami, A., Wesolowsky-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C., & Delahodde, A. (1997). Multiple-Drug-Resistance Phenomenon in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of Two Hexose Transporters. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 5453–5460.
92. Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., . . . Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *PNAS*, 16333-16338.
93. OIV. (Enero de 2015). Código Internacional de Prácticas Enológicas. París: OIV ISBN : 979-10-91799-35-5.
94. Olesen, J., & Guarente, L. (1990). The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes & Development*, 4:1714-1729.
95. Oliva Hernández, A., Taillandier, P., Reséndez Pérez, D., Narváez Zapata, J., & Larralde Corona, P. (2012). The effect of hexose ratios on metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from the spontaneous fermentation of mezcal. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 833-843.
96. Özcan, S., & Johnston, M. (1995). Three Different Regulatory Mechanisms Enable Yeast Hexose Transporter (HXT) Genes To Be Induced by Different Levels of Glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 1564–1572.
97. Ozcan, S., & Johnston, M. (1996). Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 5536-5545.
98. Özcan, S., & Johnston, N. (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 554–569.
99. Ozcan, S., Dover, J., & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 2566-2573.
100. Ozturk, B., & Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web of Conferences*, 3 (02012): 1-8.
101. Paalman, J. (2001). The role of nutrients in G1 phase progression of *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis PhD, Universiteit Utrecht. Utrecht, Holanda.

102. Perez, M., Luyten, K., Michel, R., Riou, C., & Blondin, B. (2005). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research*, 2: 351–361.
103. Peris, D., C., L., Belloch, C., Querol, A., & Barrio, E. (2012). Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics*, 407-420.
104. Platt, A., & Reece, R. (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p–Gal80p–Gal3p complex. *The EMBO Journal*, 17: 4086–4091.
105. Pretorius, I. (2001). Gene Technology in Winemaking: New Approaches to an Ancient Art. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*, Vol.66 No.1 Ožujak 2001., 66: 27-47.
106. Pretorius, I., & HØJ, P. (2005). Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 83-108.
107. Prior, B., Toh, T., Jolly, N., Baccari, C., & Mortimer, R. (2000). Impact of Yeast Breeding for Elevated Glycerol Production on Fermentative Activity and Metabolite Formation in Chardonnay Wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 92-99.
108. R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. Obtenido de R Foundation for Statistical Computing: <http://www.R-project.org/>
109. Radler, F., & Schütz, H. (1982). Glycerol Production of Various Strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33: 36-40.
110. Rainieri, S., & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50: 15-31.
111. Reifenberger, E., Boles, E., & Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245: 324-333.
112. Reifenberger, E., Freidel, K., & Ciriacy, M. (1995). Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Molecular Microbiology*, 16: 157-167.
113. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de Enología*. Tomo 1. Microbiología del Vino. MundiPrensa.
114. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology*. Volume I. The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd Edition. West Sussex: John Wiley & Sons.
115. Riou, C., Nicaud, J., Barre, P., & Gaillardin, C. (1997). Stationary-Phase Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* During Wine Fermentation. *Yeast*, 13: 903–915.

116. Ritcher, C., Kennedy, A., Guo, L., & Dokoozlian, N. (2015). Metabolomic Measurement of Three Timepoints in a *Saccharomyces cerevisiae* Chardonnay Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 294-301.
117. Rodicio, R., & Heinisch, J. (2009). Chapter 6. Sugar Metabolism by *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* Yeast. En H. König, G. Unden, & J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlín: Springer.
118. Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). Chapter 2: Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. En G. F. Amparo Querol, *Yeast in Food and Brevages*. Berlín: Springer.
119. Rosa, C., & Gábor, P. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Berlin: Springer.
120. Ruiz, A., Serrano, R., & Ariño, J. (2008). Direct Regulation of Genes Involved in Glucose Utilization by the Calcium/Calcineurin Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 20: 13923–13933.
121. Saier, M., Reddy, V., Tammang, D., & Västermark, A. (2014). The Transporter Classification Database. *Nucleic Acids Research*, 42: 251-258.
122. Salvadó, Z., Arroyo-López, F., Barrio, E., Quero, A., & Guillamón, J. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28; 1155-1161.
123. Santiago, T., & Mamoun, B. (2003). Genome Expression Analysis in Yeast Reveals Novel Transcriptional Regulation by Inositol and Choline and New Regulatory Functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 38723–38730.
124. Santos, J., Sousa, M., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., & Leão, C. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, 154: 422-430.
125. Scanes, K., Hohmann, S., & Priori, B. (1998). Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *South African Journal of Enology + Viticulture*, 19 (1): 17-24.
126. Serazin-Leroy, V., Denis-Henriot, D., Morot, M., de Mazancourt, P., & Giudicelli, Y. (1998). Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 283–291.
127. Sharma, S. C. (1997). A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 152: 11-15.
128. Sicard, D., & Legras, J. (2011). Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 229–236.
129. Silljé, H., E., ter Schure; A., Rommens; P., Huls; Woldringh, C., Verkleij, A., Boonstra, J., Verrips, C., C. (1997). Effects of Different Carbon Fluxes on G1 Phase Duration Cyclin

- Expression, and Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 6560–6565.
130. Simes, A., A.C., Caballero., & del Mónaco, S. (2014). Utilization of hexoses by patagonian *Saccharomyces cerevisiae* strains from oenological origin. Mendoza: 37° Congreso Mundial de la Vid y el Vino. "Vitivinicultura del sur, confluencia de conocimiento y naturaleza".
131. Simes, A., Caballero, A., & del Mónaco, S. (2015). Utilización de hexosas por cepas patagónicas de *Saccharomyces cerevisiae* de origen enológico. 37° Congreso Argentino de la Vid y el Vino (págs. 166 - 168). Mendoza, Argentina: OIV - ISBN 979-10-91799-31-7.
132. Simes, A., Tassile, V., del Mónaco, S., & Caballero, A. (2015). Selección de cepas patagónicas de *Saccharomyces cerevisiae* con marcado carácter fructofílico. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Buenos Aires.
133. Suárez-Lepe, J., & Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science and Technology.*, 23: 39-50.
134. Swiegers, J., Bartowsy, E., & Henschke, P. P. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139–173.
135. Szkutnicka, K., Tschopp, J., Andrews, L., & Cirillo, V. (1989). Sequence and Structure of the Yeast Galactose Transporter. *Journal of Bacteriology*, 4486-4493.
136. Tamás, M., & Hohmann, S. (2003). Chapter 4: The Osmotic Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. En S. Hohmann, & W. Mager, *Yeast Stress Responses* (págs. 121-200). Berlín: Springer.
137. Taoukis, P., Labuza, T., & Saguy, I. (1997). Kinetic of food deterioration and shelf-life prediction. En K. Valentas, E. Rotstein, & R. Singh, *Handbook of food engineering practice* (págs. 361-404). Boca Ratón: CRC Press.
138. Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Fasoli, G., Aguzzi, I., & Corsetti, A. (2013). Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Frontiers in Microbiology*, 4:1-13.
139. Tomás-Cobos, L., Casadomé, L., Mas, G., Sanz, P., & Posas, F. (2004). Expression of the HXT1 Low Affinity Glucose Transporter Requires the Coordinated Activities of the HOG and Glucose Signalling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 22010–22019.
140. Tronchoni, J., Gamero, A. A.-L., Barrio, E., & Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 237–243.

141. Verwaal, R., Arako, M., Kapur, R. V., Verrips, T., & Boonstra, J. (2004). HXT5 expression is under control of STRE and HAP elements in the HXT5 promoter. *Yeast*, 21: 747-757.
142. Verwaal, R., Paalman, J., Hogenkamp, A., Verkleij, A., Verrips, C., & Boonstra, J. (2002). HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 19: 1029-1038.
143. Walker, G., & Van Dijck, P. (2006). Chapter 5: Physiological and Molecular Responses of Yeasts to the Environment. En A. Querol, & G. Fleet, *Yeast in Food and Brevages*. Berlín: Springer.
144. Wendell, D., & Bisson, L. (1993). Physiological Characterization of Putative High-Affinity Glucose Transport Protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by Use of Anti-Synthetic Peptide Antibodies. *Journal of Bacteriology*, 7689-7696.
145. Wiczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C., & Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 464: 123-128.
146. Ye, L., Berden, J., van Dam, K., & Kruckeberg, A. (2001). Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18: 1257-1267.
147. Youk, H., & van Oudenaarden, A. (2009). Growth landscape formed by perception and import of glucose in yeast. *Nature*. 2009, 17; 462:875-879.
148. Zaman, S., Lippman, S., Schneper, L., Slonim, N., & Broach, J. (2009). Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Molecular Systems Biology*, 5; 245.
149. Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1875-1881.

## 9 Anexos

Salidas del programa R en la determinación de los parámetros de modelado para cada Caldo/Cepa.

### Modelado de Producción de CO<sub>2</sub> Acumulada según la Ecuación de Gompertz Reparametrizada en Caldo Glucosa 20% (P/V), Fructosa 20% (P/V) y Glucosa 10% - Fructosa 10% (P/V).

#### Cepa ÑNM10:

```
anova(AJUSTE1)
numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept) 1 127 176.97995 <.0001
A.CALDO 2 127 1.52757 0.2210
M.(Intercept) 1 127 216.49067 <.0001
M.CALDO 2 127 0.78038 0.4604
L.(Intercept) 1 127 0.30940 0.5790
L.CALDO 2 127 0.22316 0.8003
> summary(AJUSTE1)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
StdDev Corr
A.(Intercept) 26.580608 A.(In)
M.(Intercept) 1.488485 0.277
Residual 6.717636

Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 178.70832 16.933668 127 10.553433 0.0000
A.CALDOFRU20 -21.72633 23.551421 127 -0.922506 0.3580
A.CALDOGLU20 -48.92007 23.668523 127 -2.066883 0.0408
M.(Intercept) 8.34556 0.950056 127 8.784280 0.0000
M.CALDOFRU20 -0.28001 1.348407 127 -0.207659 0.8358
M.CALDOGLU20 -1.25810 1.375518 127 -0.914637 0.3621
L.(Intercept) -0.05612 0.377269 127 -0.148749 0.8820
L.CALDOFRU20 0.24519 0.534705 127 0.458556 0.6473
L.CALDOGLU20 0.38704 0.606883 127 0.637753 0.5248

Correlation:
A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.719
A.CALDOGLU20 -0.715 0.514
M.(Intercept) 0.171 -0.123 -0.122
M.CALDOFRU20 -0.120 0.181 0.086 -0.705
M.CALDOGLU20 -0.118 0.085 0.166 -0.691 0.487
L.(Intercept) -0.129 0.093 0.092 0.313 -0.221 -0.216
L.CALDOFRU20 0.091 -0.113 -0.065 -0.221 0.318 0.153 -0.706
L.CALDOGLU20 0.080 -0.058 -0.121 -0.195 0.137 0.354 -0.622 0.439

Standardized Within-Group Residuals:
Min Q1 Med Q3 Max
-3.07451432 -0.67753948 -0.07065472 0.48094261 2.17226300

Number of Observations: 144
Number of Groups: 9
```

#### Cepa ÑIF8

```
> anova(AJUSTE2)
numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept) 1 119 7.4059 0.0075
A.CALDO 2 119 41.2962 <.0001
M.(Intercept) 1 119 600.2480 <.0001
M.CALDO 2 119 4.2977 0.0158
L.(Intercept) 1 119 0.4744 0.4923
L.CALDO 2 119 1.6114 0.2039
> summary(AJUSTE2)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMP03
AIC BIC logLik
940.5518 978.4163 -457.2759

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
```

```
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
      StdDev      Corr
A.(Intercept) 21.1937332 A.(In)
M.(Intercept)  0.9117643  1
Residual      6.0755764
```

```
Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
      Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 234.75641 13.640788 119 17.209886 0.0000
A.CALDOFRU20 -135.46617 18.725030 119 -7.234497 0.0000
A.CALDOG10F10 -107.91090 18.898416 119 -5.710050 0.0000
M.(Intercept)  9.75572  0.608061 119 16.043983 0.0000
M.CALDOFRU20  -2.37745  0.952298 119 -2.496535 0.0139
M.CALDOG10F10 -2.39935  0.910822 119 -2.634270 0.0096
L.(Intercept)  0.36233  0.274216 119  1.321323 0.1889
L.CALDOFRU20  -0.10705  0.512326 119 -0.208956 0.8348
L.CALDOG10F10 -0.92838  0.524432 119 -1.770250 0.0792
```

```
Correlation:
      A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.728
A.CALDOG10F10 -0.722  0.526
M.(Intercept)  0.724 -0.527 -0.522
M.CALDOFRU20 -0.462  0.694  0.334 -0.639
M.CALDOG10F10 -0.483  0.352  0.705 -0.668  0.426
L.(Intercept) -0.159  0.116  0.115  0.387 -0.247 -0.258
L.CALDOFRU20  0.085 -0.093 -0.061 -0.207  0.508  0.138 -0.535
L.CALDOG10F10  0.083 -0.061 -0.122 -0.202  0.129  0.469 -0.523  0.280
```

```
Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.5071707 -0.6260718 -0.0986933  0.6357903  2.1156969
```

Number of Observations: 136  
 Number of Groups: 9

## Cepa ÑNF8

> `anova(AJUSTE3)`

```
      numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept)  1  76 769.6636 <.0001
A.CALDO        2  76  5.6024 0.0054
M.(Intercept)  1  76 93.6449 <.0001
M.CALDO        2  76  0.1937 0.8243
L.(Intercept)  1  76  7.9889 0.0060
L.CALDO        2  76  1.3474 0.2660
```

> `summary(AJUSTE3)`

```
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
      AIC      BIC      logLik
604.1636 636.6612 -289.0818
```

Random effects:

```
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
      StdDev      Corr
A.(Intercept) 23.513627 A.(In)
M.(Intercept)  1.598107 -0.731
Residual      4.804067
```

```
Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
      Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 147.42248 17.914610 76  8.229176 0.0000
A.CALDOG10F10 -47.67272 25.396322 76 -1.877150 0.0643
A.CALDOGLU20  -12.74878 25.446673 76 -0.501000 0.6178
M.(Intercept)  7.64782  1.242293 76  6.156212 0.0000
M.CALDOG10F10  0.80550  1.859407 76  0.433204 0.6661
M.CALDOGLU20  -1.01234  1.753482 76 -0.577332 0.5654
L.(Intercept)  0.35728  0.386109 76  0.925344 0.3577
L.CALDOG10F10  0.90584  0.579670 76  1.562689 0.1223
L.CALDOGLU20  0.13894  0.582734 76  0.238421 0.8122
```

```
Correlation:
      A.(In) A.CALDOG1 A.CALDOGL M.(In) M.CALDOG1 M.CALDOGL L.(In) L.CALDOG1
A.CALDOG10F10 -0.705
A.CALDOGLU20 -0.704  0.497
M.(Intercept) -0.724  0.511  0.510
M.CALDOG10F10  0.484 -0.680 -0.341 -0.668
M.CALDOGLU20  0.513 -0.362 -0.724 -0.708  0.473
L.(Intercept) -0.091  0.064  0.064  0.246 -0.164 -0.174
L.CALDOG10F10  0.061 -0.070 -0.043 -0.164  0.325  0.116 -0.666
L.CALDOGLU20  0.060 -0.043 -0.096 -0.163  0.109  0.239 -0.663  0.441
```

Standardized within-Group Residuals:



	Min	Q1	Med	Q3	Max
	-2.2608292	-0.6306860	-0.1440825	0.7550656	1.6349978

Number of Observations: 90

Number of Groups: 6

>

### Cepa ÑNM16

> anova(AJUSTE4)

	numDF	denDF	F-value	p-value
A.(Intercept)	1	127	55.44725	<.0001
A.CALDO	2	127	0.07153	0.9310
M.(Intercept)	1	127	121.16076	<.0001
M.CALDO	2	127	0.95274	0.3884
L.(Intercept)	1	127	0.32338	0.5706
L.CALDO	2	127	2.44853	0.0905

> summary(AJUSTE4)

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood  
 Model: P\_PESO ~ (A \* (exp(-exp(((M \* 2.718282)/A) \* (L - DIA) + 1))))  
 Data: TEMPO3

	AIC	BIC	logLik
	1079.567	1118.174	-526.7833

Random effects:

Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)

Level: NDIV

Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization

	StdDev	Corr
A.(Intercept)	40.631945	A. (In)
M.(Intercept)	2.387511	0.25
Residual	7.311568	

Fixed effects: A + M + L ~ CALDO

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
A.(Intercept)	139.73444	24.37720	127	5.732177	0.0000
A.CALDOG10F10	-1.01428	34.69412	127	-0.029235	0.9767
A.CALDOGLU20	-2.94714	34.55026	127	-0.085300	0.9322
M.(Intercept)	9.85567	1.53872	127	6.405093	0.0000
M.CALDOG10F10	-1.05571	2.16728	127	-0.487111	0.6270
M.CALDOGLU20	-1.17576	2.17814	127	-0.539799	0.5903
L.(Intercept)	-0.80997	0.39539	127	-2.048516	0.0426
L.CALDOG10F10	0.91993	0.59191	127	1.554184	0.1226
L.CALDOGLU20	1.23280	0.58502	127	2.107290	0.0371

Correlation:

	A. (In)	A.CALDOG1	A.CALDOGL	M. (In)	M.CALDOG1	M.CALDOGL	L. (In)	L.CALDOG1
A.CALDOG10F10	-0.703							
A.CALDOGLU20	-0.706	0.496						
M.(Intercept)	0.208	-0.146	-0.146					
M.CALDOG10F10	-0.147	0.201	0.104	-0.710				
M.CALDOGLU20	-0.147	0.103	0.205	-0.706	0.502			
L.(Intercept)	-0.041	0.029	0.029	0.325	-0.230	-0.229		
L.CALDOG10F10	0.027	-0.054	-0.019	-0.217	0.317	0.153	-0.668	
L.CALDOGLU20	0.028	-0.019	-0.047	-0.219	0.156	0.316	-0.676	0.451

Standardized within-Group Residuals:

	Min	Q1	Med	Q3	Max
	-2.75432339	-0.70008891	-0.00734238	0.35771415	2.93662563

Number of Observations: 144

Number of Groups: 9

>

### Cepa ÑIF5

> anova(AJUSTE5)

	numDF	denDF	F-value	p-value
A.(Intercept)	1	76	220.12028	<.0001
A.CALDO	2	76	17.44179	<.0001
M.(Intercept)	1	76	56.02231	<.0001
M.CALDO	2	76	0.43180	0.6509
L.(Intercept)	1	76	0.00033	0.9855
L.CALDO	2	76	0.23730	0.7893

> summary(AJUSTE5)

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood  
 Model: P\_PESO ~ (A \* (exp(-exp(((M \* 2.718282)/A) \* (L - DIA) + 1))))  
 Data: TEMPO3

	AIC	BIC	logLik
	617.2286	649.7262	-295.6143

Random effects:

Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)

Level: NDIV

Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization

	StdDev	Corr
A.(Intercept)	12.217761	A. (In)
M.(Intercept)	2.088602	0.511
Residual	5.232130	

```
Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
              Value Std.Error DF   t-value p-value
A.(Intercept) 134.41580  9.608429 76 13.989363 0.0000
A.CALDOFRU20 -74.19462 13.342976 76 -5.560575 0.0000
A.CALDOG10F10 -55.38547 13.589828 76 -4.075510 0.0001
M.(Intercept)  7.86255  1.617599 76  4.860628 0.0000
M.CALDOFRU20 -1.47831  2.377372 76 -0.621827 0.5359
M.CALDOG10F10 -1.30777  2.331265 76 -0.560971 0.5765
L.(Intercept) -0.20111  0.431264 76 -0.466327 0.6423
L.CALDOFRU20  0.50758  0.760640 76  0.667307 0.5066
L.CALDOG10F10  0.27699  0.708557 76  0.390921 0.6969
```

```
Correlation:
              A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.720
A.CALDOG10F10 -0.707  0.509
M.(Intercept)  0.413 -0.297 -0.292
M.CALDOFRU20 -0.281  0.416  0.198 -0.680
M.CALDOG10F10 -0.286  0.206  0.403 -0.694  0.472
L.(Intercept) -0.136  0.098  0.096  0.236 -0.160 -0.163
L.CALDOFRU20  0.077 -0.076 -0.055 -0.134  0.318  0.093 -0.567
L.CALDOG10F10  0.083 -0.060 -0.114 -0.143  0.098  0.282 -0.609  0.345
```

```
Standardized within-Group Residuals:
              Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.0482657 -0.7844067 -0.0466860  0.5815810  1.9907440
```

Number of Observations: 90  
 Number of Groups: 6

### Cepa ÑNF7

> anova(AJUSTE6)

```
              numDF denDF  F-value p-value
A.(Intercept)      1     76 25.65986 <.0001
A.CALDO             2     76 14.68197 <.0001
M.(Intercept)      1     76 286.51721 <.0001
M.CALDO             2     76  4.51454 0.0140
L.(Intercept)      1     76  0.12697 0.7226
L.CALDO             2     76  0.11074 0.8953
```

> summary(AJUSTE6)

```
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
              AIC      BIC      logLik
662.4385 694.936 -318.2192
```

Random effects:

Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)  
 Level: NDIV

Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization

```
              StdDev      Corr
A.(Intercept) 19.676293 A.(In)
M.(Intercept)  1.101350 1
Residual       7.286309
```

```
Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
              Value Std.Error DF   t-value p-value
A.(Intercept) 213.20317 15.884698 76 13.421921 0.0000
A.CALDOFRU20 -61.24943 22.022288 76 -2.781248 0.0068
A.CALDOG10F10 -124.00962 21.899947 76 -5.662553 0.0000
M.(Intercept) 10.39562  0.962468 76 10.801006 0.0000
M.CALDOFRU20 -1.51820  1.388225 76 -1.093630 0.2776
M.CALDOG10F10 -3.96990  1.469386 76 -2.701743 0.0085
L.(Intercept)  0.24786  0.423849 76  0.584772 0.5604
L.CALDOFRU20 -0.28055  0.656166 76 -0.427555 0.6702
L.CALDOG10F10 -0.28532  0.898244 76 -0.317644 0.7516
```

```
Correlation:
              A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.721
A.CALDOG10F10 -0.725  0.523
M.(Intercept)  0.653 -0.471 -0.474
M.CALDOFRU20 -0.453  0.674  0.328 -0.693
M.CALDOG10F10 -0.428  0.309  0.637 -0.655  0.454
L.(Intercept) -0.171  0.123  0.124  0.452 -0.314 -0.296
L.CALDOFRU20  0.110 -0.134 -0.080 -0.292  0.472  0.191 -0.646
L.CALDOG10F10  0.081 -0.058 -0.114 -0.213  0.148  0.531 -0.472  0.305
```

```
Standardized within-Group Residuals:
              Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.2630342 -0.7596487 -0.2392146  0.7304989  1.7280387
```

Number of Observations: 90  
 Number of Groups: 6

### Cepa ÑNF7

```
> anova(AJUSTE7)
      numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept)      1    76 386.4203 <.0001
A.CALDO            2    76  1.6945 0.1906
M.(Intercept)      1    76 354.4461 <.0001
M.CALDO            2    76  0.3757 0.6881
L.(Intercept)      1    76  0.4611 0.4992
L.CALDO            2    76  0.0174 0.9828
> summary(AJUSTE7)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
      AIC      BIC    logLik
676.1034 708.601 -325.0517

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
      StdDev      Corr
A.(Intercept) 19.6831704 A.(In)
M.(Intercept)  0.9939866 -0.072
Residual      7.6384539

Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
      Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 171.54001 16.387455 76 10.467764 0.0000
A.CALDOFRU20 -29.69106 22.310068 76 -1.330837 0.1872
A.CALDOGLU20 -26.61795 22.434558 76 -1.186471 0.2391
M.(Intercept)  8.95264  0.929312 76  9.633623 0.0000
M.CALDOFRU20  0.59390  1.402507 76  0.423456 0.6732
M.CALDOGLU20 -0.34232  1.348373 76 -0.253874 0.8003
L.(Intercept)  0.16303  0.530669 76  0.307221 0.7595
L.CALDOFRU20  0.02416  0.756071 76  0.031949 0.9746
L.CALDOGLU20  0.13699  0.776087 76  0.176509 0.8604

Correlation:
      A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.735
A.CALDOGLU20 -0.730  0.537
M.(Intercept) -0.215  0.158  0.157
M.CALDOFRU20  0.142 -0.179 -0.104 -0.663
M.CALDOGLU20  0.148 -0.109 -0.191 -0.689  0.457
L.(Intercept) -0.179  0.132  0.131  0.526 -0.348 -0.362
L.CALDOFRU20  0.126 -0.138 -0.092 -0.369  0.569  0.254 -0.702
L.CALDOGLU20  0.123 -0.090 -0.149 -0.359  0.238  0.546 -0.684  0.480

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.7144907 -0.8689965 -0.1375533  0.6524078  2.3347225

Number of Observations: 90
Number of Groups: 6
```

### Cepa ÑNF13

```
> anova(AJUSTE8)
      numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept)      1    71 10764.086 <.0001
A.CALDO            2    71  88.642 <.0001
M.(Intercept)      1    71 103.471 <.0001
M.CALDO            2    71  0.717 0.4915
L.(Intercept)      1    71  8.190 0.0055
L.CALDO            2    71  1.178 0.3138
> summary(AJUSTE8)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
      AIC      BIC    logLik
570.9765 602.731 -272.4883

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
      StdDev      Corr
A.(Intercept) 31.127485 A.(In)
M.(Intercept)  2.070112 -1
Residual      4.992451

Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
      Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 106.63725 23.35178 71  4.566557 0.0000
A.CALDOG10F10 -29.14909 33.09813 71 -0.880687 0.3815
A.CALDOGLU20  11.51636 33.04127 71  0.348545 0.7285
M.(Intercept)  8.82945  1.62455 71  5.435009 0.0000
M.CALDOG10F10  0.10259  2.28988 71  0.044802 0.9644
```

```
M.CALDOGLU20 2.60439 2.27302 71 1.145788 0.2557
L.(Intercept) 0.14255 0.37374 71 0.381397 0.7040
L.CALDOGL10F10 0.83761 0.62478 71 1.340633 0.1843
L.CALDOGLU20 0.61425 0.47633 71 1.289557 0.2014
```

```
Correlation:
A.(In) A.CALDOG1 A.CALDOGL M.(In) M.CALDOG1 M.CALDOGL L.(In) L.CALDOG1
A.CALDOGL10F10 -0.706
A.CALDOGLU20 -0.707 0.499
M.(Intercept) -0.959 0.677 0.678
M.CALDOGL10F10 0.681 -0.961 -0.481 -0.709
M.CALDOGLU20 0.686 -0.484 -0.967 -0.715 0.507
L.(Intercept) -0.018 0.013 0.013 0.250 -0.177 -0.179
L.CALDOGL10F10 0.011 -0.020 -0.008 -0.150 0.225 0.107 -0.598
L.CALDOGLU20 0.014 -0.010 -0.017 -0.196 0.139 0.213 -0.785 0.469
```

```
Standardized within-Group Residuals:
Min Q1 Med Q3 Max
-2.0192300 -0.6475747 -0.1548982 0.4493457 2.4964504
```

```
Number of Observations: 85
Number of Groups: 6
```

### Cepa EC1118

```
> anova(AJUSTE9)
```

```
numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept) 1 127 49.34340 <.0001
A.CALDO 2 127 1.76164 0.1759
M.(Intercept) 1 127 120.82446 <.0001
M.CALDO 2 127 0.29690 0.7436
L.(Intercept) 1 127 0.01527 0.9018
L.CALDO 2 127 0.49555 0.6104
```

```
> summary(AJUSTE9)
```

```
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
AIC BIC logLik
1075.951 1114.559 -524.9757
```

```
Random effects:
```

```
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
StdDev Corr
A.(Intercept) 34.215384 A.(In)
M.(Intercept) 2.199880 0.859
Residual 7.572664
```

```
Fixed effects: A + M + L ~ CALDO
```

```
Value Std.Error DF t-value p-value
A.(Intercept) 174.29091 20.880510 127 8.347062 0.0000
A.CALDOFRU20 -43.32804 29.404821 127 -1.473501 0.1431
A.CALDOGL10F10 -10.08668 29.549689 127 -0.341346 0.7334
M.(Intercept) 8.77534 1.371219 127 6.399667 0.0000
M.CALDOFRU20 -1.49007 1.944239 127 -0.766401 0.4449
M.CALDOGL10F10 0.34989 1.952183 127 0.179230 0.8580
L.(Intercept) 0.10721 0.398299 127 0.269181 0.7882
L.CALDOFRU20 -0.54112 0.619158 127 -0.873961 0.3838
L.CALDOGL10F10 0.02069 0.573511 127 0.036080 0.9713
```

```
Correlation:
A.(In) A.CALDOF A.CALDOG M.(In) M.CALDOF M.CALDOG L.(In) L.CALDOF
A.CALDOFRU20 -0.710
A.CALDOGL10F10 -0.707 0.502
M.(Intercept) 0.763 -0.542 -0.539
M.CALDOFRU20 -0.538 0.769 0.380 -0.705
M.CALDOGL10F10 -0.536 0.381 0.755 -0.702 0.495
L.(Intercept) -0.088 0.063 0.063 0.253 -0.178 -0.177
L.CALDOFRU20 0.057 -0.076 -0.040 -0.163 0.257 0.114 -0.643
L.CALDOGL10F10 0.061 -0.044 -0.089 -0.175 0.124 0.271 -0.694 0.447
```

```
Standardized within-Group Residuals:
Min Q1 Med Q3 Max
-2.97216575 -0.78169349 -0.02939622 0.37245625 2.01601095
```

```
Number of Observations: 144
Number of Groups: 9
```

```
> library(nloptr)
> library(MASS)
> library(lattice)
> library(ggplot2)
> library(optimx)
Error in library(optimx) : there is no package called 'optimx'
> anova(AJUSTE10)
```

```

numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept) 1 97 750.3239 <.0001
A.CEPA 3 97 5.1447 0.0024
M.(Intercept) 1 97 32.4259 <.0001
M.CEPA 3 97 0.1408 0.9353
L.(Intercept) 1 97 9.8003 0.0023
L.CEPA 3 97 2.9084 0.0385
> summary(AJUSTE10)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
      AIC      BIC    logLik
909.6102 954.7347 -438.8051

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
      StdDev      Corr
A.(Intercept) 38.476066 A.(In)
M.(Intercept)  6.761744 0.991
Residual      5.452325

Fixed effects: A + M + L ~ CEPA
      Value Std.Error DF  t-value p-value
A.(Intercept) 115.76178 20.373735 97  5.681913 0.0000
A.CEPAB      0.71208 28.823587 97  0.024705 0.9803
A.CEPAC      7.11774 28.890385 97  0.246371 0.8059
A.CEPAE      2.56158 28.814388 97  0.088899 0.9293
M.(Intercept) 10.99182  3.606075 97  3.048140 0.0030
M.CEPAB      0.08695  5.100411 97  0.017047 0.9864
M.CEPAC     -1.14270  5.095923 97 -0.224238 0.8230
M.CEPAE      0.77666  5.105840 97  0.152112 0.8794
L.(Intercept) -0.02719  0.290191 97 -0.093704 0.9255
L.CEPAB      0.99911  0.398167 97  2.509283 0.0138
L.CEPAC      0.76544  0.424809 97  1.801855 0.0747
L.CEPAE      0.13410  0.403807 97  0.332090 0.7405

Correlation:
      A.(In) A.CEPAB A.CEPAC A.CEPAE M.(In) M.CEPAB M.CEPAC M.CEPAE L.
(In)
A.CEPAB      -0.707
A.CEPAC      -0.705  0.498
A.CEPAE      -0.707  0.500  0.499
M.(Intercept)  0.966 -0.683 -0.681 -0.683
M.CEPAB      -0.683  0.965  0.482  0.483 -0.707
M.CEPAC      -0.683  0.483  0.961  0.483 -0.708  0.500
M.CEPAE      -0.682  0.482  0.481  0.964 -0.706  0.499  0.500
L.(Intercept) -0.015  0.011  0.011  0.011  0.134 -0.095 -0.095 -0.095
L.CEPAB      0.011 -0.017 -0.008 -0.008 -0.098  0.134  0.069  0.069 -0
.729
L.CEPAC      0.010 -0.007 -0.029 -0.007 -0.091  0.065  0.131  0.065 -0
.683
L.CEPAE      0.011 -0.008 -0.008 -0.017 -0.096  0.068  0.068  0.140 -0
.719
      L.CEPAB L.CEPAC
A.CEPAB
A.CEPAC
A.CEPAE
M.(Intercept)
M.CEPAB
M.CEPAC
M.CEPAE
L.(Intercept)
L.CEPAB
L.CEPAC      0.498
L.CEPAE      0.524  0.491

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.9694012 -0.7665911 -0.1303426  0.3876679  2.0655357

Number of Observations: 124
Number of Groups: 16
    
```

**Modelado de Producción de CO<sub>2</sub> Acumulada según la Ecuación de Gompertz  
 Reparametrizada en mosto de Uvas Pinot noir**

```
> anova(AJUSTE11_B)
              numDF denDF F-value p-value
A.(Intercept)      1     61 3937.445 <.0001
A.CEPA              3     61   0.520 0.6702
M.(Intercept)      1     61 264.871 <.0001
M.CEPA              3     61   0.194 0.9004
L.(Intercept)      1     61   2.870 0.0953
L.CEPA              3     61   0.021 0.9959

> summary(AJUSTE11_B)
Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: P_PESO ~ (A * (exp(-exp(((M * 2.718282)/A) * (L - DIA) + 1))))
Data: TEMPO3
      AIC      BIC    logLik
678.9317 717.8248 -323.4659

Random effects:
Formula: list(A ~ 1, M ~ 1)
Level: NDIV
Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
              StdDev      Corr
A.(Intercept) 4.672660 A.(In)
M.(Intercept) 3.988367 0.999
Residual      10.430141

Fixed effects: A + M + L ~ CEPA
              Value Std.Error DF  t-value p-value
A.(Intercept) 145.62949  4.498423 61 32.37345 0.0000
A.CEPAB       -4.83608  6.336878 61 -0.76316 0.4483
A.CEPAC        0.11721  6.395984 61  0.01833 0.9854
A.CEPAE        6.62041  6.440077 61  1.02800 0.3080
M.(Intercept)  32.03439  4.913428 61  6.51976 0.0000
M.CEPAB        2.10662  7.322571 61  0.28769 0.7746
M.CEPAC       -1.31181  6.860879 61 -0.19120 0.8490
M.CEPAE       -3.04495  6.528402 61 -0.46642 0.6426
L.(Intercept)  0.37334  0.436401 61  0.85549 0.3956
L.CEPAB        0.04248  0.618725 61  0.06866 0.9455
L.CEPAC        0.01157  0.610381 61  0.01895 0.9849
L.CEPAE       -0.09506  0.590579 61 -0.16096 0.8727

Correlation:
              A.(In) A.CEPAB A.CEPAC A.CEPAE M.(In) M.CEPAB M.CEPAC M.CEPAE L.
(In)
A.CEPAB      -0.710
A.CEPAC      -0.703  0.499
A.CEPAE      -0.699  0.496  0.491
M.(Intercept) 0.239 -0.170 -0.168 -0.167
M.CEPAB      -0.161  0.218  0.113  0.112 -0.671
M.CEPAC      -0.171  0.122  0.227  0.120 -0.716  0.481
M.CEPAE      -0.180  0.128  0.127  0.235 -0.753  0.505  0.539
L.(Intercept) -0.003  0.002  0.002  0.002  0.695 -0.467 -0.498 -0.523
L.CEPAB       0.002 -0.002 -0.002 -0.002 -0.490  0.695  0.351  0.369 -0.
.705
L.CEPAC       0.002 -0.002 -0.019 -0.002 -0.497  0.334  0.696  0.374 -0.
.715
L.CEPAE       0.002 -0.002 -0.002 -0.031 -0.514  0.345  0.368  0.682 -0.
.739
              L.CEPAB L.CEPAC
A.CEPAB
A.CEPAC
A.CEPAE
M.(Intercept)
M.CEPAB
M.CEPAC
M.CEPAE
L.(Intercept)
L.CEPAB
L.CEPAC    0.504
L.CEPAE    0.521  0.528

Standardized within-Group Residuals:
              Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.7570962 -0.5753961 -0.2058592  0.3663359  3.5320283

Number of Observations: 84
Number of Groups: 12
```

**Modelado de Consumo de Azúcares según Taoukis 1997, modificada por Arroyo-López 2008**

> summary(AJUSTE1)

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood  
 Model: GLUCOSA ~ D + S \* exp(-K \* DIA)

Data: TEMPO3  
 AIC BIC logLik  
 550.5243 583.8727 -261.2621

Random effects:

Formula: K ~ 1 | INDIV  
 k.(Intercept) Residual  
 StdDev: 0.1823309 4.562144

Fixed effects: D + S + K ~ CEPA

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
D.(Intercept)	0.71570	2.019215	53	0.35444	0.7244
D.CEPAB	-0.67089	2.898894	53	-0.23143	0.8179
D.CEPAC	-1.15317	3.081323	53	-0.37424	0.7097
D.CEPAE	0.50358	2.574632	53	0.19559	0.8457
S.(Intercept)	99.59011	3.087413	53	32.25682	0.0000
S.CEPAB	1.03622	4.390990	53	0.23599	0.8144
S.CEPAC	1.71016	4.456334	53	0.38376	0.7027
S.CEPAE	-1.24729	4.235316	53	-0.29450	0.7695
K.(Intercept)	0.35221	0.107432	53	3.27841	0.0018
K.CEPAB	-0.04096	0.148845	53	-0.27518	0.7842
K.CEPAC	-0.09433	0.147985	53	-0.63744	0.5266
K.CEPAE	0.31991	0.171604	53	1.86422	0.0678

Correlation:

	D.(In)	D.CEPAB	D.CEPAC	D.CEPAE	S.(In)	S.CEPAB	S.CEPAC	S.CEPAE	K.(In)	K.
CEPAB K.CEPAC										
D.CEPAB		-0.697								
D.CEPAC		-0.655	0.456							
D.CEPAE		-0.784	0.546	0.514						
S.(Intercept)		-0.610	0.425	0.400	0.478					
S.CEPAB		0.429	-0.617	-0.281	-0.336	-0.703				
S.CEPAC		0.422	-0.294	-0.637	-0.331	-0.693	0.487			
S.CEPAE		0.444	-0.310	-0.291	-0.572	-0.729	0.513	0.505		
K.(Intercept)		0.240	-0.167	-0.157	-0.188	-0.110	0.077	0.076	0.080	
K.CEPAB		-0.173	0.215	0.113	0.136	0.079	-0.096	-0.055	-0.058	-0.722
K.CEPAC		-0.174	0.121	0.201	0.137	0.080	-0.056	-0.094	-0.058	-0.726
.524										0
K.CEPAE		-0.150	0.105	0.098	0.279	0.069	-0.048	-0.048	-0.107	-0.626
.452										0
.452		0.454								

Standardized Within-Group Residuals:

	Min	Q1	Med	Q3	Max
	-2.72927913	-0.34388186	-0.14576318	0.09676698	2.65639491

Number of Observations: 80

Number of Groups: 16

> summary(AJUSTE2)

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood  
 Model: GLUCOSA ~ D + S \* exp(-K \* DIA)

Data: TEMPO3  
 AIC BIC logLik  
 474.0227 503.3435 -223.0114

Random effects:

Formula: K ~ 1 | INDIV  
 k.(Intercept) Residual  
 StdDev: 0.0004493158 9.953431

Fixed effects: D + S + K ~ CEPA

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
D.(Intercept)	0.89655	4.180283	37	0.214472	0.8314
D.CEPAB	0.31798	5.774090	37	0.055070	0.9564
D.CEPAC	-0.15876	5.818929	37	-0.027283	0.9784
D.CEPAE	-0.50248	5.850079	37	-0.085892	0.9320
S.(Intercept)	123.81813	7.655858	37	16.172991	0.0000
S.CEPAB	-0.31510	10.757538	37	-0.029291	0.9768
S.CEPAC	0.16116	10.780483	37	0.014949	0.9882
S.CEPAE	0.50865	10.796249	37	0.047114	0.9627
K.(Intercept)	0.72698	0.287255	37	2.530770	0.0158
K.CEPAB	0.26239	0.870587	37	0.301397	0.7648
K.CEPAC	0.15964	0.615504	37	0.259368	0.7968

```

K.CEPAE      0.09960  0.514746 37  0.193491  0.8476
Correlation:
D.(In) D.CEPAB D.CEPAC D.CEPAE S.(In) S.CEPAB S.CEPAC S.CEPAE K.(In) K.
CEPAB K.CEPAC
D.CEPAB      -0.724
D.CEPAC      -0.718  0.520
D.CEPAE      -0.715  0.517  0.513
S.(Intercept) -0.544  0.394  0.391  0.389
S.CEPAB      0.387 -0.535 -0.278 -0.277 -0.712
S.CEPAC      0.386 -0.280 -0.538 -0.276 -0.710  0.505
S.CEPAE      0.386 -0.279 -0.277 -0.540 -0.709  0.505  0.504
K.(Intercept) 0.623 -0.451 -0.448 -0.445 -0.303  0.215  0.215  0.215
K.CEPAB      -0.206  0.530  0.148  0.147  0.100 -0.267 -0.071 -0.071 -0.330
K.CEPAC      -0.291  0.211  0.578  0.208  0.141 -0.100 -0.287 -0.100 -0.467  0
.154
K.CEPAE      -0.348  0.252  0.250  0.602  0.169 -0.120 -0.120 -0.296 -0.558  0
.184  0.260
    
```

```

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-3.13273405 -0.07513706 -0.02051048  0.11718189  1.56673842
    
```

Number of Observations: 60  
 Number of Groups: 12

> summary(AJUSTE3)

```

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: FRUCTOSA ~ D + S * exp(-K * DIA)
Data: TEMPO3
      AIC      BIC      logLik
616.4305 649.7789 -294.2153
    
```

Random effects:

```

Formula: K ~ 1 | INDIV
      K.(Intercept) Residual
stdDev:  0.08123008 6.831366
    
```

Fixed effects: D + S + K ~ CEPA

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
D.(Intercept)	-3.46067	3.981922	54	-0.869095	0.3886
D.CEPAB	-1.99928	6.584712	15	-0.303625	0.7656
D.CEPAC	-6.39523	8.529766	54	-0.749755	0.4567
D.CEPAE	2.21825	5.350293	54	0.414603	0.6801
S.(Intercept)	104.40296	5.046002	54	20.690233	0.0000
S.CEPAB	1.51518	7.693331	54	0.196947	0.8446
S.CEPAC	3.98845	9.106609	54	0.437973	0.6632
S.CEPAE	-4.13148	6.943959	54	-0.594975	0.5543
K.(Intercept)	0.19037	0.049974	54	3.809405	0.0004
K.CEPAB	-0.05783	0.068879	54	-0.839650	0.4048
K.CEPAC	-0.09839	0.068226	54	-1.442070	0.1551
K.CEPAE	0.04237	0.072112	54	0.587546	0.5593

Correlation:

```

D.(In) D.CEPAB D.CEPAC D.CEPAE S.(In) S.CEPAB S.CEPAC S.CEPAE K.(In) K.
CEPAB K.CEPAC
D.CEPAB      -0.605
D.CEPAC      -0.467  0.282
D.CEPAE      -0.744  0.450  0.347
S.(Intercept) -0.728  0.440  0.340  0.542
S.CEPAB      0.477 -0.775 -0.223 -0.355 -0.656
S.CEPAC      0.403 -0.244 -0.853 -0.300 -0.554  0.363
S.CEPAE      0.529 -0.320 -0.247 -0.708 -0.727  0.477  0.403
K.(Intercept) 0.340 -0.206 -0.159 -0.253 -0.175  0.115  0.097  0.127
K.CEPAB      -0.247  0.316  0.115  0.184  0.127 -0.180 -0.070 -0.092 -0.726
K.CEPAC      -0.249  0.151  0.285  0.185  0.128 -0.084 -0.195 -0.093 -0.732  0
.531
K.CEPAE      -0.236  0.142  0.110  0.358  0.122 -0.080 -0.067 -0.166 -0.693  0
.503  0.508
    
```

```

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-2.03158607 -0.54753742  0.09347012  0.46302854  3.14971790
    
```

Number of Observations: 80  
 Number of Groups: 16

> summary(AJUSTE4)

```

Nonlinear mixed-effects model fit by maximum likelihood
Model: FRUCTOSA ~ D + S * exp(-K * DIA)
    
```



```

Data: TEMPO3
      AIC      BIC      logLik
518.5271 547.8479 -245.2635

Random effects:
Formula: K ~ 1 | INDIV
      K.(Intercept) Residual
stdDev: 7.152234e-06 14.42247

Fixed effects: D + S + K ~ CEPA
      Value Std.Error DF   t-value p-value
D.(Intercept)  0.38531  6.770580 37  0.056909  0.9549
D.CEPAB        3.96091  9.862933 37  0.401596  0.6903
D.CEPAC       -0.40412  9.910750 37 -0.040776  0.9677
D.CEPAE        1.56483  9.562342 37  0.163645  0.8709
S.(Intercept) 136.70174 11.423274 37 11.966950  0.0000
S.CEPAB       -3.78258 16.272438 37 -0.232453  0.8175
S.CEPAC        0.70308 16.291197 37  0.043157  0.9658
S.CEPAE       -1.59371 16.149506 37 -0.098685  0.9219
K.(Intercept)  0.42229  0.106290 37  3.973001  0.0003
K.CEPAB       -0.07471  0.132818 37 -0.562516  0.5772
K.CEPAC       -0.08385  0.129591 37 -0.647002  0.5216
K.CEPAE        0.00436  0.152640 37  0.028533  0.9774

Correlation:
      D.(In) D.CEPAB D.CEPAC D.CEPAE S.(In) S.CEPAB S.CEPAC S.CEPAE K.(In) K.
CEPAB K.CEPAC
D.CEPAB      -0.686
D.CEPAC      -0.683  0.469
D.CEPAE      -0.708  0.486  0.484
S.(Intercept) -0.580  0.398  0.396  0.411
S.CEPAB       0.407 -0.589 -0.278 -0.288 -0.702
S.CEPAC       0.407 -0.279 -0.590 -0.288 -0.701  0.492
S.CEPAE       0.410 -0.282 -0.280 -0.580 -0.707  0.497  0.496
K.(Intercept) 0.672 -0.461 -0.459 -0.476 -0.273  0.192  0.191  0.193
K.CEPAB      -0.538  0.670  0.367  0.381  0.218 -0.264 -0.153 -0.154 -0.800
K.CEPAC      -0.551  0.378  0.666  0.390  0.224 -0.157 -0.262 -0.158 -0.820  0
.656
K.CEPAE      -0.468  0.321  0.320  0.672  0.190 -0.133 -0.133 -0.273 -0.696  0
.557  0.571

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-3.00665700 -0.32869105  0.05906542  0.40771242  1.47045839

Number of Observations: 60
Number of Groups: 12
    
```

**Diferencias Significativas entre cepas para los Parámetros Físicoquímicos de los Vinos (Infostat)**

**Modelos lineales generales y mixtos**

**Ácido Acético**

**Especificación del modelo en R**

```

modelo.000_acetico_REML<-gls(acetico~1+cepa
,weights=varComb(varIdent(form=~1|cepa))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data00)
    
```

**Resultados para el modelo: modelo.000\_acetico\_REML**

Variable dependiente: Acetico

**Medidas de ajuste del modelo**

N      AIC    BIC    logLik      Sigma R2 0

8    8,64    3,73    3,68    0,08    0,71

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	545,12	<0,0001
cepa	3	2,93	0,1632

**Estructura de varianzas**

Modelo de varianzas: varIdent

Formula: ~ 1 | cepa

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
ÑNM10	1,00
ÑIF8	1,25
ÑNM16	0,33
EC1118	1,00

**Glicerol**

**Especificación del modelo en R**

```
modelo.001_glicerol_REML<-gls(glicerol~1+cepa
,weights=varComb(varIdent(form=~1))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data01)
```

**Resultados para el modelo: modelo.001\_glicerol\_REML**

Variable dependiente: Glicerol

**Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
8	27,18	24,11	-8,59	1,46	0,05	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	567,95	<0,0001
cepa	3	0,07	0,9711

**Ácido Láctico**

**Especificación del modelo en R**

```
modelo.002_lactico_REML<-gls(lactico~1+cepa
,weights=varComb(varExp(form=~fitted(.)|PRED_lactico))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data02)
```

**Resultados para el modelo: modelo.002\_lactico\_REML**

Variable dependiente: lactico

**Medidas de ajuste del modelo**

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>	<u>logLik</u>	<u>Sigma</u>	<u>R2</u>	<u>0</u>
8	16,58	7,57	1,71	0,08	0,60	

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)**

	<u>numDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	619,56	0,0001
cepa	4	2,05	0,2915

**Estructura de varianzas**

Modelo de varianzas: varExp

Formula: ~ fitted(.) | PRED\_lactico

Parámetros de la función de varianza

<u>Parámetro</u>	<u>Estim</u>
1,57	-0,39
1,475	-0,31
1,44	-5,6E-08
1,935	0,88

**Ácido Málico**

**Análisis de la varianza**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
MALICO	12	0,50	0,31	13,48

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	1,03	3	0,34	2,67	0,1183
CEPA	1,03	3	0,34	2,67	0,1183
Error	1,02	8	0,13		
Total	2,05	11			

**pH**

**Análisis de la varianza**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Ph	12	0,25	0,00	1,59

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	0,01	3	2,9E-03	0,91	0,4791
CEPA	0,01	3	2,9E-03	0,91	0,4791
Error	0,03	8	3,2E-03		
Total	0,03	11			

### **Azúcares Reductores Totales**

Resultados para el modelo: modelo.000\_ART\_REML

Variable dependiente: ART

#### Medidas de ajuste del modelo

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>	<u>logLik</u>	<u>Sigma</u>	<u>R2</u>	<u>0</u>
12	53,85	54,49	-18,92	2,62	0,24	

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	<u>numDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	26,30	0,0009
CEPA	3	0,82	0,5166

De conformidad con lo expuesto en esta Tesis de Maestría

---

Bioquímica Adriana Beatriz Simes  
Autora

---

Dra. Silvana María del Mónaco  
Directora