



**ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES
SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS**
Maria Antonia Redón Miralles

ISBN: 9788469432365
Dipòsit Legal: T. 1045-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

María Antonia de las Mercedes Redón Miralles

**Estudio global del metabolismo lipídico de *Saccharomyces* spp. en
fermentaciones a bajas temperaturas**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Dr. Nicolas Rozès y el Dr. José Manuel Guillamón



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
C/Marcel·lí Domingo, s/n
43007 Tarragona

Els sotassignats, El Dr. Nicolas Rozès, professor titular d'Escola Universitària del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili i el Dr José Manuel Guillamón Navarro, Investigador titular del Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC).

FAN CONSTAR,

Que el present treball, amb títol, **“Estudio global del metabolismo lipídico de *Saccharomyces spp.* en fermentaciones a bajas temperaturas”** que presenta la Srta. Maria Antonia de las Mercedes Redón Miralles per a optar al Grau de Doctora per la Universitat Rovira i Virgili ha estat realitzat sota la nostra direcció, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentada doctoranda.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

Dr. Nicolas Rozès

Dr. José Manuel Guillamón Navarro

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido financiada por una Beca FI de de la Generalitat de Catalunya gracias a la que he podido disfrutar de un apoyo económico durante cuatro años sin el cual no hubiera sido posible llegar a este punto para optar al título de doctora.

En primer lugar quería agradecer al Doctor y Catedrático Albert Mas la oportunidad que me brindó de poder formar parte de su grupo de Investigación y realizar el doctorado en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona. También quería dar las gracias a mis dos directores de tesis, al Dr. José Manuel Guillamón y al Dr. Nicolas Rozès, por su orientación y consejos en todo momento tanto en el trabajo experimental como en la redacción de artículos y de la tesis. También debo agradecer al Dr. Ricardo Cordero por su colaboración en el último trabajo y al resto de profesores con los que he tenido una relación tanto profesional como de amistad.

Tampoco puedo olvidarme de los Doctores Eladio Barrio y Amparo Querol con lo cuales me inicié en el mundo de la Investigación de las levaduras en sus laboratorios de la Universidad de Valencia con una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación y Ciencia, muchas gracias por todo.

Pasando a mis compañeros/as y a la vez buenas/os amigos de carrera, pero que continúan siéndolo a pesar de la distancia, debo nombrar a las “Superbiologist@s”: Almu, Amparo, Ana, Encarna, Fran, María José, Montse, Olga y Rosario. Os agradezco profundamente vuestro apoyo en todo momento.

Ya en el comienzo de mi doctorado en Tarragona nunca olvidaré a la persona que me ofreció su hogar de forma desinteresada, muchas gracias por tu amistad en todo momento. También quiero agradecer al resto de compañeros tanto del mismo laboratorio como de otros del mismo departamento, a los que ya no están en la Universidad y a los nuevos. Siempre se aprende de los demás, compartir tanto laboratorio como una buena parte de la vida ha sido un placer.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Sobre todo quiero mencionar a mis amigos, con los que he podido confiar en los buenos y sobre todo en los momentos difíciles, os quiero. Mil gracias por estar conmigo y acompañarme cuando lo he necesitado. Carlos muchas gracias por estar a mi lado, apoyarme y darme fuerza.

Finalizando este apartado quiero agradecer a mi familia, a mis padrinos, primos y en especial a mis padres y abuelos. Papá, mamá, muchas gracias por todo, por haberme educado, apoyado y querido toda la vida sin esperar nada a cambio. Gracias por haberme animado y ayudado a conseguir uno de mis objetivos como es defender mi Tesis Doctoral. Papá, aunque no puedas estar aquí entre nosotros “et recordem, i t’estimarem sempre”. Se que allí donde estés te sentirás muy contento y me estarás apoyando en todo momento. ¡Mamá, papá, os quiero!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Als meus pares

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

ÍNDICE

• OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	11
• INTRODUCCIÓN.....	20
• CAPÍTULO I	
“Effect of Active Dry Wine Yeast storage upon viability and lipid composition”	79
• CAPÍTULO II	
“Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature”	101
• CAPÍTULO III	
“Effect of lipid supplementation upon <i>Saccharomyces cerevisiae</i> lipid composition and fermentation performance at low temperature”	125
• CAPÍTULO IV	
“Study of fermentation vitality of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> at low temperature by using phospholipid mutants”	143
• DISCUSIÓN GENERAL.....	169
• CONCLUSIONES GENERALES	187
• ANEXOS	193

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Cuando me incorporé al grupo de Investigación de Biotecnología Enológica del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona, los trabajos de investigación en la línea de levaduras tenían como objetivo el estudio de las fermentaciones a bajas temperaturas. El interés por la fermentación alcohólica a bajas temperaturas (10-15 °C) de vinos blancos o rosados surgió por los beneficios que aportan sobre el perfil organoléptico del vino, aumentando la retención de compuestos aromáticos afrutados y disminuyendo aquellos que merman la calidad (Llauradó et al., 2000, Torija et al., 2002). Sin embargo, las bajas temperaturas se tratan de una condición adversa para el desarrollo de las levaduras que tiene como consecuencia fases de latencia largas, fermentaciones lentas o incluso paradas. Las bajas temperaturas afectan de manera importante al metabolismo lipídico de las levaduras. El frío rigidifica las membranas celulares y el mecanismo de respuesta por parte de la célula va encaminado a conseguir una fluidez de membrana adecuada. Diferentes trabajos de nuestro grupo ya habían descrito algunas de las adaptaciones en la composición lipídica de las levaduras a causa de las bajas temperaturas (Llauradó et al., 2000; Llauradó et al., 2002, Torija et al., 2002., Novo et al., 2003; Beltrán et al., 2006) y han sido precedentes para la presente tesis denominada “Estudio global del metabolismo lipídico de *Saccharomyces* spp. en fermentaciones a bajas temperaturas”. Los proyectos que han sido la base de la investigación que se ha estado realizando y en donde se engloba este trabajo son:

- Análisis funcional del genoma de *S. cerevisiae* en fermentaciones vínicas a bajas temperaturas (AGL 2004-02307/ALI).
- La respuesta al frío: mecanismos, estrategias y dianas para la mejora y selección de cepas de levadura vínicas y de panadería (AGL2007-65498-C02-02/ALI).

Dentro de este contexto, se planteó la siguiente **hipótesis**, que constituye la base de esta tesis:

Se puede mejorar el control de las fermentaciones a partir de los cambios en el metabolismo lipídico, bien por selección, adición o por modificación metabólica, logrando mejorar la vitalidad fermentativa y la viabilidad a bajas temperaturas.

Los objetivos generales de la tesis son:

- Evaluar el efecto de almacenamiento de una levadura seca activa sobre la vitalidad a bajas temperaturas, la composición lipídica y la posible recuperación después de crecimiento en un medio de cultivo óptimo (YEPD).

- Análisis de la composición lipídica de diferentes levaduras industriales (vínicas, cerveceras y panaderas) y de diferentes especies (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum* e híbridos de estas especies) como estrategia para mejorar su capacidad fermentativa y de crecimiento a baja temperatura
- Reducir el tiempo de las fermentaciones a bajas temperaturas a través de la modificación de la composición lipídica mediante la adición de lípidos en el medio de crecimiento.
- Reducir el tiempo de las fermentaciones a bajas temperaturas a través de la modificación de la composición lipídica mediante la eliminación de genes de las rutas de síntesis: estudio fenotípico y de composición lipídica de mutantes.

En los diferentes trabajos que se presentan se estudia el metabolismo lipídico de las levaduras, en diferentes condiciones o especies, siempre relacionándolo con parámetros cinéticos tales como la viabilidad, vitalidad y/o capacidad fermentativa en mosto sintético.

En el primer capítulo de la tesis se evalúan las consecuencias del almacenamiento y conservación de la levadura seca activa (LSA). Puesto que alteraciones en la membrana plasmática de las LSA producen efectos negativos sobre la actividad de la fermentación alcohólica, se analizaron las alteraciones inducidas por las inadecuadas condiciones de almacenamiento de la LSA *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand) en los lípidos de la membrana plasmática y la consecuente repercusión sobre la viabilidad y vitalidad. La funcionalidad de la membrana se midió por anisotropía y se determinó la composición lipídica: ácidos grasos, esteroides y fosfolípidos. También se analizó la recuperación en medio YEPD. Estos resultados publicados en la revista Word Journal of Microbiology and Biotechnonology están descritos en el capítulo I, titulado: “***Effect of Active Dry Wine Yeast storage upon viability and lipid composition***”. En este trabajo se realizaron análisis estadísticos de correlación donde se pudo ver una buena correlación entre ácidos grasos insaturados y la vitalidad de las levaduras a 13 °C.

El segundo trabajo tenía como objetivo dilucidar si la respuesta de modificación de la composición lipídica por el frío era una respuesta que podía considerarse más o menos universal para las diferentes cepas industriales de *S. cerevisiae* o de otras especies afines, igualmente de interés industrial. Por este motivo, en el capítulo II, se analizaron los cambios que se producían en la composición lipídica de varias cepas con distinta especialización

industrial y pertenecientes a diferentes especies del género *Saccharomyces*. Con esta finalidad, se analizó cual de estas especies iniciaría de forma más rápida una fermentación alcohólica a 13 °C y cual presentaría mayor capacidad fermentativa logrando transformar los azúcares en etanol y CO₂ con una tasa de consumo superior. En este trabajo se estudiaron los efectos de un precultivo a bajas temperaturas comparándolo con una temperatura control de 25 °C, sobre diferentes parámetros cinéticos como la OD máxima, tiempo de generación, viabilidad y tiempo en consumir el 5, 10 y 100% de los azúcares iniciales del mosto sintético, todo ello siempre analizando la composición lipídica de las levaduras, observando el efecto cepa y temperatura. Todos los experimentos realizados están descritos en el capítulo II titulado: ***“Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature”*** enviado a la revista European Food Research and Technology.

El tercer y cuarto capítulos comparten el objetivo de mejorar la actividad fermentativa de las levaduras a bajas temperaturas mediante la modificación de la membrana plasmática a través de diferentes estrategias. En el capítulo III se modificó la composición lipídica de la membrana mediante un precultivo de la levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand) en presencia de diferentes ácidos grasos y ergosterol, con la finalidad de rediseñar la composición lipídica como estrategia para mejorar las fermentaciones a bajas temperaturas en bodega. Los ácidos grasos suplementados fueron: el ácido láurico (C12), el ácido palmitoleico (C16:1), el ácido esteárico (C18) y el ácido linolénico (C18:3). Se determinó la viabilidad, capacidad fermentativa a 13 °C, fluidez de membrana y la composición lipídica (ácidos grasos, lípidos neutros y fosfolípidos). Los resultados publicados en la revista European Food Research and Technology de este trabajo se describen en el capítulo III titulado: ***“Effect of lipid supplementation upon Saccharomyces cerevisiae lipid composition and fermentation performance at low temperature”***.

Finalmente en el cuarto capítulo se optó por un mecanismo alternativo a la adición de lípidos que consiste en modificar la membrana plasmática mediante la eliminación, delección o “Knock-out” de diferentes genes implicados en las rutas de síntesis. Estas mutaciones de genes del metabolismo lipídico tienen como consecuencia la disminución de algunos compuestos lipídicos celulares y el aumento de otros. Se ha estudiado la supresión de genes implicados en el metabolismo de los fosfolípidos, tanto en la ruta *de novo*, como en la ruta de Kennedy y en la de reciclaje. Se utilizaron los mutantes de la colección EUROSCARF y se

estudió si la supresión de determinados genes tenía resultados favorables o desfavorables sobre la vitalidad de las células a 25 °C y a 13 °C. Además se determinaron los tiempos de generación de determinados mutantes y su correspondencia con los resultados en vitalidad fermentativa. Por último se realizaron ensayos de suplementación de colina y etanolamina sobre mutantes cuya delección tenía efectos negativos sobre la vitalidad a 13 °C con el fin de ver la posible recuperación del fenotipo. Todos los experimentos realizados están descritos en el capítulo IV titulado: ***“Study of fermentation vitality of Saccharomyces cerevisiae at low temperatura by using phospholipid mutants”***.

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

1. LAS LEVADURAS Y LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

1.1. Características generales de las levaduras.....	20
1.2. Biodiversidad de las levaduras durante la fermentación	23
1.3. La fermentación alcohólica como proceso bioquímico.....	25
1.4. Fermentaciones inoculadas con levadura seca activa (LSA)	26
1.5. El proceso industrial de producción de levadura vínica seca activa	27

2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

2.1. Esteroles	31
2.1.1. Ergosterol, principales intermediarios y esteroides exógenos	31
2.1.2. Ruta de biosíntesis de los esteroides	35
2.1.3. Funciones	37
2.1.4. Lípidos de reserva.....	37
2.2. Fosfolípidos	39
2.2.1. Clasificación y estructura.....	39
2.2.2. Ácidos grasos	42
2.2.3. Biosíntesis de los fosfolípidos	45
2.2.4. Reciclaje de los fosfolípidos.....	48
2.3. Esfingolípidos	52
2.3.1. Estructura y funciones	52
2.3.2. Biosíntesis de los esfingolípidos	54
2.3.3. Funciones	55

3. LAS FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

3.1. Efecto de la temperatura sobre la ecología de las levaduras	57
3.2. Efecto de la temperatura sobre la cinética fermentativa.....	58
3.3. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad	59
3.4. Modificación en la actividad metabólica de las levaduras con diferente producción de metabolitos secundarios.....	59
3.5. Efecto de la temperatura sobre la composición lipídica de las levaduras	61

4. BIBLIOGRAFÍA.....

1. LAS LEVADURAS Y LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La historia de la producción del vino es paralela a la civilización, los historiadores creen que el vino comenzó a producirse en el Cáucaso y Mesopotamia hacia el 6000 a C, pero fueron los romanos quienes difundieron su producción por todo el Mediterráneo. En 1845 Louis Pasteur fue el primer científico que demostró que la fermentación del mosto de uva era el resultado de la actividad microbiana. Los primeros estudios que apuntaban a esta responsabilidad de las levaduras en la fermentación alcohólica fueron las observaciones que hizo al microscopio de las mismas Antoine van Leeuwenhoek en 1680. Más tarde, en torno al 1830, varios estudios científicos independientes, llevados a cabo por Cagniard-Latour, Kützing y Schwan, describían a las levaduras como organismos vivos (teoría vitalista) y potenciales responsables de la fermentación alcohólica (Barnett, 1998). Sin embargo, es el gran microbiólogo francés quien describió, sin ninguna posibilidad de duda, que las levaduras eran las responsables de la biotransformación de los azúcares de la uva, principalmente, glucosa y fructosa, en alcohol y dióxido de carbono. Desde entonces se ha estado investigando en la microbiología, bioquímica, biología molecular y genética de las levaduras para comprender el proceso de la transformación del mosto de uva en vino y mejorar la calidad del producto final.

1.1. Características generales de las levaduras.

Las levaduras son los eucariotas más simples que existen y están protegidas por dos barreras: la pared y la membrana citoplásmica. La **pared celular** está formada por dos constituyentes principales, β -glucanos (60%) y manoproteínas (25-50%). También aparece en la pared una pequeña cantidad de quitina (2-4%) localizada principalmente en las cicatrices que quedan tras la gemación. Su principal función es proteger a la célula pero también es el lugar de reconocimiento de muchas moléculas que determinan ciertas interacciones celulares. La **membrana plasmática** es una barrera hidrofóbica entre el citoplasma y el medio extracelular. Como todas las membranas biológicas, la membrana plasmática de las levaduras está formada principalmente por lípidos (esencialmente fosfolípidos y esteroides, aunque también poseen en menor proporción esfingolípidos y glicoglicerolípidos) y proteínas. Las proteínas integrales de membrana están fuertemente asociadas a la región apolar de la bicapa, mientras que las proteínas periféricas se unen a las proteínas integrales. La composición de la membrana en ácidos grasos y su proporción en esteroides controlan su fluidez. Las membranas de las células eucarióticas presentan diferentes funciones: barrera de difusión entre el interior de la célula y el medio extracelular y entre el lumen de los orgánulos y el citosol. Acogen a proteínas que

catalizan el transporte selectivo de moléculas, actúan como enzimas en vías reguladoras o metabólicas o actúan como receptores que contribuyen en procesos de reconocimiento.

Dentro del grupo de los Eumycetes o hongos verdaderos, se distinguen cuatro grupos morfológicos: Phycomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) y Basidiomycetes. Las levaduras son hongos unicelulares que pueden multiplicarse asexualmente por gemación o fisión y sexualmente mediante la formación de esporas. Según el tipo de espora sexual que formen se pueden clasificar en Ascomycetes y Basidiomycetes. Los Ascomycetes producen ascosporas mientras que los Basidiomycetes forman unas hifas o basidios en el extremo de los cuales producirán basidiosporas. Las levaduras de interés enológico pertenecen principalmente al grupo de los Ascomycetes. *Saccharomyces cerevisiae* pertenece a los Ascomycetes ya que bien puede reproducirse asexualmente por gemación o sexualmente formando ascosporas en el interior de un asca o saco.

Bajo condiciones nutricionales y de cultivo óptimas, *S. cerevisiae*, levadura responsable de la fermentación alcohólica, dobla su masa cada 90 minutos. El ciclo de división celular (**Fig. 1A**), en la multiplicación vegetativa, consiste en 4 fases: **G1**: periodo previo a la síntesis del DNA, **S**: síntesis del DNA, **G2**: periodo precedente a la mitosis, **M**: mitosis y citoquinesis. En contraste con otras células eucarióticas, la división en *S. cerevisiae* es un proceso asimétrico en el que la célula recién formada es más pequeña que la célula madre.

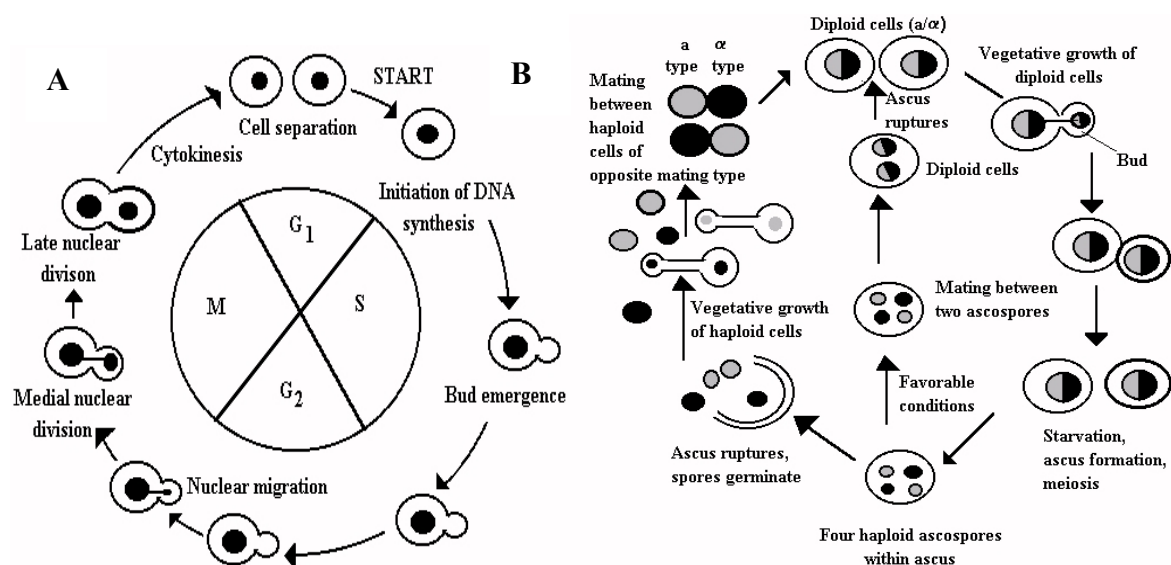


Figura 1. Ciclo celular (A) y reproducción sexual de *Saccharomyces cerevisiae* (B).

Bajo condiciones de carencia nutricional las células diploides esporulan (reproducción sexual). Mediante un proceso de meiosis, generan cuatro ascosporas haploides (dos de signo sexual MAT α y otras dos MAT a) encapsuladas en una asca (**Fig. 1B**). Las levaduras del vino no esporulan fácilmente y cuando lo hacen el porcentaje de viabilidad de las esporas es bajo (Mortimer et al., 1994; Codón et al., 1995). Cuando las ascosporas se liberan del asca y germinan pueden empezar a multiplicarse y generar una línea celular haploide. Las cepas que pueden mantenerse estables como haploides durante algunas generaciones se denominan heterotáticas, y las cepas que pueden realizar un cambio sexual, por conversión génica, fusionar las células de diferente sexo y formar diploides se llaman homotáticas.

S. cerevisiae posee un genoma compacto y relativamente pequeño, un amplio número de cromosomas, DNA repetitivo y unos pocos intrones. Las cepas haploides contienen aproximadamente 12-13 Mb de DNA nuclear, distribuido a lo largo de 16 cromosomas lineales y alrededor de los 6000 genes. El genoma de una cepa de *S. cerevisiae* de laboratorio fue secuenciado hace más de diez años (Goffeau et al., 1996). Actualmente son varias las cepas del género *Saccharomyces* secuenciadas completamente, entre ellas dos levaduras vínicas (Borneman et al., 2008; Novo et al., 2009). Novo et al. (2009), secuenciaron el genoma completo de la levadura vínica comercial diploide Lalvin EC1118 (Lallemand) y estudiaron los mecanismos moleculares que contribuyen a la adaptación de las levaduras al proceso fermentativo. La transferencia génica entre especies del mismo género *Saccharomyces* y entre especies no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* explicaba la presencia de regiones únicas en el cromosoma de esta levadura (EC1118) que no se encontraban en el genoma de referencia (S288c) demostrando que el genoma de una levadura vínica se encuentra en constante cambio a través de la contribución de genes exógenos. También se pone de manifiesto que el fenómeno de la transferencia horizontal es bastante habitual en esta levadura vínica.

Las levaduras vínicas industriales también son predominantemente diploides o aneuploides, y ocasionalmente poliploides. La ploidía de las levaduras del vino podría conferir ventajas para la adaptación a cambios del medio externo o quizás se trate de un modo de incrementar la dosis de algunos genes importantes en la fermentación. Aparte de las características genómicas, las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son homotáticas y altamente heterocigotas. Como ya se ha mencionado, las cepas homotáticas presentan la capacidad de invertir su signo sexual una vez germina la espora, pasando de “a” a “ α ” o viceversa en cada nueva gemación

de la espora germinada. Esta capacidad de cambio del signo sexual está codificado en el gen *HO*, y permite crear un pool de células de diferente signo sexual procedentes de una sola espora. Esto facilita una rápida diploidización y el estado en fase haploide prácticamente limitado a la espora. Por esta razón, es tan difícil encontrar cepas haploides de *S. cerevisiae* en la naturaleza.

1.2. Biodiversidad de las levaduras durante la fermentación.

Desde un punto de vista microbiológico, el vino es un producto de complejas interacciones entre hongos, levaduras y bacterias, que comienzan en el viñedo y continúa a través del proceso de fermentación hasta el envasado. Aunque muchos géneros y especies de estos microorganismos están presentes en los mostos e influyen en las propiedades finales de los vinos elaborados, únicamente las levaduras del género *Saccharomyces* (principalmente *S. cerevisiae*) son las responsables de la fermentación alcohólica hasta el final (Pretorius, 2000). La fermentación alcohólica se puede definir como la transformación de los azúcares del mosto (glucosa y fructosa) en etanol y CO₂, fruto de la cual, las levaduras obtienen energía y constituyentes para crecer y sobrevivir en el mosto.

Tradicionalmente, el vino se producía por la fermentación natural causada por el desarrollo de levaduras procedentes de la uva y de la bodega. La microbiota presente en la superficie de la uva se ve afectada por un gran número de factores que influyen en la proporción de las diferentes especies. Estos factores incluyen la temperatura, la pluviosidad y otras influencias climáticas (Longo et al., 1991; Querol et al., 1990), grado de madurez de la cosecha (Martínez et al., 1989; Rosini et al., 1982), uso de fungicidas (Bureau et al., 1982), daño físico debido a hongos, insectos, etc. (Longo et al., 1991) y variedad de uva. Por otro lado la superficie de la maquinaria de la bodega (prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc.) entra en contacto con el mosto de uva siendo otra fuente de aporte de levaduras. Las levaduras apiculadas del género *Hanseniaspora* o su anamorfo *Kloeckera* (especies mayoritarias sobre la superficie de la uva, en porcentajes del 50 al 75% del total de la población levaduriforme) y las levaduras oxidativas de los géneros *Candida* (principalmente *C. zemplinina*, antigua *C. stellata*), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Rhodotorula* crecen en las primeras fases de la fermentación, pero debido al incremento de la concentración de alcohol y de las condiciones de anaerobiosis, pasa a ser *Saccharomyces*, y en concreto la especie *S. cerevisiae*, la especie dominante y responsable de la fermentación. Esta especie, aunque se encuentra en niveles bajos en la uva, durante la fermentación se multiplica rápidamente y desplaza a otros

microorganismos que eventualmente invaden el mosto. Por trabajos recientes, la tolerancia a altas concentraciones de etanol y una mejor adaptación a las altas temperaturas parecen ser factores claves en la imposición de *S. cerevisiae* respecto a las otras especies de levaduras (Goddard et al., 2008).

Aunque la especie más frecuente en fermentaciones vínicas es *S. cerevisiae*, no obstante, otras especies de *Saccharomyces* pueden estar presentes en la fermentación alcohólica, e incluso llegar a ser predominantes, como es el caso de *Saccharomyces bayanus* en vinos elaborados en regiones de clima continental, con temperaturas de fermentación más bajas, (Naumov, 2001; Naumov et al., 2002) o en la producción de sidra (Naumov et al., 2001; Coton et al., 2006). *Saccharomyces paradoxus* es también otra especie que se ha descrito como predominante en vinos croatas (Redzepovic et al., 2002).

La clasificación taxonómica dentro del género *Saccharomyces* es complicada por el hecho de que la mayoría de cepas presentan características fisiológicas y morfológicas similares. Además, la definición biológica de especie es difícil de aplicar a cepas del mismo género ya que muchos aislados naturales muestran una pobre habilidad de unión y esporulación y en muchos casos tienen genomas híbridos complejos que contienen información genética de otras especies del mismo género (Querol & Bond, 2008). Además, en los últimos años se ha descrito la existencia de cepas híbridas entre estas especies que todavía complica más esta clasificación. Un ejemplo es la cepa comercial S6U que es un híbrido *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, aislada en vinos italianos (Masneuf et al., 1998). También se han aislado híbridos *S. cerevisiae* x *S. uvarum* en vino húngaro Tokaj (Antunovics et al., 2005) y en vinos de la Alsacia en Francia (Demuyter et al., 2004; Le Jeune et al., 2007). También, en nuestro país, se han aislado híbridos tanto *S. bayanus* var. *bayanus* x *S. cerevisiae* como *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* de una fermentación vínica en Valladolid (González et al., 2006). Estas especies fueron mal identificadas como *S. cerevisiae*, ya que aparecían como predominantes durante fermentaciones vínicas espontáneas en la región de Zurich, Suiza (Schütz & Gafner, 1994) y algunas de ellas fueron seleccionadas como cepas comerciales adaptadas a fermentar en áreas frías de Centro-Europa (cepas W27 y W46 de Lallemand Inc.). González et al. (2006) también encontraron un triple híbrido *S. bayanus* var. *uvarum* x *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* entre cepas vínicas de Suiza. Algunos híbridos han sido caracterizados por sus propiedades fisiológicas de interés enológico (González et al., 2007; Belloch et al., 2008). Estas cepas híbridas tenían tolerancia al etanol y presentaban la habilidad de crecer en medios con alto

contenido en azúcares, particularidad heredada del parental no *S. cerevisiae* (Belloch et al., 2008).

También cabe destacar que aunque las especies pertenecientes al género *Saccharomyces* son la microbiota mayoritaria y residente en la bodega (Fleet & Heard, 1993; Martini & Vaughan-Martini, 1990), también han sido aisladas en el ambiente de bodega y en vinos acabados especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* y que pueden causar problemas de alteración de los vinos por cambios organolépticos (Dias et al., 2003).

1.3. La fermentación alcohólica como proceso bioquímico.

Las levaduras, en especial *S. cerevisiae*, son las responsables de la fermentación alcohólica que consiste en la transformación de los azúcares del mosto de uva en etanol y dióxido de carbono. La glucosa y la fructosa, principales azúcares del mosto de uva, son metabolizados a piruvato por la vía glicolítica. El piruvato es descarboxilado a acetaldehído que luego es reducido a etanol. La tasa de fermentación y la cantidad de alcohol producido por unidad de azúcar durante la transformación del mosto de uva en vino tiene una importancia comercial considerable. Durante la glucólisis, una molécula de glucosa o fructosa se transforma en dos moléculas de etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, la conversión teórica de 180 g azúcar en 92 g de etanol (51.1%) y 88 g de dióxido de carbono (48.9%) podría sólo esperarse en la ausencia de crecimiento de levaduras y considerando que no se producen otros metabolitos secundarios de gran importancia para la calidad del vino (Boulton et al., 1996). En una fermentación modelo, sobre el 95% del azúcar es convertido en etanol y dióxido de carbono, el 1% en material celular y el 4% en otros productos como el glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, butanodiol, alcoholes superiores, ésteres, etc.

Las levaduras son anaerobias facultativas, siendo capaces de fermentar ante la ausencia de oxígeno. Sin embargo, también son definidas como Crabtree positivas, en referencia al efecto Crabtree (Posten & Cooney, 1993, Wang et al., 1979). Este efecto implica que independientemente de la disponibilidad de oxígeno, en presencia de concentraciones de glucosa o fructosa por encima de los 9 g/l, se pasa espontáneamente al metabolismo fermentativo (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

1.4. Fermentaciones inoculadas con levadura seca activa (LSA).

Determinados factores, como las condiciones climáticas adversas durante la recolección de la uva, pueden producir serios problemas durante la fermentación, tales como variaciones en la microbiota levaduriforme inicial, paradas fermentativas, retraso en la fermentación, con los consiguientes problemas de degradación total de azúcares reductores, etc. Para evitar estos problemas, para reducir la duración de la fase de latencia, para lograr que el producto final mantenga las mismas características y calidad a lo largo de las distintas campañas, es práctica generalizada en las bodegas la inoculación de un cultivo puro de levaduras comercializado en forma de LSA.

Todas las cepas comercializadas como LSA pertenecen al género *Saccharomyces*, y la gran mayoría a la especie *S. cerevisiae*. La utilización de técnicas moleculares ha permitido comprobar la correcta identificación de estas cepas. Así se ha podido comprobar que algunas cepas comercializadas como *S. bayanus* son realmente *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar et al., 2001) o cepas inicialmente clasificadas como *S. cerevisiae* son en realidad híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (González et al., 2006).

El conocimiento de las levaduras presentes en la fermentación es fundamental, dada la influencia de éstas en la producción de compuestos que determinan el sabor y el perfil aromático de los vinos, pero también determinadas condiciones enológicas como son los mostos con alta concentración de azúcares, pobres en nitrógeno y las altas o bajas temperaturas de fermentación. Para las fermentaciones a bajas temperaturas es crucial la elección de una cepa que tenga un rango de crecimiento de temperaturas más amplio de lo habitual y, por tanto, esté bien adaptada a esta condición. De aquí que haya sido prioritario para la industria enológica la selección de levaduras capaces de fermentar a bajas temperaturas (Castellari et al., 1994; Giudici et al., 1998; Massoutier et al., 1998). Las cepas criotolerantes tienen la característica de producir grandes cantidades de glicerol y ácido succínico y suelen producir menos ácido acético (Castellari et al., 1994). Una cepa poco adaptada a crecer a temperaturas bajas implicaría retraso en el inicio (fases de latencia muy largas), falta de imposición de la cepa de *Saccharomyces*, puesto que las cepas no-*Saccharomyces* suelen ser más competitivas a baja temperatura, y finales de fermentación muy largos e incluso paradas fermentativas.

1.5. El proceso industrial de producción de levadura seca activa (LSA).

Las levaduras se añaden al mosto de cerveza y a la masa del pan desde finales del siglo XIX. En el caso de la industria del vino, no fue hasta los años 50 del siglo pasado cuando empezó a ser habitual la adición de inóculos de levadura en las fermentaciones vínicas en Estados Unidos, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. En Europa había reticencias a esta práctica, todavía minoritaria. En los años 60 se desarrollaron las técnicas de producción de levadura seca activa (LSA) y su utilización se extendió rápidamente (Reed & Nagodaeithana, 1988). Los primeros países europeos en utilizar LSA en las bodegas fueron Alemania, Italia y Francia una década después. En los últimos años se ha extendido su uso en España y actualmente son pocas las bodegas que llevan a cabo fermentaciones espontáneas, sin control microbiológico.

La industria de la producción de levaduras como biomasa representa la de mayor volumen de producción de microorganismos en el mundo. Además de las clásicas levaduras prensadas en fresco para panadería, la levadura seca activa (LSA) se ha desarrollado para permitir un almacenamiento a más largo plazo de los cultivos iniciadores (Rosen, 1989). La estabilidad del inóculo es muy relevante para la industria vínica debido a su uso de temporada, justo después de la recogida de la uva.

A pesar de que las nuevas tecnologías han sido implementadas, la principal fase de la producción de biomasa de levaduras, como por ejemplo el crecimiento de las levaduras, sigue los mismos principios que la manufactura de las levaduras de panadería (Beudeker et al., 1990; Nagodawithana & Trivedi, 1990; Pereira et al., 2001; Rose & Vijaylakshimi, 1993). La cepa de levadura se selecciona de su propio hábitat natural y el proceso de producción de levadura seca activa (LSA) empieza por verificar la ausencia de contaminación y la identificación positiva de la cepa mediante técnicas moleculares de tipificación. Después, las células son inoculadas en un pequeño volumen de precultivo de melaza complementado con fuentes de nitrógeno, fosfatos, sulfatos, biotina, tiamina y ácido pantoténico. La melaza es un subproducto del proceso de refinamiento del azúcar, sin otra utilidad que el crecimiento de las levaduras. Es un material muy barato ya que el precio viene determinado por la demanda de las plantas de producción de biomasa de levadura. Actualmente, también se está utilizando como alimento para animales, lo cual podría encarecer su precio si aumenta su demanda. Las melazas pueden provenir de cultivos de caña de azúcar propios de climas subtropicales, o de cultivos de remolacha como ocurre en España. La mayor parte de los azúcares que contiene es

sacarosa aunque también hay otros azúcares como la rafinosa que no es completamente asimilable por *S. cerevisiae*.

Una vez las melazas son diluidas y clarificadas, pasan por un intercambiador de calor con el objetivo de ser esterilizadas. Posteriormente se añaden los suplementos directamente a la melaza o en el fermentador durante el crecimiento. El proceso de producción de biomasa de levaduras vínicas consta de una secuencia de 5-6 fermentaciones con fermentadores de mayor volumen en cada paso (Chen & Chiger, 1985; Reed & Nagodaeithana, 1991). En las tres primeras fermentaciones es posible mantener la pureza del cultivo ya que se realizan crecimientos en batch en fermentadores relativamente pequeños de sencilla esterilización. Un cultivo de 2-5 litros que ha crecido en matraz, es utilizado como inóculo para la primera fermentación en batch. Una vez las células consumen la fuente de carbono, se inocula la siguiente fermentación. El inóculo puede ser todo el volumen de la primera fermentación o una crema que se obtiene tras concentrar las células por centrifugación. El rendimiento en estas primeras fases es bastante bajo.

El proceso de producción finalmente tiene lugar en tanques de fermentación grandes abiertos usando condiciones de fed-batch en los que puede aumentar el nivel de microorganismos contaminantes (10^4 - 10^8 ufc/g), principalmente bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc* o *Lactobacillus*. En estas condiciones es importante preservar la asepsia en todos los instrumentos, contenedores y conductos. El medio contiene abundantes nutrientes pero baja concentración de glucosa (para evitar el efecto Crabtree y aumentar la producción de biomasa), que se añade continuamente al medio de crecimiento, usualmente en forma de melaza diluida y suplementado con nutrientes clave (fuentes de nitrógeno y fosfato, algunos minerales y vitaminas). De esta forma cada fermentación puede generar biomasa para inocular hasta tres fermentaciones de la siguiente etapa, con lo que la cantidad de biomasa que se obtiene aumenta exponencialmente. Las concentraciones de oxígeno se mantienen altas mientras que las concentraciones de glucosa se mantienen bajas, lo que promueve un metabolismo respiratorio que produce una considerable cantidad de biomasa y se evita la formación de etanol (Bauer & Pretorius, 2000). Debido al menor rendimiento energético de la fermentación alcohólica respecto a la oxidación de la glucosa, la producción de etanol se traduce en una reducción en el rendimiento de la producción de biomasa (Geurts et al., 1990). Altas concentraciones de oxígeno también inducen una gran producción de ácidos grasos insaturados por la levadura.

Torija et al (2003) observaron que la LSA presentaba altos porcentajes de insaturación (entre el 70% y el 80%), mientras que los ácidos grasos de cadena media no los detectaban. De hecho, solo cuatro ácidos grasos aparecían en el perfil: dos saturados: palmítico (C16) y esteárico (C18), y dos insaturados: palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1). Además, el ácido oleico suponía prácticamente el 50% de los ácidos grasos totales y el ratio UFA/SFA era mayor de 2 en todas las LSA estudiadas. Las levaduras vínicas crecen bajo condiciones fed-batch en presencia de oxígeno, contienen un reservorio de ácidos grasos insaturados y esteroides necesarios para un número limitado de generaciones que ocurren durante la fermentación del mosto de uva (Degre, 1993). Por tanto, el alto contenido de ácidos grasos insaturados en las levaduras secas podría relacionarse con buena capacidad fermentativa (Rozès et al., 1988).

Cuando la biomasa ha alcanzado el nivel deseado, las levaduras son privadas de oxígeno y carbono, lo que induce algunos mecanismos de respuesta al estrés. Esto principalmente incrementa el contenido en trehalosa intracelular y produce la acumulación de proteínas de protección al estrés. Los fabricantes de LSA cultivan sus levaduras de modo que se maximice el contenido de carbohidratos de reserva (trehalosa y glucógeno) acumulados en las células de las levaduras. Para levaduras de panadería comercial, los niveles de trehalosa son del 15-20% del peso seco, para las levaduras vínicas, los niveles van del 10-20% del peso seco en trehalosa y del 4-15% de glucógeno (Pretorius 2000, Roustan & Sablayrolles, 2002).

Para la producción de LSA se necesita un sistema de secado que es lo que ha permitido la expansión del uso de la levadura seca en la industria del vino, ya que la biomasa producida de esta forma puede mantener buenas características de vitalidad, viabilidad y capacidad fermentativa durante un año (Frey, 1957), almacenándose en condiciones adecuadas. Largos tiempos de almacenamiento pueden producir estreses de diferentes tipos, los paquetes abiertos exponen las levaduras al aire y consecuentemente al estrés oxidativo como la humedad, la cual no sería suficiente para la rehidratación pero ocasionaría efectos deletéreos por estrés oxidativo (Hansen et al., 2006). Durante el proceso, la levadura es concentrada a través de la centrifugación, después es lavada y secada. El secado definitivo se produce por contacto de la biomasa con aire caliente. Ambos, lavado y secado, crean intensos estreses, que requieren la presencia protectora de trehalosa, proteínas de estrés térmico y constituyentes específicos de membrana (Van Dijck et al., 1995, Sales et al., 2000). Aparte de la función de la trehalosa como protectora de choque térmico también se le ha atribuido una función relacionada con la

protección frente a la oxidación que se produce durante la deshidratación (Pereira et al., 2003).

Después del secado, la levadura es empaquetada en ausencia de oxígeno (al vacío) y vendida como LSA a los enólogos. En este estado de deshidratación, las células de las levaduras permanecen viables por periodos considerables sin actividad metabólica.

Aunque el proceso de propagación de biomasa de levadura para producir “starters” o iniciadores se haya optimizado tecnológicamente, no está muy bien caracterizado desde el punto de vista fisiológico y molecular de las levaduras; así como su adaptación a condiciones de crecimiento adversas. Diferentes aproximaciones para caracterizar la respuesta al estrés bajo condiciones industriales se han llevado a cabo y se han encontrado algunas correlaciones entre la resistencia al estrés de varias cepas de levaduras y su idoneidad para procesos industriales (Beudeker et al., 1990; Jamieson 1998; Ivorra et al., 1990; Aranda et al., 2002; Pérez-Torrado et al., 2002; Zuzuarregui & del Olmo 2004; Zuzuarregui et al. 2005). El estudio del comportamiento de la célula se ha visto limitado por la dificultad en controlar las condiciones experimentales del proceso a gran escala industrial y la falta de éxito en reproducir las condiciones industriales en experimentos de estrés clásicos de laboratorio. Pérez-Torrado et al. (2005) demostraron la adecuación de la simulación “bench-top” de la propagación de biomasa en combinación con una estrategia analítica basada en el uso de marcadores genéticos de estrés para definir efectos perjudiciales en el ambiente industrial variable. La inducción génica más fuerte afectó específicamente al gen que codificaba la tiorredoxina (*TRX2*). En la industria, la aireación de los tanques de fermentación se iniciaba al inicio de la fase de crecimiento batch debido a la importancia del oxígeno para la biosíntesis del ergosterol (Dimster-Denk & Rine 1996; Servouse & Karst 1986) una molécula esencial para la fluidez y permeabilidad de membrana (Parks & Casey 1995). Cuando la sacarosa empieza a ser limitante, la presencia de oxígeno permite un cambio metabólico gradual a la respiración lo que produce una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de la respuesta de estrés oxidativo. La presencia de oxígeno induce una respuesta protectora que favorece la transición metabólica. La principal respuesta a nivel transcripcional involucraba a la tiorredoxina. Una cepa vínica modificada genéticamente sobreexpresando el gen *TRX2* presentaba una capacidad fermentativa mejorada y niveles más bajos de daños celulares oxidativos que la cepa parental después de la producción de biomasa seca (Pérez-Torrado et al., 2009).

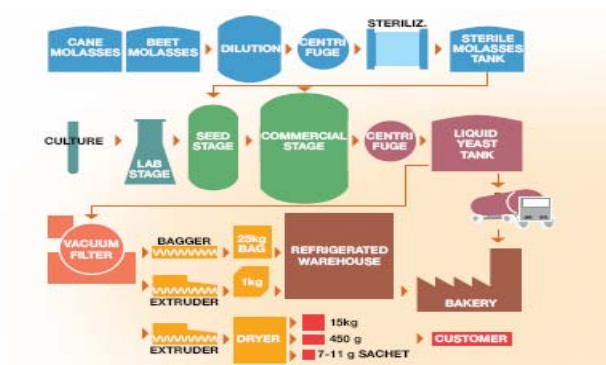


Figura 2. Esquema del proceso de producción de levadura a nivel industrial
(<http://www.lallemand.com/Home/eng/>).

2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

La mayoría de las rutas biosintéticas de los lípidos en levaduras son similares a las de los eucariotas superiores, aunque algunos pasos específicos son únicos en levaduras. Al igual que en los eucariotas pluricelulares la síntesis de los lípidos en levaduras está regulada a nivel transcripcional. Dentro de una célula no todas las membranas tienen la capacidad de sintetizar sus propios lípidos. De modo que existen procesos de migración de los lípidos de sus lugares de síntesis a las membranas celulares destino con eficientes procesos de transporte de un compartimento hidrofóbico a otro (Daum et al., 1998).

Las membranas de las levaduras están formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, cuya parte apolar está constituida por colas de ácidos grasos mientras que la parte hidrofílica (cabeza polar) está constituida por un grupo fosfato. El otro grupo importante de lípidos son los esteroides, siendo el ergosterol el principal esteroide fúngico.

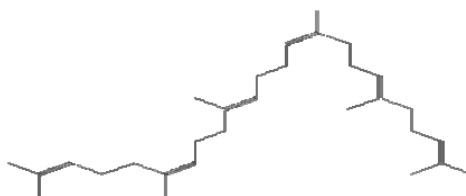
2.1. Esteroides

2.1.1. Ergosterol, principales intermediarios y esteroides exógenos.

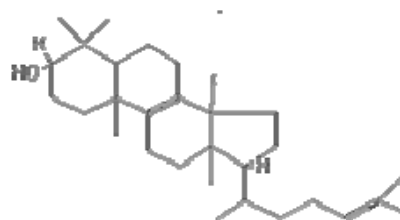
El esteroide fúngico, **ergosterol (Fig. 3)**, difiere del esteroide animal (principalmente el colesterol) por la presencia de insaturaciones en el carbono 7-8 en la estructura cíclica y en el C-22 en la cadena lateral, y por la presencia de un grupo metilo en C-24 también en la cadena lateral. Sin embargo, común a todos los esteroides es la saturación en el C-5,6 y la presencia del grupo hidroxilo en C-3.

El **ergosterol** es el principal esteroles de las levaduras y representa un 80% del total. Pero una veintena de esteroides diferentes pueden ser aislados como intermediarios de la biosíntesis de ergosterol o como productos finales acumulados en mutantes. Dicha vía consta de unas 30 reacciones catalizadas por diferentes enzimas codificados por distintos genes agrupados bajo la denominación común *ERG*. Esta ruta de síntesis posee etapas limitantes en las cuales se necesita el oxígeno molecular para poder efectuar la transformación entre dos intermediarios de la ruta. En condiciones anaerobias no se puede conseguir la síntesis de ergosterol. Como alternativa, se puede producir una asimilación de esteroides exógenos (fitoesteroides) presentes en los mostos de la uva, pero también se observa una acumulación de lanosterol y escualeno, precursores de los esteroides (Luparia et al., 2004; Beltran et al., 2005).

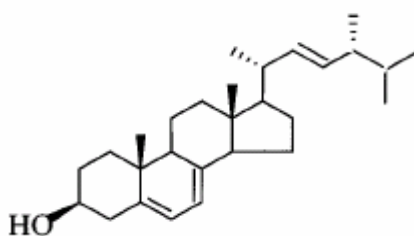
No obstante, el ergosterol no es únicamente necesario para el mantenimiento de las estructuras de membrana. Rodríguez et al. (1983), propusieron tres funciones importantes para el ergosterol en las levaduras. Una función “*sparking*”, capacidad para iniciar o mantener el crecimiento sin ser posible su sustitución por otros tipos de esteroides, una función “*dominio crítico*” que hace referencia a que sólo es requerido en regiones restringidas de la membrana y una función “*bulk*” que consiste en el mantenimiento de la estructura y fluidez óptima de membrana.



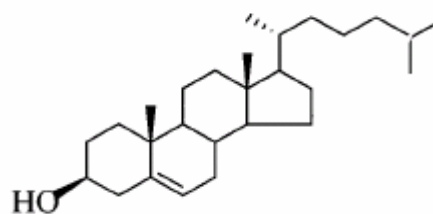
Escualeno



Lanosterol



Ergosterol



Colesterol

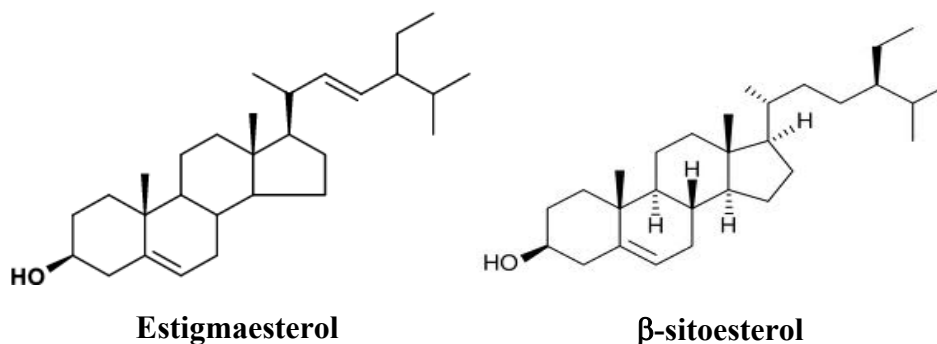


Figura 3. Estructuras del ergosterol, colesterol, lanosterol, escualeno y de los fitoesteros (estigmasterol y β-sitosterol) (Daum et al., 1998).

El **lanosterol** es otro esteroles importante en las levaduras, que puede llegar a ser muy abundante en células cultivadas en anaerobiosis. El **zimosterol** se encuentra sobre todo en los ésteres de esteroides, y el **fecosterol** y **episterol** son los esteroides minoritarios. El **escualeno** es el precursor de los esteroides y también se acumula sobre todo en las células cultivadas en anaerobiosis. El contenido medio en ergosterol de *S. cerevisiae* es del 2 al 5% (w/w) del peso seco de la célula, pero puede variar de 0.1% a 10%(w/w) (Parks, 1978).

2.1.2. Ruta de biosíntesis de los esteroides

Fase 1: Formación del mevalonato (Fig.4)

El punto de partida de la síntesis de esteroides se inicia en la mitocondria con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA. La acetoacetil-CoA reacciona con una tercera molécula de acetil-CoA para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La HMG-CoA reductasa cataliza la reducción de cuatro electrones, dependiente de NADPH, que transforma la HMG-CoA en mevalonato. Esta es la primera reacción de la síntesis de ergosterol y constituye el principal paso que regula toda la ruta.

Fase 2: Síntesis de escualeno a partir de mevalonato (Fig. 4).

Estas reacciones se producen en el citosol. En primer lugar se activa el mevalonato mediante tres fosforilaciones sucesivas. La tercera fosforilación, probablemente en la posición 3 sienta las bases para una descarboxilación a través de una eliminación *trans* para dar isopentenil pirofosfato. Una molécula de esta sustancia se isomeriza al C-5 dimetilalil-pirofosfato. Este compuesto reacciona con una segunda molécula de isopentenil-pirofosfato para dar C10

geranil-pirofosfato, y otra molécula más de isopentenil-pirofosfato reacciona con este producto para dar el C-15 farnesil pirofosfato.

La farnesil transferasa, o también denominada escualeno sintasa, se encuentra unida a las membranas del retículo endoplasmático. Esta enzima dependiente de NADPH une 2 moléculas de farnesil-pirofosfato para dar preescualeno-pirofosfato, que sufre a continuación la eliminación del pirofosfato y un reordenamiento para dar lugar a escualeno. Todas las reacciones posteriores se realizan en el retículo endoplasmático.

Fase 3: Ciclación del escualeno a lanosterol y su conversión en ergosterol (Fig. 5).

La formación de lanosterol que tiene el núcleo esterol de cuatro anillos, se produce en dos pasos y necesita la presencia de **oxígeno molecular**:

- En primer lugar una oxidasa de función mixta, escualeno monooxigenasa (*ERG1*), introduce una función epóxido en los carbonos 2 y 3.
- Después se produce una ciclación del epóxido de escualeno en lanosterol.

Una serie de 19 reacciones se suceden hasta llegar a la síntesis de ergosterol. Algunas de estas etapas catalizadas por las siguientes enzimas son limitantes a causa del requerimiento de la presencia de O₂: citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilasa (*ERG11*); la metilesterol monooxigenasa (*ERG25*), responsable de 6 reacciones de transformación entre intermediarios, y dos desaturasas: la C-5 esterol desaturasa (*ERG3*) y C-22 esterol desaturasa (*ERG5*).

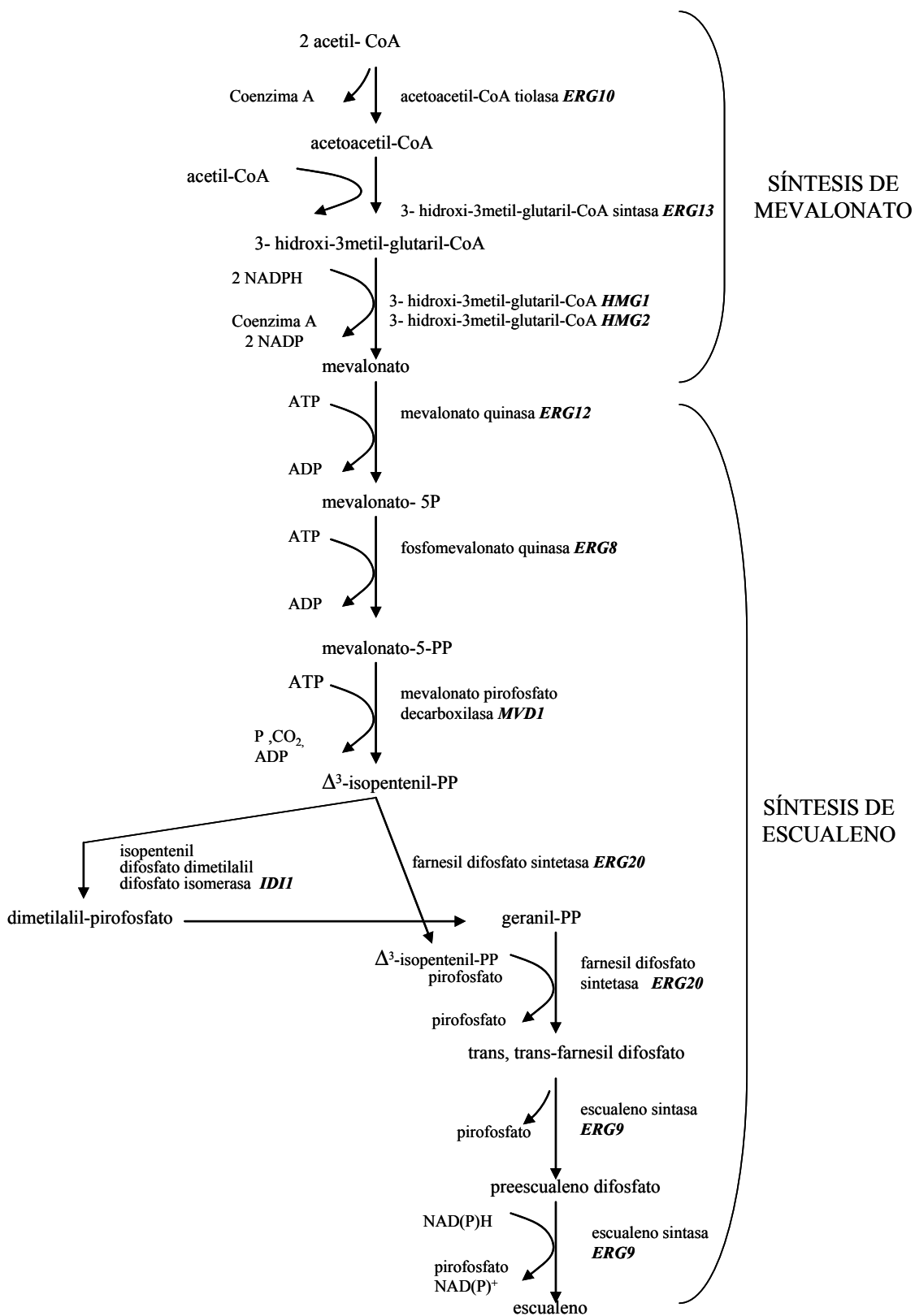


Figura 4. Síntesis de escualeno (Adaptado de SGD
 (*Saccharomyces* Genome Database) <http://www.yeastgenome.org/>).

Introducción

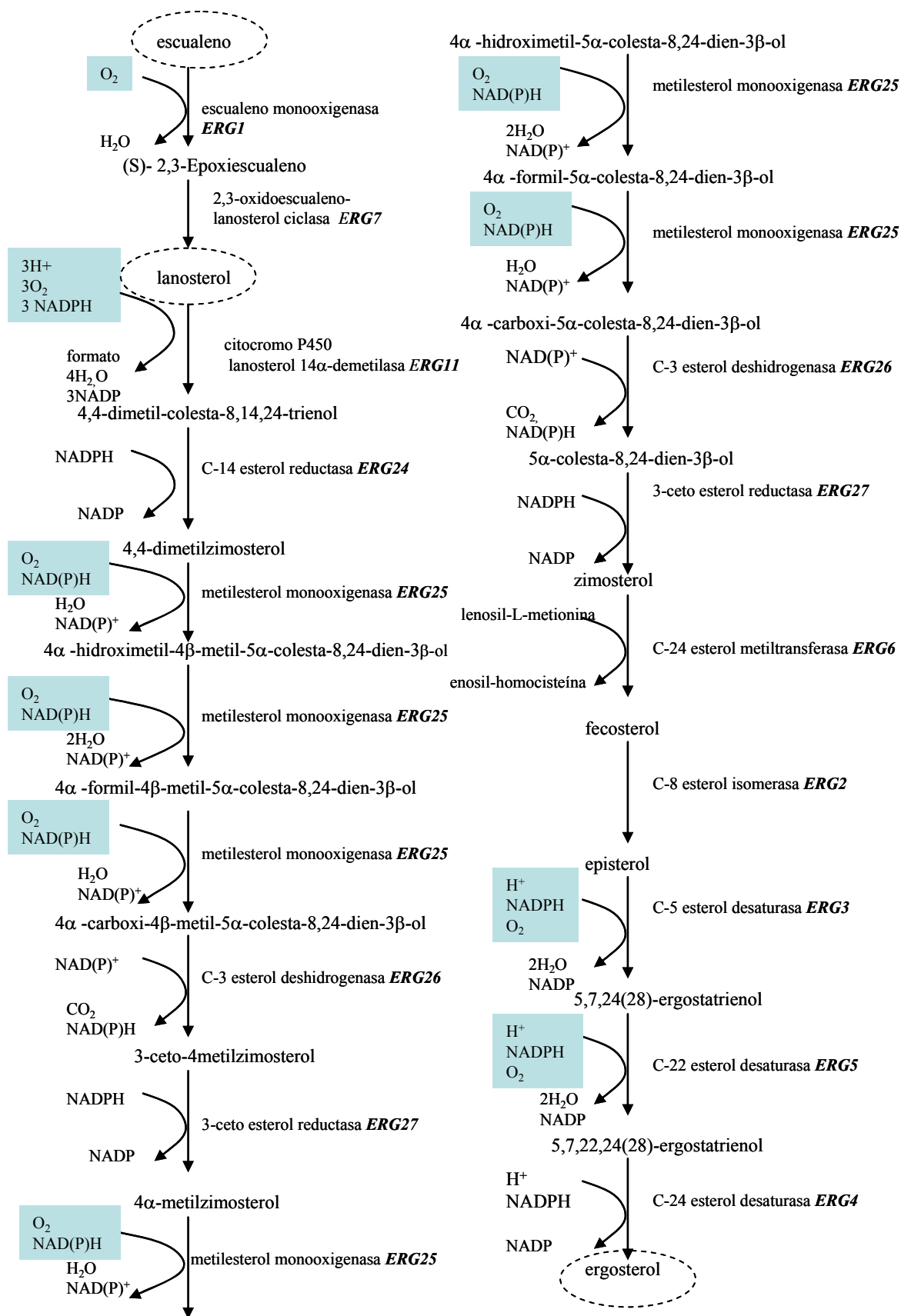


Figura 5. Síntesis de ergosterol a partir de escualeno (Adaptado de SGD (*Saccharomyces* Genome Database) <http://www.yeastgenome.org/>)

2.1.3. Funciones

Los esteroides son componentes lipídicos esenciales de las membranas eucarióticas y responsables de un alto número de características físicas de las mismas. Principalmente regulan la fluidez y permeabilidad de la membrana, la resistencia al etanol y la actividad de la ATPasa plasmática. Además también regulan el metabolismo celular aerobio, el ciclo celular y la asimilación de esteroides exógenos. El esteroide específico presente en especies eucarióticas puede variar y hay muchos estudios que usan una amplia variedad de técnicas bioquímicas y biofísicas para demostrar que los esteroides son reguladores importantes de la permeabilidad y fluidez de la membrana. Aunque otros lípidos de membrana también influyen en estas propiedades, las células eucarióticas son incapaces de mantener su viabilidad sin esteroides (Daum et al.1998).

2.1.4. Lípidos de reserva

Los triacilglicérolos (TAG) y los ésteres de esteroides (STE) son los lípidos de reserva más importantes en células eucariotas. Se encuentran esterificados por ácidos grasos, los STE principalmente por el ácido palmítico (C16:1) y el ácido oleico (C18:1), mientras que los ácidos grasos saturados como C14, C16 y C18 se incorporan solamente en proporciones menores. El ácido graso de cadena larga C26 se detectó tan solo en un 1% del total de STE (Müllner & Daum, 2004). Estos lípidos de reserva se almacenan en compartimentos específicos llamados partículas lipídicas. Estos orgánulos subcelulares contienen un núcleo hidrofóbico de STE o TAG rodeado por una monocapa de fosfolípidos. Además estas partículas contienen un set de proteínas específicas que están principalmente implicadas en el metabolismo lipídico (Athenstaedt, 1999; Brown, 2001). Su acumulación se produce después de la fase exponencial, a la entrada de la fase estacionaria, y forman un reservorio para la síntesis de membranas lipídicas en la célula. Cuando las células en fase estacionaria son transferidas a un medio fresco, los ésteres de esteroides son rápidamente hidrolizados a esteroides libres y ácidos grasos que serán utilizados para la biogénesis de las membranas. Las enzimas que permiten la movilización de los lípidos de reserva son TAG lipasas (Tgl3p) o STE hidrolasas (Yeh1p, Yeh2p) aunque la Tgl1p también presenta la capacidad de movilizar STE (Taylor & Parks, 1978; Wagner & Daum, 2005). El TAG es usado como donador de ácidos grasos para la biogénesis de membrana (Daum & Paltauf, 1980) y también para eliminar ácidos grasos muy abundantes, inusuales y tóxicos. Similares propiedades pueden atribuirse a los STE que además de su función de reserva también presentan una función de detoxificación de elevados niveles de esteroides, precursores de esteroides y ácidos grasos libres. Los ésteres de esteroides necesitan para su síntesis una esteroide-ester sintetasa (Are1p y

Introducción

Are2p), dos enzimas que solapan función ya que también catalizan la formación de TAG aunque en menor proporción. La actividad relativa de estas dos enzimas cambia en respuesta a la anaerobiosis. Are2p domina bajo condiciones aerobias y Are1p provee la mayor parte de la actividad en ausencia de oxígeno (Valachovic et al., 2001). Además estas enzimas también presentan preferencias por sustrato, Are2p prefiere como sustrato al ergosterol mientras que Are1p esterifica ergosterol y sus precursores con igual eficiencia, con una ligera preferencia por lanosterol (Wagner & Daum 2005). Los TAG son sintetizados a través de dos vías principales: la acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa (Dga1p) y la fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa (Lro1p) (Figura 6).

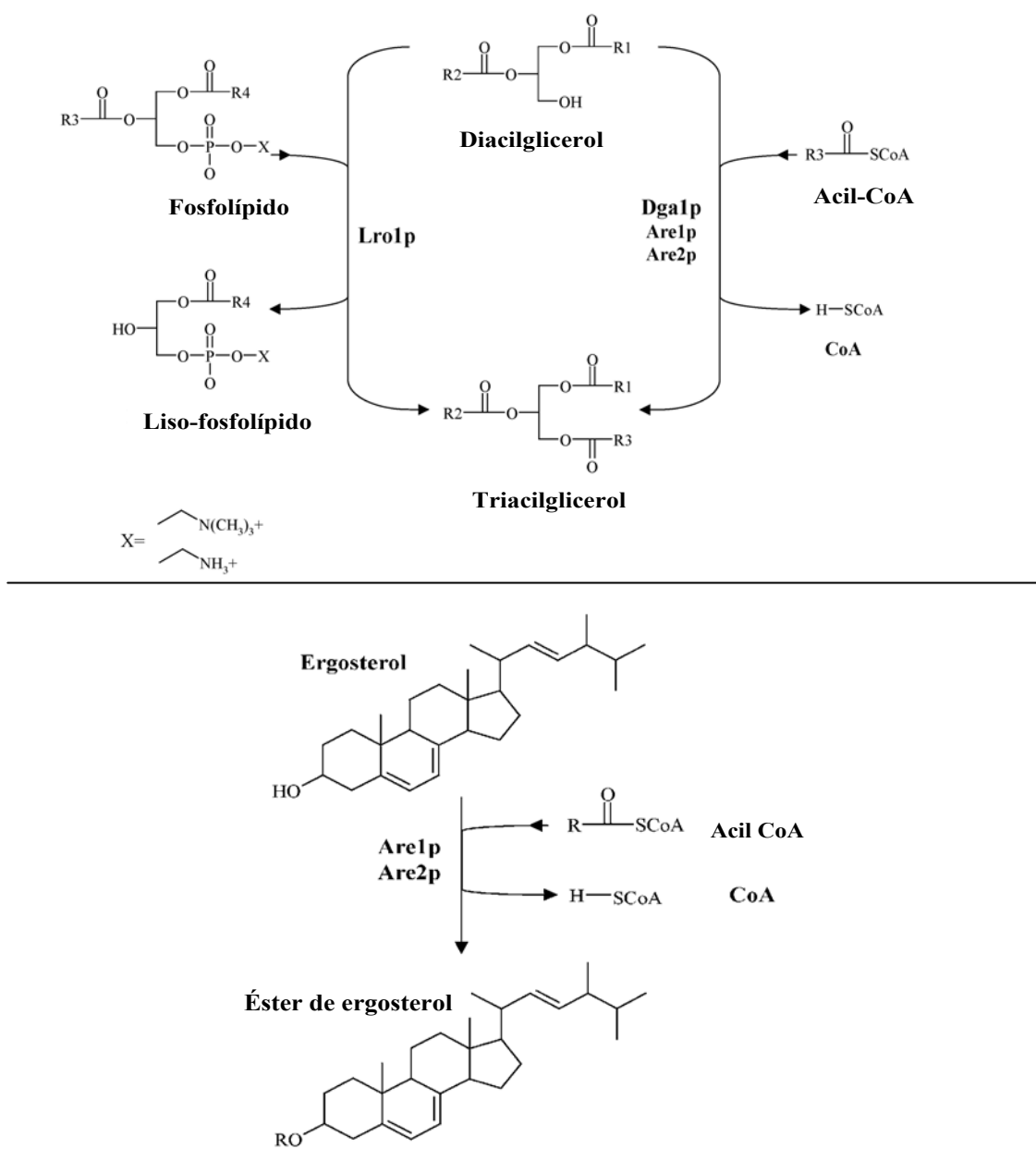


Figura 6. Síntesis de TAG y STE (Müllner & Daum, 2004).

2.2. Fosfolípidos

2.2.1. Clasificación y estructura.

Son lípidos complejos que tienen una importante actividad funcional. Junto a los esfingolípidos constituyen los lípidos polares de la membrana, que se caracterizan por contener una región hidrofílica y un dominio hidrofóbico en la misma molécula. Dependiendo de la naturaleza del alcohol primario que une ambos dominios, se agrupan bajo el nombre de **fosfolípidos** si están unidos por glicerol y **esfingolípidos** si están unidos por una esfingosina (**Fig. 7**).

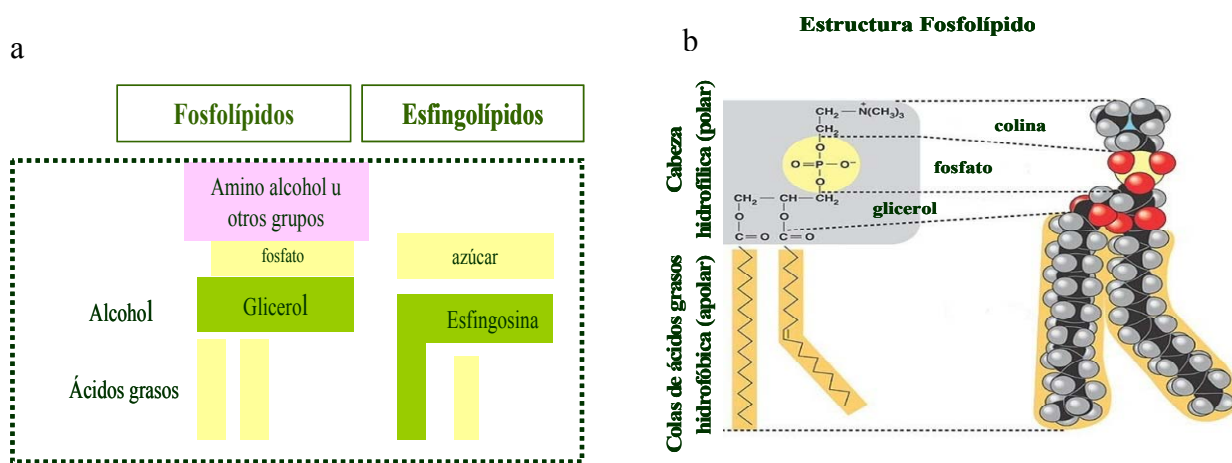
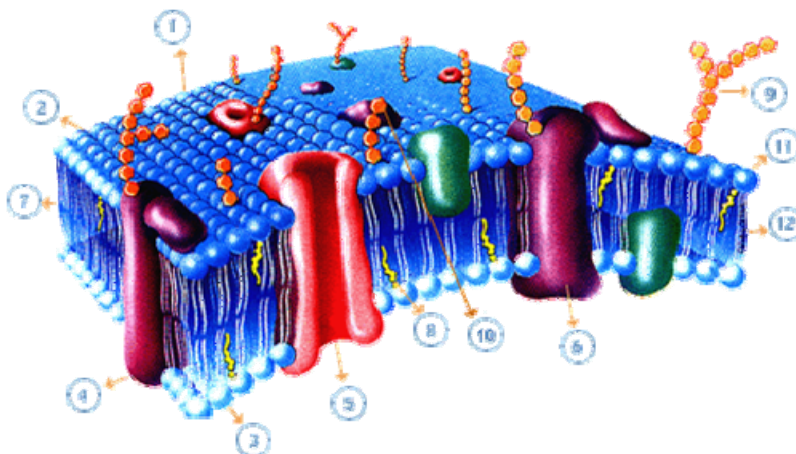


Figura 7. a) Clasificación de los fosfolípidos y esfingolípidos, b) Estructura de un fosfolípido
(Adaptados de www.biblioteca.org.ar/libros/hipertextos%20de%20biologia/fosfolip.gif)

Los fosfolípidos en la membrana se disponen en una bicapa (**Fig. 8**) con las colas **hidrófobas (ácidos grasos)** dirigidas hacia el interior de la bicapa mientras que las cabezas **hidrofílicas (grupo fosfato + aminoalcohol u otro grupo)** se orientan hacia el entorno acuoso delimitando la superficie externa e interna de la membrana. El espesor de la membrana es de alrededor de 7 nanómetros.

Introducción



- | | |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1. Bicapa de fosfolípidos | 7. Moléculas de fosfolípidos organizadas en bicapa |
| 2. Lado externo de la membrana | 8. Moléculas de ergosterol |
| 3. Lado interno de la membrana | 9. Cadenas de carbohidratos |
| 4. Proteína intrínseca de la membrana | 10. Glicolípidos |
| 5. Proteína de canal iónico de la membrana | 11. Región polar (hidrofílica) de la molécula del fosfolípido |
| 6. Glicoproteína | 12. Región hidrofóbica de la molécula del fosfolípido |

Figura 8. Relación de las diferentes moléculas en la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Adaptado de de <http://contenidos.educarex.es/cnice/biosfera/>).

Un grupo hidroxilo del fosfato se une al grupo de la cabeza polar a través del cual se clasifican los diferentes tipos de fosfolípidos (**Fig. 9**) y de ellos también dependen las propiedades físicas de las diferentes moléculas de fosfolípidos. Así, tenemos la **fosfatidiletanolamina**, en la que el segundo alcohol es **etanolamina**; o la **fosfatidilserina**, donde el grupo fosfato está sustituido por el aminoácido **serina**. El segundo alcohol puede ser asimismo otra molécula de glicerol, en cuyo caso tenemos el **fosfatidilglicerol**, cuyo -OH en sn-3 puede estar esterificado a otro residuo de ácido fosfatídico, dando lugar al difosfatidilglicerol o **cardiolípido**. Encontramos también como segundo alcohol al mio-inositol, el cual da lugar a **fosfatidilinositol** o **fosfoinosítidos**, los cuales, muy frecuentemente, aparecen fosforilados en algunos de los grupos hidroxilo del inositol. Tal es el caso del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.

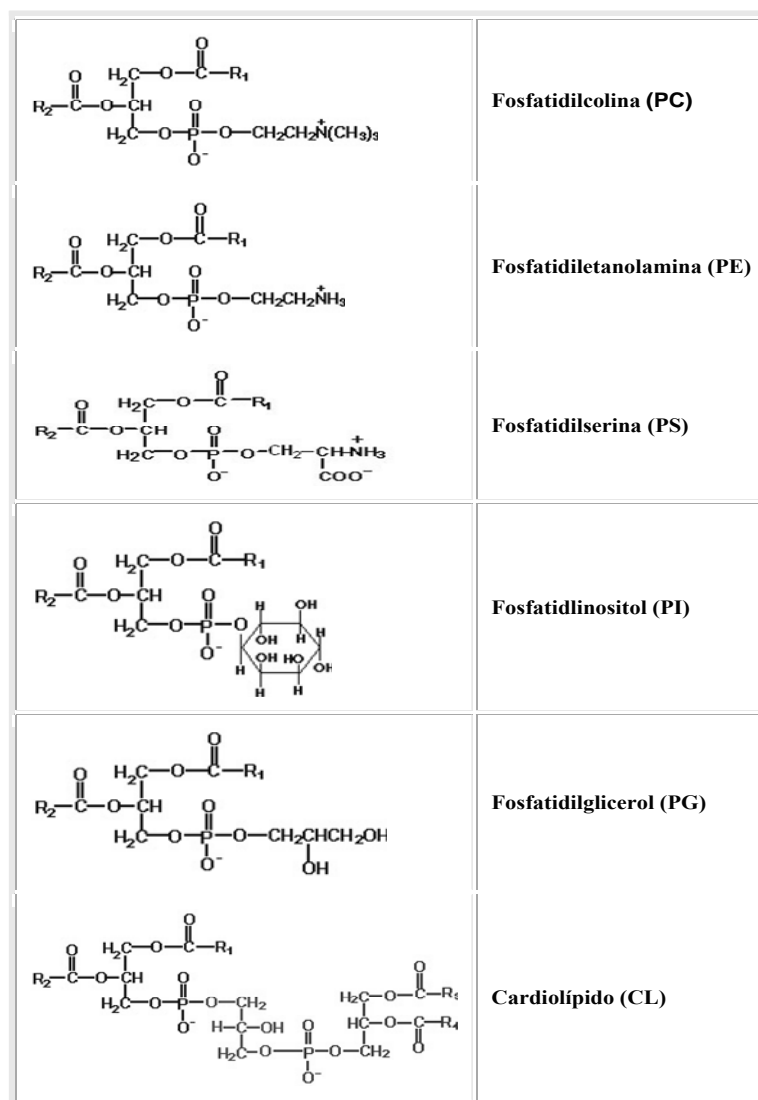


Figura 9. Estructuras de los principales fosfolípidos de la levadura.

Aproximadamente el 75% de los lípidos de membrana son fosfolípidos y los tipos más conocidos son: la **fosfatidiletanolamina**, **fosfatidilinositol**, **ácido fosfático**, **fosfatidilcolina** y **fosfatidilserina** (Fig. 9). También se puede encontrar los **cardiolípidos** en las membranas interna de las mitocondrias. La membrana plasmática presenta asimetría debido a la distribución de los fosfolípidos. La parte interna de la membrana está enriquecida en fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, y fosfatidilserina, mientras que la parte externa predominan la fosfatidilcolina y los esfingolípidos (Sharma, 2006).

2.2.2. Ácidos grasos

Estructura.

Los ácidos grasos están constituidos por una parte hidrófoba (la cadena carbonatada) y una parte hidrófila (la función carboxilo). La levadura contiene normalmente un número par de carbonos de C12 a C18, aunque ácidos grasos de cadena más corta (C6 a C10) o más larga (C20, C22, C24, C26) pueden también encontrarse algunas veces.

Saturados:	Insaturados:
C6: Ácido caproico	C14:1: Ácido miristoleico
C8: Ácido caprílico	C16:1: Ácido palmitoleico
C10: Ácido decanoico	C18:1: Ácido oleico;
C12: Ácido láurico	
C14: Ácido mirístico	
C16: Ácido palmítico	Ácidos grasos de cadena mediana (MCFA): C6 – C14
C18: Ácido esteárico	Ácidos grasos de cadena larga y saturados (SFA): C16, C18
C20: Ácido araquídico	Ácidos grasos insaturados (UFA): C14:1, C16:1, C18:1

Los ácidos grasos se encuentran bajo la forma de acil-CoA en la célula. Existen en pequeñas cantidades en estado libre pero normalmente se encuentran integrados en moléculas más complejas como ésteres etílicos, ésteres de esteroides, fosfolípidos y diacilglicerol o triacilglicerol.

Biosíntesis (Fig. 10)

1. La primera etapa de esta síntesis necesita una carboxilasa dependiente de biotina y transforma el acetil-CoA en malonil-CoA. La enzima responsable de esta reacción es la Acetil-CoA carboxilasa..
2. El sistema de elaboración de los ácidos grasos, adición secuencial de unidades de dos átomos de carbono tiene como base un complejo multienzimático constituido por dos sintetasas de ácidos grasos (*FAS I* y *FAS II*), localizadas en el citosol. En general la elongación se lleva a cabo hasta el ácido palmítico (C16) que es liberado en la célula bajo la forma de palmitil-CoA. Los intermediarios pueden ser liberados en el transcurso de la elongación (C6-C14). Mientras que los ácidos grasos de mayor longitud son sintetizados a partir del ácido palmítico por dos sistemas: uno mitocondrial y otro microsomal.

3. En la desaturación de los ácidos grasos interviene un sistema enzimático complejo (Ole1p) localizado en el retículo endoplasmático que contiene un citocromo b5 y necesita la presencia de oxígeno molecular. En *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos, esta desaturasa introduce el doble enlace en los ácidos grasos saturados acil-CoA. El ácido palmítico y el ácido esteárico dan lugar respectivamente al ácido palmitoleico y al ácido oleico. El segundo doble enlace es introducido por una desaturasa diferente que no la contienen normalmente las levaduras del género *Saccharomyces* ya que *S. cerevisiae* no sintetiza ácidos grasos poliinsaturados (Schweizer, 1984).

En los fosfolípidos, los ácidos grasos en la posición uno son mayoritariamente saturados mientras que en la posición dos son insaturados (**Fig. 7b**). La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de *S. cerevisiae* es bastante simple: el más abundante de los ácidos grasos es el C16:0 (ácido palmítico), el C16:1 (ácido palmitoleico), C18:0 (ácido esteárico) y C18:1 (ácido oleico). Menores cantidades de C14:0 (ácido mirístico) pueden ser detectadas. También se encuentra una pequeña proporción de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA), siendo el mayoritario el C26 (Schneiter et al., 1997). Este VLCFA C26 puede representar en torno al 1-2% de la composición total en ácidos grasos. La síntesis de este ácido graso es importante para mantener la estructura y función de la membrana nuclear. La cadena acílica C₂₆ es un importante componente estructural de la ceramida de los esfingolípidos y de las proteínas ancladas al GPI (glicosil fosfatidilinositol) (Sipos et al., 1997). Los lípidos de reserva como los ésteres de esteroides y los triacilgliceroides también contienen C₂₆ (Zweytick et al., 2000).

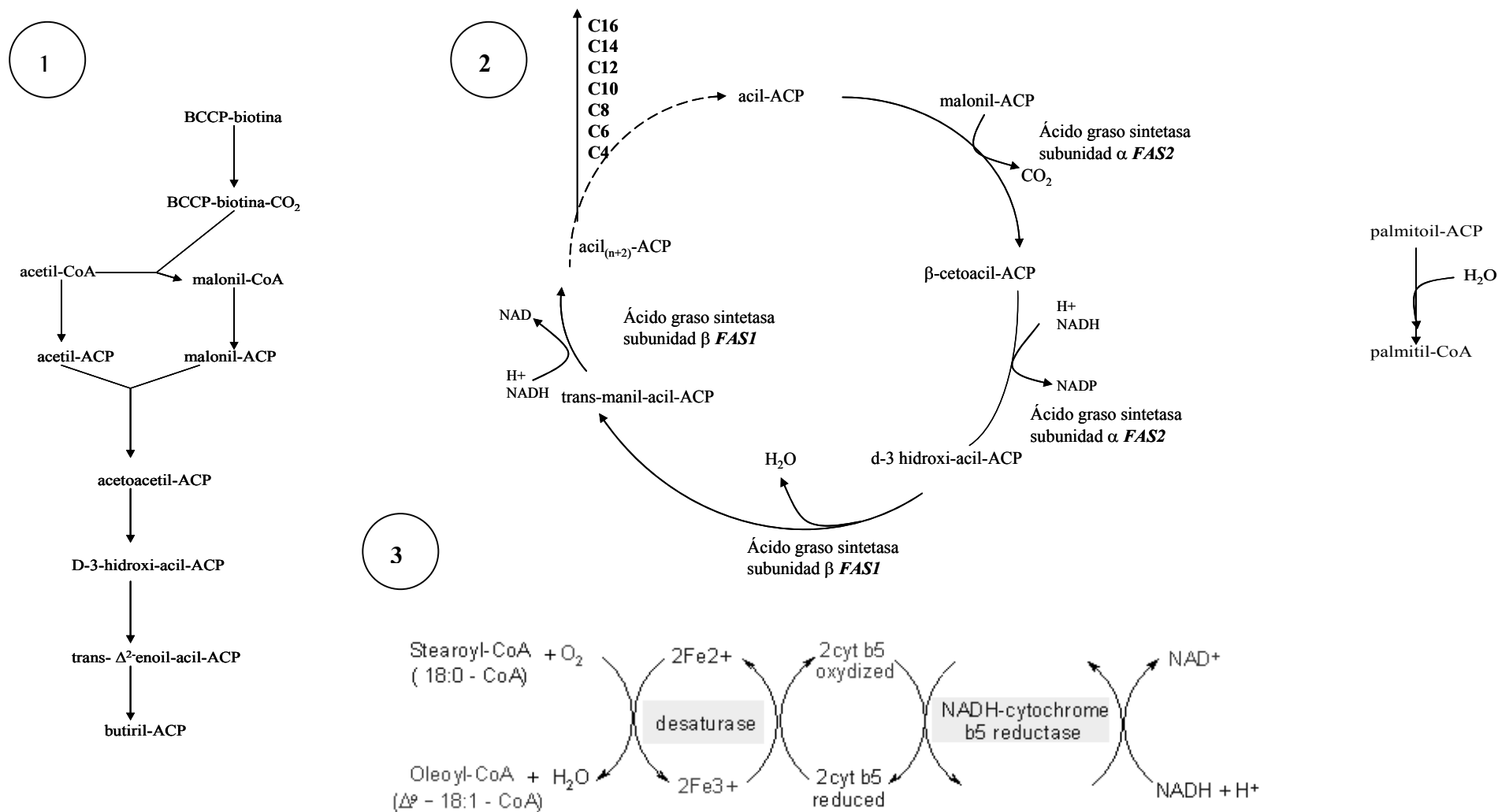


Figura 10. Biosíntesis de ácidos grasos (Adaptado de SGD (*Saccharomyces* Genome Database) <http://www.yeastgenome.org>)

2.2.3. Biosíntesis de los fosfolípidos

El retículo endoplasmático y la mitocondria son los compartimentos subcelulares que contribuyen más en la biosíntesis de los fosfolípidos en levaduras. Sin embargo en otros compartimentos como el aparato de Golgi y en las partículas lipídicas también se produce la síntesis. La biosíntesis y la migración intracelular de los fosfolípidos están muy interrelacionados. El precursor general de todos los glicerolípidos es el **ácido fosfatídico (PA)**. El primer paso de la síntesis de PA en levaduras es la acilación de glicerol-3P (G-3P) o la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), respectivamente. Por diferentes reacciones de acilación se forma el ácido lisofosfatídico LPA (1-acilglicerol-3-fosfato) que es también el producto directo de la acilación de glicerol-3P. En una segunda reacción de transferencia del grupo acilo, el **LPA** es convertido en **PA (Fig. 11)**.

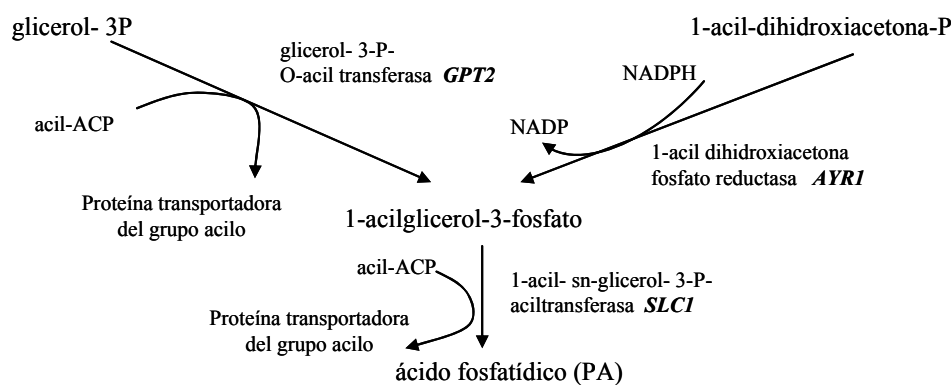


Figura 11. Síntesis del ácido fosfatídico (PA) en *S. cerevisiae* (Adaptado de SGD (*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org/>).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la mayor parte de la actividad específica de los enzimas que catalizan la acilación de G-3P se encuentra en partículas lipídicas. El metabolito central en la biosíntesis de fosfolípidos es el **CDP-diacilglicerol (CDP-DAG)**. El gen de las levaduras que codifica la CDP-DAG sintasa es el *CDS1* y se encarga de catalizar la transformación de PA en CDP-DAG a través de una reacción CTP dependiente. Este enzima tiene un papel principal en la síntesis de novo de glicerolípidos.

El **fosfatidilinositol (PI)** es un fosfolípido esencial para las levaduras debido a su papel como señalizador celular y sensor de membrana. Es sintetizado a partir de CDP-DAG y de inositol. El inositol requerido para esta reacción enzimática puede ser sintetizado endógenamente o tomado a partir del medio. El inositol endógeno libre deriva de la inositol-1-P sintasa (Ino1p)

que utiliza glucosa 1-P como precursor, mientras que la asimilación de inositol del medio es llevada a cabo por dos transportadores Itr1p y Itr2p.

La **fosfatidilserina (PS)** es un componente minoritario de los fosfolípidos totales de la célula, pero se trata de un intermediario importante de la *síntesis de novo* de dos fosfolípidos principales de las levaduras como son **fosfatidiletanolamina (PE)** y **fosfatidilcolina (PC)**. La actividad fosfatidilserina sintasa está codificada por el gen *CHO1/(PSS1)* y forman PS a partir de CDP-DAG y serina. La ruta mayoritaria de la síntesis de **PE** en levaduras es la *síntesis de novo* (**Fig. 13**) a través de la descarboxilación de **PS**. La mayor parte de esta actividad se encuentra en la mitocondria catalizada por la enzima Psd1p. La descarboxilación de **PS** ocurre o bien por la fosfatidilserina descarboxilasa-1 (*PSD1*) en la membrana mitocondrial interna o por la fosfatidilserina descarboxilasa-2 (*PSD2*) en el aparato de Golgi o el compartimento vacuolar. Existe una ruta alternativa para la síntesis de (**PE**) en levaduras a través de la **ruta de Kennedy** descrita por Kennedy y Weis, (1956) (**Fig. 12**). Esta ruta la utilizan las levaduras cuando son incapaces de sintetizar PS o por falta de la actividad fosfatidilserina descarboxilasa. La síntesis de **PE** por esta ruta se realiza a partir de **etanolamina libre** aportada por procesos lipolíticos endógenos o importada al interior de la célula a partir de fuentes exógenas a través de transportadores. El primer paso de la ruta de Kennedy consiste en una fosforilación de la etanolamina por la etanolamina quinasa-1 (*EK1*). La etanolamina fosfato es convertida por la etanolamina-fosfatocitidiltransferasa (*ECT1/MUQ1*) a CDP-etanolamina y a continuación incorporada a PE reaccionando con diacilglicerol.

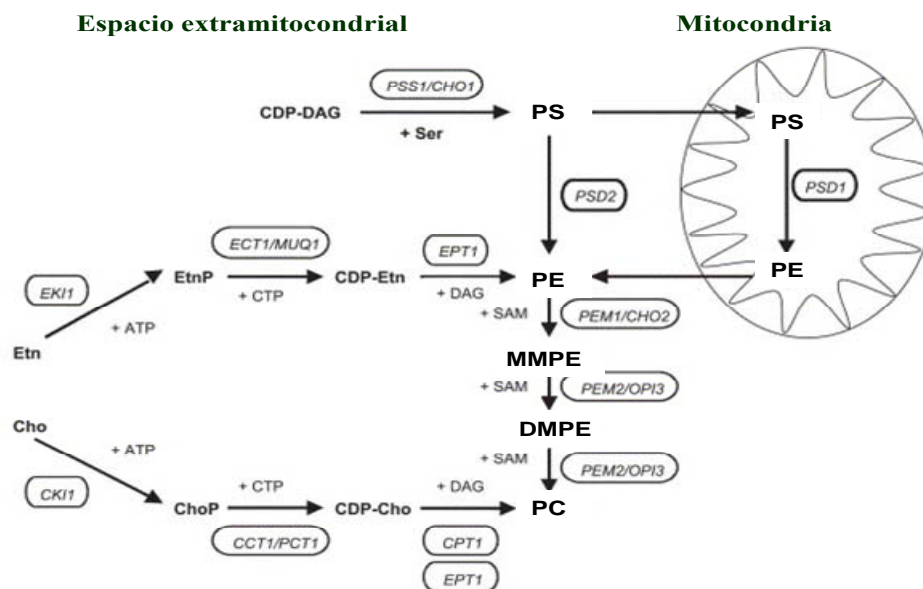


Figura 12. Ruta de Kennedy (PS: fosfatidilserina, PE: fosfatidiletanolamina, MMPE: metil fosfatidiletanolamina, DMPE: dimetil fosfatidiletanolamina, PC: fosfatidilcolina, Etn: etanolamina, Cho: colina, EtnP: etanolamina P, ChoP: colina P, DAG: diacilglicerol) (Bürgermeister et al., 2004).

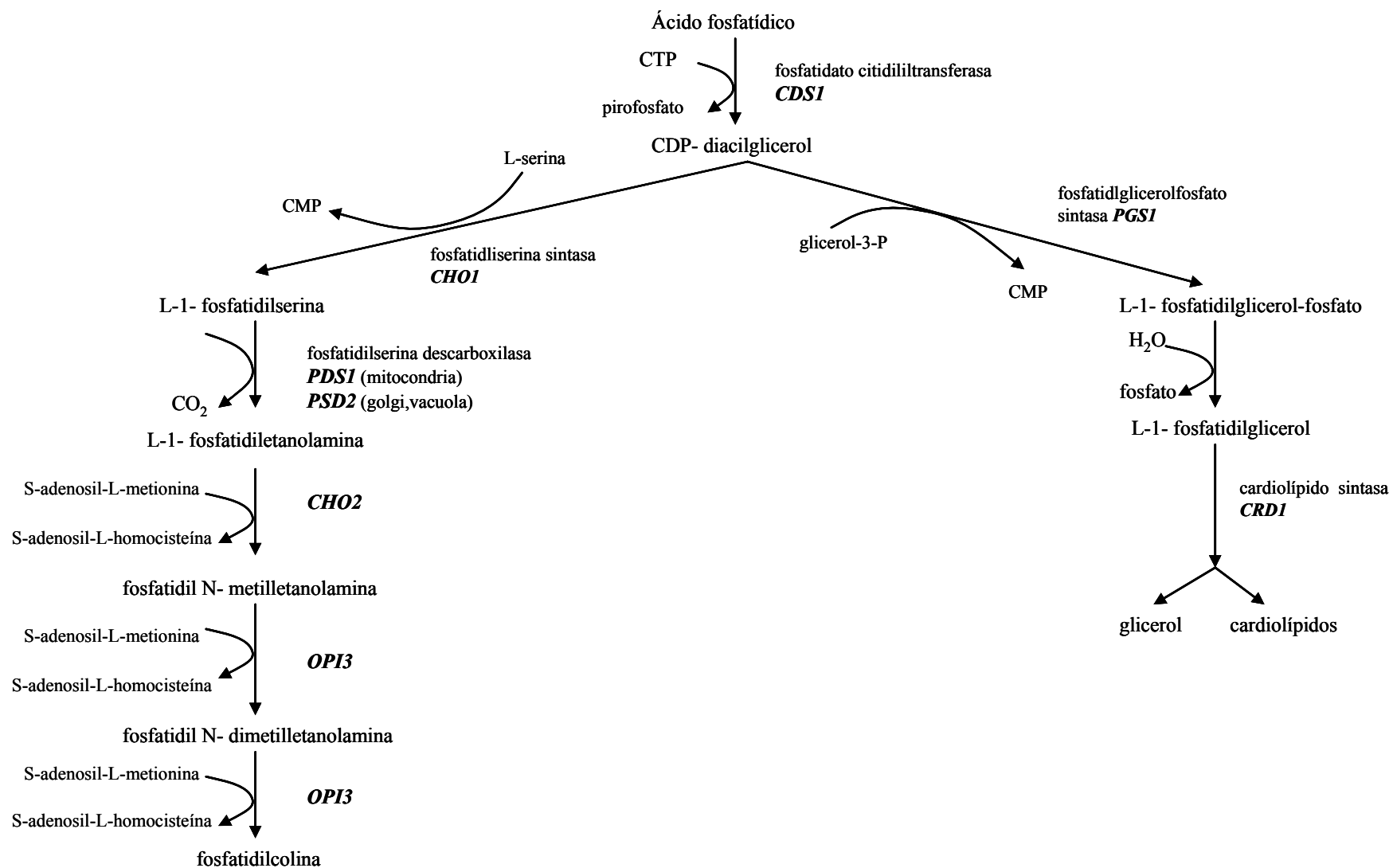


Figura 13. Síntesis de novo de la fosfatidilcolina (PC) y de la cardiolípidos (CL) en *S. cerevisiae*.

(Adaptado de SGD (*Saccharomyces* Genome Database) <http://www.yeastgenome.org>)

De forma similar a la utilización de **etanolamina libre**, las células de las levaduras también pueden incorporar colina a **PC** a través de la ruta de Kennedy. Esta ruta no es solamente activa en presencia de colina exógena sino que también funciona continuamente para reciclar productos de degradación de **PC**. La CDP-colina es un intermediario de esta ruta que se sintetiza tras las reacciones catalizadas por tres enzimas: colina quinasa (*CKII*), colina-fosfato citidililtransferasa (*CCTI/PCTI*) y la 1,2-diacilglicerol colina-fosfatotransferasa (*CPTI*) (**Fig. 12**). Esta ruta de síntesis de la **PC** requiere la presencia de colina libre, la cual puede obtenerse a través de fuentes exógenas o como resultado de la acción de la **fosfolipasa D** que hidroliza la fosfatidilcolina.

En ausencia de colina exógena, la **PC** es sintetizada principalmente por tres pasos de metilación de la **PE**. Estas reacciones están catalizadas por dos metiltransferasas independientes: fosfatidiletanolamina metiltransferasa (*CHO2/PEM1*) y una metiltransferasa de fosfolípidos (*OPI3/PEM2*), que están localizadas en el retículo endoplasmático (**Figs. 12 y 13**).

El **fosfatidilglicerol (PG)** (**Fig. 13**) es un fosfolípido minoritario de las membranas subcelulares de las levaduras. Los **cardiolípidos (CL)** forman un 10-15% de los fosfolípidos mitocondriales, especialmente cuando la mitocondria está totalmente desarrollada ante la presencia de fuentes de carbono no fermentables. El fosfatidilglicerol-fosfato (**PG-P**) es sintetizado a partir del CDP-DAG y el glicerol-3-P por la acción de la fosfatidilglicerolfosfato sintasa. La siguiente reacción en la síntesis de cardiolípidos es la defosforilación de **PG-P** a **PG**. El último paso en la secuencia biosintética de los cardiolípidos es la reacción de **PG** con una segunda molécula de CDP-DAG a través de la catálisis realizada por CL sintasa. El gen que codifica la CL sintasa es el *CRDI*.

2.2.4. Reciclaje de los fosfolípidos

Las membranas de las células contienen diferentes tipos de fosfolípidos de una forma equilibrada, cada uno con una cierta composición acídica (en ácidos grasos). Esta composición es importante para las propiedades físicas de la membrana, como la fluidez, la cual puede verse alterada por variaciones en determinadas propiedades ambientales (Aguilar et al, 2006; Martin et al, 2007; Falcone et al, 2004). Las células entonces necesitan ser capaces de adaptarse a esos cambios adaptando su composición de membrana. En este proceso existen fosfolípidos que son desacilados y reacilados en el llamado **ciclo de Lands** (Lands, 2000)

(Fig. 14). Estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que la síntesis de fosfolípidos y su reciclaje están integrados, pero el metabolismo de la fosfatidilcolina, en particular, tiene una función central en la regulación de toda la red metabólica.

Los glicerofosfodiésteres se producen por la desacilación completa de los fosfolípidos. Un importante glicerofosfodiéster es la glicerofosfocolina (GPC), que se acumula en las células de levadura en respuesta a las altas temperaturas (Dowd et al, 2001) o por estrés osmótico (Kiewietdejonge et al, 2006). La PC puede ser hidrolizada por las **fosfolipasas B (A₁ y A₂) o A₁ o A₂** produciendo glicerofosfocolina (GPC) y ácidos grasos libres. La GPC también es excretada de la célula de levadura por un proceso que es dependiente de tres fosfolipasas B, Plb1p, Plb2p y Plb3p (Patton et al, 1995; Patton, 2007; Merkel et al, 2005). La completa desacilación de la fosfatidilcolina (PC) a GPC también puede ser catalizada por Nte1p, una esterasa de levadura que se activa por estrés a causa de las altas temperaturas (Zaccheo et al, 2004; Fernandez-Murray et al, 2005). La GPC extracelular puede ser captada por el transportador Git1p y luego ser usada como una fuente de fosfato. Gde1p se trata de una glicerofosfodiesterasa que, escinde la GPC en glicerol-3 fosfato (G3P) y colina (Almaguer et al, 2003; Fisher et al, 2006). La reutilización intracelular de GPC como fuente de colina también es dependiente parcialmente de Gde1p (Fernández-Murray et al, 2005). Los primeros estudios sobre este tema sugerían que el glicerol-3-fosfato (G3P) es el principal acil aceptor para la *síntesis de novo* de lípidos en células eucariotas (Kornberg et al, 1953). Más recientemente, se aislaron y clonaron dos genes de levaduras que codifican para el enzima G3P aciltransferasa (GPAT), *GPT2* y *SCT1*, que eran capaces de utilizar la G3P y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) como aceptores de grupos acilo (Zheng et al, 2001) y así poder empezar la *síntesis de novo* a partir del ácido fosfatídico (PA).

La posibilidad de que la glicerofosfocolina (GPC) pudiera actuar como un grupo aceptor se estudió en experimentos con marcaje in vivo pero se obtuvieron resultados negativos, por lo que se asumió la falta de capacidad de acilación de la GPC por parte de las células eucariotas. El reciclaje de fosfolípidos se pensaba que sólo constaba de la escisión de GPC en G3P y colina, seguido de la síntesis de novo de PC a partir de estas fuentes. Sin embargo, en un trabajo posterior, se vio que la GPC puede ser reciclada en una reacción dependiente de acil-CoA en las membranas microsomales de las levaduras. La lisofosfatidilcolina (LPC) que se forma en esta reacción se acila a fosfatidilcolina (PC) por los microsomas de las levaduras dando lugar a una nueva ruta para la biosíntesis de la fosfatidilcolina que puede reciclarse

endógenamente generando GPC o utilizando GPC externa. Pruebas genéticas y bioquímicas sugieren que esta nueva actividad enzimática llamada GPC aciltransferasa (GPCAT) se trata de una enzima nueva que no se conocía previamente en levaduras (Stålberg et al., 2008). Al igual que con el reciclaje de la GPC por la enzima GPCAT también existe un reciclaje interno paralelo de la glicerofosfoetanolamina (GPE) por la enzima glicerofosfoetanolamina aciltransferasa (GPEAT) (Fig. 14).

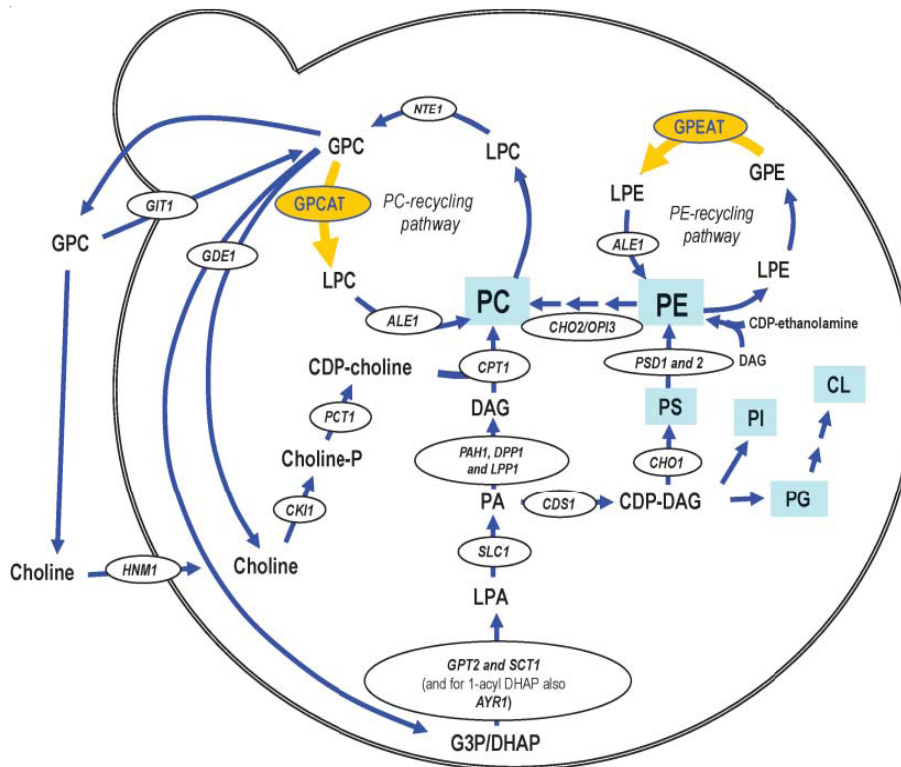


Figura 14. Principales rutas de la biosíntesis de los fosfolípidos en levaduras, incluyendo el reciclaje de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y las actividades de la glicerofosfocolina aciltransferasa (GPCAT) y la glicerofosfoetanolamina aciltransferasa (GPEAT) (Stålberg et al., 2008).

2.2.5. Funciones de los fosfolípidos

Aparte de la función estructural que tienen los fosfolípidos en las membranas, pueden desarrollar, a través de la acción de las fosfolipasas, un papel de segundo mensajero en la regulación de diversos procesos celulares (Fig. 15). Así las fosfolipasas tienen un papel importante modificando constantemente los lípidos y sobre todo los fosfolípidos de las membranas.

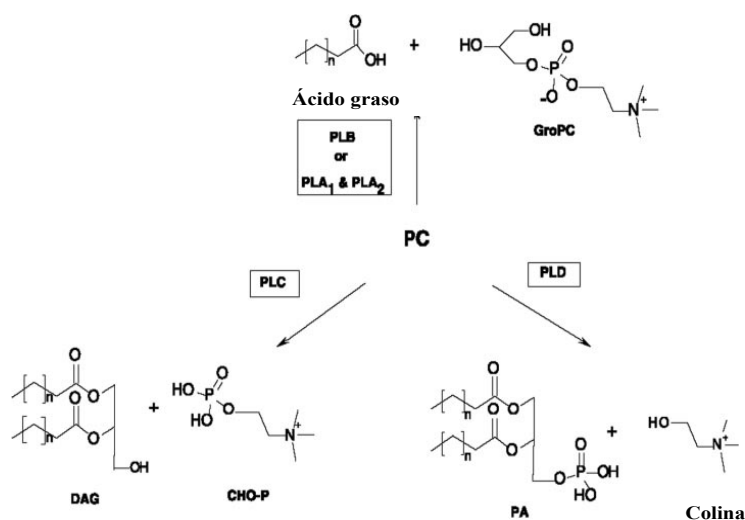


Figura 15. Productos obtenidos tras la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) (Dowd et al., 2001).

Los productos de la hidrólisis de las fosfolipasas son los siguientes (**Fig.15**):

- **Fosfolipasa A₁ (PLA₁):** lisofosfatidil (colina, inositol, serina o etanolamina) y ácido graso saturado.
- **Fosfolipasa A₂ (PLA₂):** lisofosfatidil (colina, inositol, serina o etanolamina) y ácido graso insaturado.
- **Fosfolipasa C (PLC):** diacilglicerol (DAG) y fosfocolina, fosfoinositol, fosfoserina o fosfoetanolamina.
- **Fosfolipasa D (PLD):** ácido fosfatídico (PA) y colina o inositol o serina o etanolamina.

Los productos finales de la hidrólisis de PI frecuentemente aparecen fosforilados en algunos de los grupos hidroxilo del inositol. Tal es el caso del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato. Al ser atacado por la **fosfolipasa C** libre, por una parte, un **diacilglicerol** y por otra, **inositol-1, 4, 5 trifosfato** (IP3): los cuales son importantes mensajeros químicos intracelulares. El primero activa a la **proteína quinasa C** (enzima que modifica otras proteínas, mediante fosforilación, activándolas o desactivándolas), y el segundo estimula la liberación de iones Ca^{++} a partir de los reservorios del retículo endoplasmático. En la **figura 16** se puede observar el mecanismo general de activación de las fosfolipasas (*PLC* y *PLD*) en células humanas.

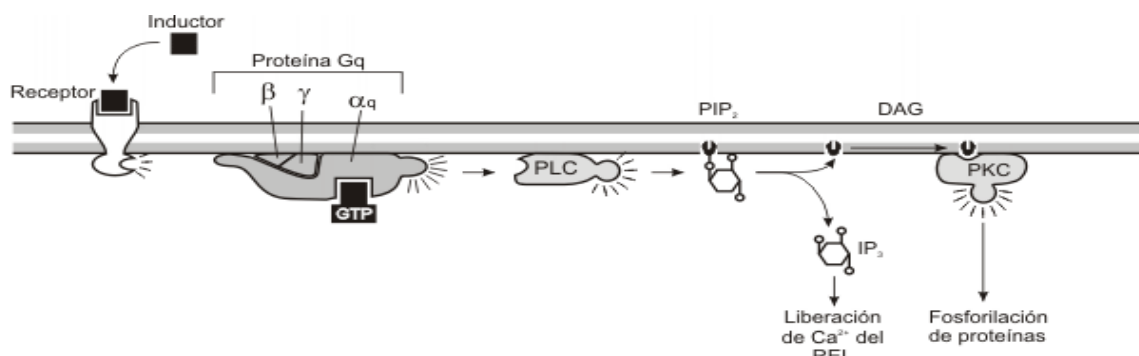


Fig.16. Secuencia de reacciones producidas a partir de la unión de la sustancia inductora con un receptor de membrana que activa a la proteína G, vía PLC (Scott JD & Pawson T, 2000).

En este caso de inducción, el receptor de membrana, transmite la información a través de la membrana plasmática, hacia el interior de la célula, por medio de una proteína transductora, la **proteína G**. Las proteínas G poseen tres subunidades, alfa, beta y gamma. La subunidad alfa puede unir GTP y también puede degradarlo (actividad GTPasa). El dímero beta-gamma mantiene a la proteína G unida a la membrana. Estas proteínas G, solo pueden activarse cuando unen guanosín trifosfato (**GTP**). Por lo tanto, la interacción del receptor unido al ligando provoca la activación de la proteína G y su unión al GTP. La proteína G activada, provoca la activación de una enzima amplificadora, una fosfolipasa (**PLC**). Esta enzima convierte las moléculas precursoras ricas en fosfato en los segundos mensajeros. La enzima amplificadora **fosfolipasa C** corta el fosfolípido de membrana 4,5-difosfato fosfatidil inositol (**PIP₂**) en diacilglicerol (**DAG**) e inositol trifosfato (**IP₃**). Como la proteína G también tiene actividad GTPasa, pasado un tiempo, la misma proteína G se desactiva, terminando con la señal. En el estado inactivo la proteína G esta unida a GDP (Scott et al., 2000). Muchos tipos de proteínas efectoras pueden ser activadas por las proteínas G, como los canales iónicos, adenil ciclasa (que convierte el ATP en AMPc), las fosfolipasas C y A₂, y la fosfodiesterasa.

2.3. Esfingolípidos

2.3.1. Estructura

Los esfingolípidos que contienen la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son los **IPC** (inositolfosforilceramidas), **MIPCs** (manosil-inositolfosfoceramidas) y **M(IP)₂C** (manosil-diinositolfosfoceramida) (Dickson et al., 2006) (**Fig. 18**). Su esqueleto está constituido por la esfingosina o una base relacionada (**Fig. 17**). Estos esfingolípidos son muy abundantes en las membranas de células animales y vegetales, particularmente abundantes en el tejido nervioso y cerebral. Todos los esfingolípidos tienen en su estructura: una molécula de ácido graso, una molécula de esfingosina o de uno de sus derivados y un

grupo de cabeza polar (en algunos esfingolípidos muy complejo). En mamíferos las bases principales de los esfingolípidos son la **esfingosina** (forma insaturada) que se diferencia de la **dihidroesfingosina** (forma saturada) por la presencia de un doble enlace en su estructura química. En plantas superiores y levaduras la base principal es la **fitoesfingosina**, sintetizada a partir de la dihidroesfingosina por la enzima dihidroesfingosina C4-hidroxilasa (*SYR2*).

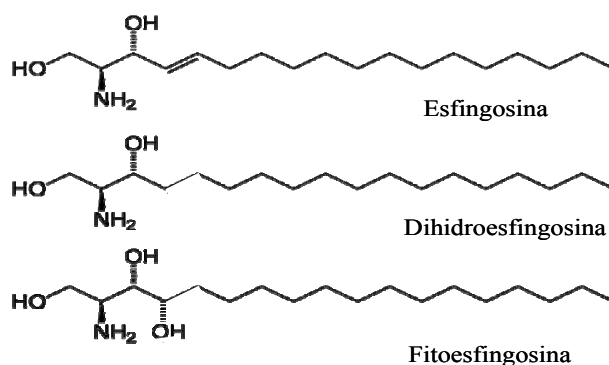


Figura 17. Estructura de las principales bases de los esfingolípidos.

La unión de la **esfingosina** a través de un enlace amida a un ácido graso saturado de cadena larga o a un ácido graso monoinsaturado da lugar a la **ceramida**. Al grupo hidroxilo 1 de la ceramida se unen diversos grupos de cabeza polar dando lugar a los diferentes esfingolípidos. Entre los precursores de los esfingolípidos, la ceramida es la molécula central.

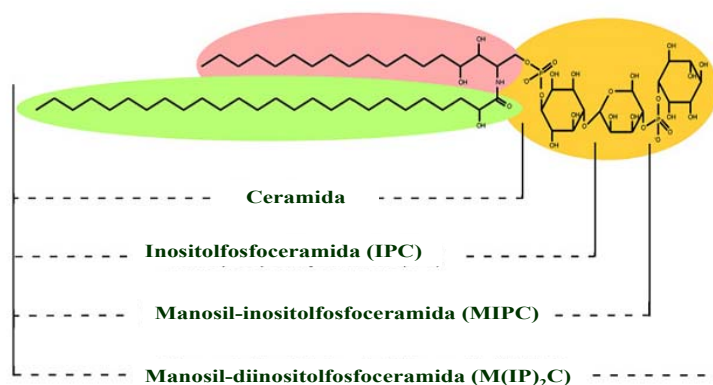


Figura 18. Estructura de la esfingosina y de los principales esfingolípidos de las levaduras. La esfingosina está marcada en rosa, el enlace amida con un ácido graso de cadena larga en verde mientras que la cabeza hidrofílica en naranja. Aparecen indicados los tres principales esfingolípidos inositolfosfoceramida (IPC), manosil-inositolfosfoceramida (MIPC) y manosil-diinositolfosfoceramida (M(IP)₂C) (Toulmay et al., 2007).

2.3.2. Biosíntesis de los esfingolípidos

La ceramida es sintetizada principalmente por la reacción entre un ácido graso acil-CoA con una base esfingoidea por una ceramida sintasa acil-CoA-dependiente. Al contrario que en los humanos, las levaduras solamente sintetizan esfingolípidos que contienen ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) como por ejemplo C26 y menores cantidades de C24, C22, C22:1, C20, C20:1, pero no ácidos grasos de cadena larga como el C18 y C16 (Smith et al., 1974; Oh et al., 1997). La síntesis de la cadena acílica ocurre por la elongación de ácidos grasos saturados de cadena larga (C16/C18), reacción que requiere de un complejo de elongación de cadena acílica asociada al retículo endoplasmático. *ELO2* y *ELO3* codifican dos componentes de este complejo que se encargan de catalizar la reacción de condensación del ciclo de elongación con especificidades de sustrato diferentes (Oh et al., 1997). *Elo2p* elonga C16/C18 a C22/24 y *Elo3p* se requiere específicamente para el paso final de elongación de C22/C24 a C26. Las células con mutaciones en *ELO3* son viables pero sintetizan ceramida y esfingolípidos con C22 y C24 en lugar de C26. La síntesis de ceramidas y esfingolípidos en mamíferos y en levaduras está confinada en la membrana del retículo endoplasmático. Tras el transporte al aparato de Golgi ocurre la subsiguiente maduración de ceramida a esfingolípidos (Levine et al., 2000; Funato & Riezman, 2001). Del 80 al 100% de los esfingolípidos maduros son luego transportados a la membrana plasmática constituyendo sobre un 30% del contenido total de fosfolípidos de la membrana plasmática (Patton & Lester, 1991; Hechtberger et al., 1994)).

Los esfingolípidos de las levaduras contienen PHS (fitoesfingosina) y pequeñas cantidades de DHS (dihidroesfingosina) pero no esfingosina. La **dihidroesfingosina** y la **fitoesfingosina (LCBs)** son nitrógeno aciladas por la **ceramida sintasa** (*LAG1*, *LAC1*, *LIP1*) o fosforilados por **Lcb4p** y **Lcb5p quinasas (Fig. 19)**. *Lag1p* y *Lac1p* son proteínas transmembrana del retículo endoplasmático identificadas como componentes esenciales de la ceramida sintasa dependiente de acil-CoA mientras que la *Lip1p* se trata de otra subunidad del mismo enzima (Guillas et al., 2001; Schorling et al, 2001, Vallée et Riezman, 2005).

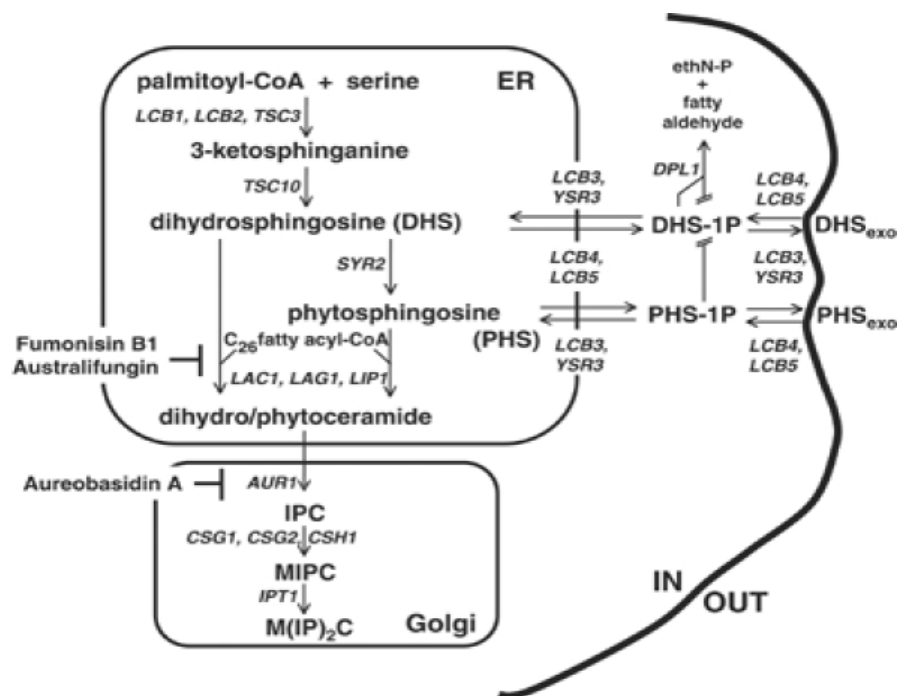


Figura 19. Ruta de síntesis de los esfingolípidos en levaduras (Vallée et al., 2005).

Los tres esfingolípidos complejos encontrados en levaduras (IPC, MIPC y M(IP)₂C) pueden diferir de su estado de hidroxilación, pudiéndose obtener hasta 15 posibles esfingolípidos complejos (Dickson et al., 1998). El IPC se transforma en MIPC gracias a la ayuda de la MIPC sintasa (*CSG1*) y de la M(IP)₂C sintasa (*IPT1*). En *S. cerevisiae* el metabolismo de los esfingolípidos y su regulación está coordinado con el metabolismo de los fosfolípidos y de los esteroides (Wu et al. 1998). Se ha visto que la función del gen *AUR1* es esencial cuando la célula es incapaz de esterificar esteroides y se piensa que este gen tiene una doble función regulando tanto el metabolismo y el transporte de los esfingolípidos como el de los esteroides. En la ruta metabólica de los esfingolípidos *AUR1* es transportador de ceramida entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Swain et al., 2002). Los LCBPs (dihidroesfingosina y fitoesfingosina fosforiladas) pueden ser hidrolizados por la **Dpl1p liasa** formando etanolamina 1-P y palmitaldehído. Los LCBPs también pueden ser desfosforilados por las fosfatasas (*LCB3*, *YSR3*). La actividad ceramida sintasa es sensible a inhibidores naturales como la australifungina y la fumonisina B1.

2.3.3. Funciones

Recientemente los esfingolípidos y sus precursores han despertado gran interés debido a sus funciones como señalizadores celulares, respuesta al estrés térmico, homeostasis del calcio, y también se ha visto que están implicados en la formación de microdominios de membrana

especializados (RAFTS: asociaciones de esfingolípidos, ergosterol y determinadas proteínas.) (Simons & Vaz, 2004; Hancock, 2006) (**Fig. 20**). Los esfingolípidos también tienen funciones asociadas al transporte a través de membrana, influyendo sobre dianas intracelulares de proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol y regulando la endocitosis (Dickson, 1998, Dickson & Lester, 2002, Merrill 2002; Futerman & Hannun, 2004). Estructuralmente crítica para el crecimiento celular, la ceramida también media diferentes procesos celulares como la apoptosis, la parada de crecimiento, endocitosis y la respuesta al estrés (Perry & Hannun, 1998; Hannun & Lubertoo; 2000; Hannun & Obeid, 2002; Archarya et al, 2003).

Los esfingolípidos junto a los esteroides tienen una importante función de reducir la permeabilidad de la parte externa de la membrana con el objetivo de proteger a la célula contra condiciones ambientales hostiles. Los esteroides presentan una alta afinidad por los lípidos que contienen cadenas acílicas saturadas, particularmente ceramida (Sankaram & Thompson, 1990; Schroeder et al., 1994). Restringen la movilidad de la cadena de ácidos grasos en la ceramida, e inducen la formación de dominios o rafts lipídicos ordenados que son resistentes a la solubilidad por detergentes (Brown & London, 2000; Rietveld & Simons, 1998). Existen evidencias claras que apoyan el modelo de la membrana plasmática de las células eucariotas distribuido en dominios o RAFTS. Los RAFTS participan en numerosos procesos celulares como la generación de gradientes lipídicos en la ruta de secreción (Simmons & Ikonen, 1997), procesos de transducción de señal (Simons & Toomre, 2000), clasificación de proteínas y lípidos, tráfico de membrana (Schuck and Simons, 2004), entrada celular de toxinas, virus y en la replicación de virus (Brügger et al., 2006).

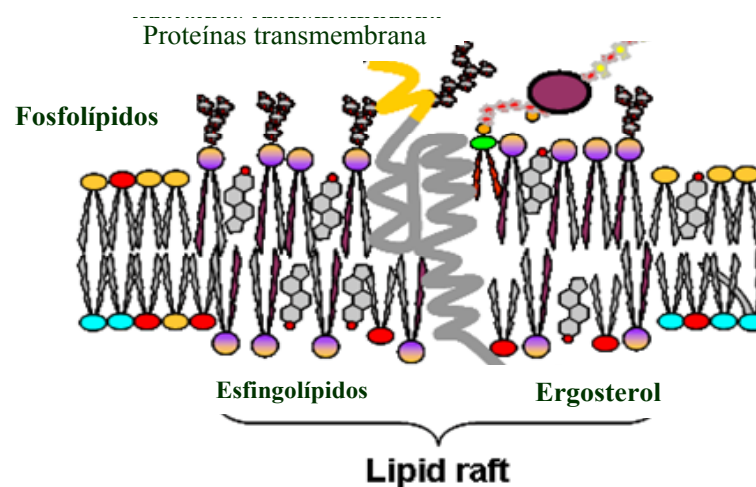


Figura 20. Modelo de la membrana plasmática distribuido en dominios o sectores (RAFTS). (Simmons & Ikonen, 1997).

3. LAS FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

El interés por la realización de la fermentación alcohólica a bajas temperaturas (10-15 °C) surge una vez conseguido, por parte de la industria enológica, el control efectivo de la temperatura de fermentación. Es en los países denominados nuevos productores (Chile, Argentina, Sudáfrica, Canadá y California) donde primeramente se aplican estas temperaturas en la elaboración de vinos blancos y rosados, en busca de vinos con una mayor expresión de las variedades viníferas de gran potencial aromático.

Actualmente muchos enólogos prefieren la elaboración de vinos blancos y rosados mediante fermentaciones a bajas temperaturas (10-15 °C) para obtener productos con un mejor perfil organoléptico (Llauradó, 2002, Beltrán, 2002; Torija, 2003; Novo 2003). Los beneficios que las bajas temperaturas aportan al vino se derivan principalmente de la mejora de su perfil aromático y sensorial. En general, se considera que las bajas temperaturas aumentan los aromas afrutados característicos de algunos ésteres (acetato de isoamilo, acetato de 2-fenil-etanol) y disminuyen algunos compuestos que merman la calidad (ácido acético, acetaldehído y acetato de etilo) (Llauradó et al., 2000).

Los compuestos aromáticos que están condicionados por la temperatura de fermentación son de dos tipos, los primarios, provenientes directamente de la uva, y los secundarios, productos del metabolismo de la levadura. Los aromas primarios se ven retenidos en mayor medida cuando bajan las temperaturas de fermentación. En el caso de los aromas secundarios, también llamados fermentativos, la temperatura es muy importante ya que condiciona totalmente el desarrollo de la levadura y, por tanto, la producción de unos compuestos u otros (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Otro aspecto importante es que las bajas temperaturas reducen notablemente el crecimiento de las bacterias acéticas y lácticas y, por tanto, pueden disminuir los metabolitos producidos por estas bacterias durante la fermentación alcohólica, que en general, son perniciosos para la calidad del vino (Ribéreau-Gayon, 2000).

A pesar de todas estas ventajas cualitativas que aportan las bajas temperaturas de fermentación al producto elaborado, hay que tener presentes los inconvenientes que conllevan este tipo de fermentaciones. En realidad, todos los efectos negativos son el resultado de la

dificultad con la que se encuentra la levadura vínica *S. cerevisiae* para desarrollarse en unas condiciones adversas.

3.1. Efecto de la temperatura sobre la ecología de levaduras

Varios autores han visto que algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* como *Hanseniaspora uvarum* y *Candida zemplinina* (antigua *C. stellata*) pueden crecer mejor a bajas temperaturas que *Saccharomyces* (Sharf & Margalith, 1983; Heard & Fleet, 1988), ya que pueden aumentar su tolerancia al etanol (Gao & Fleet, 1988). Torija et al. (2003) estudió la influencia de la temperatura de fermentación sobre un cultivo mixto de diferentes cepas de *S. cerevisiae* y el número de cepas que llevaban a cabo la fermentación aumentaban a bajas temperaturas (Fig. 21).

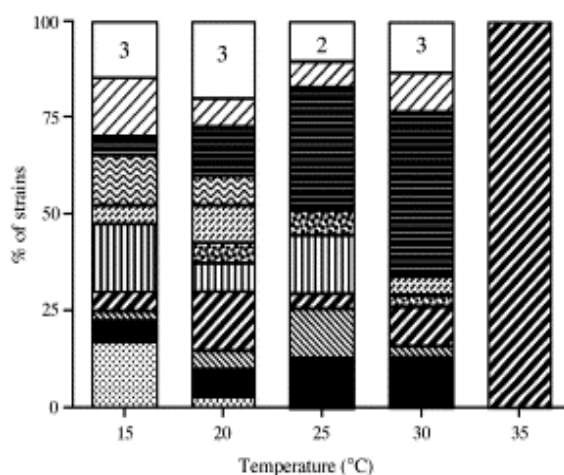


Figura 21. Porcentajes de las cepas de *S. cerevisiae* presentes al final de una fermentación a diferentes temperaturas de fermentación. Los números en la parte superior de las barras representan los número de diferentes cepas minoritarias (<10 %) (Torija et al., 2003).

3.2. Efecto de la temperatura sobre la cinética fermentativa

La temperatura óptima de crecimiento para *S. cerevisiae* es de 28 °C mientras que por debajo de 15 °C es restrictiva y aumenta el riesgo de producir fermentaciones muy lentas o incluso paradas. En este tipo de fermentaciones, la capacidad de la levadura para crecer y desarrollar la fermentación alcohólica es clave. La fase de latencia se alarga al disminuir la temperatura de fermentación. En mostos con concentraciones altas en azúcares podría pararse la fermentación antes de haberse consumido los azúcares que había en el medio.

Con el objetivo de mejorar las fermentaciones a bajas temperaturas, Llauradó et al. (2005) realizaron preadaptaciones del inóculo a la misma temperatura de la fermentación,

consiguiendo en alguna cepa (cepa B) una mejora de la cinética fermentativa y una consecuente disminución de la duración de la fermentación a 13 °C respecto a los otros tipos de preparaciones del inóculo: levadura seca activa rehidratada y células crecidas a la temperatura habitual de la bodega (cultivo iniciador) como se puede observar en la siguiente figura.

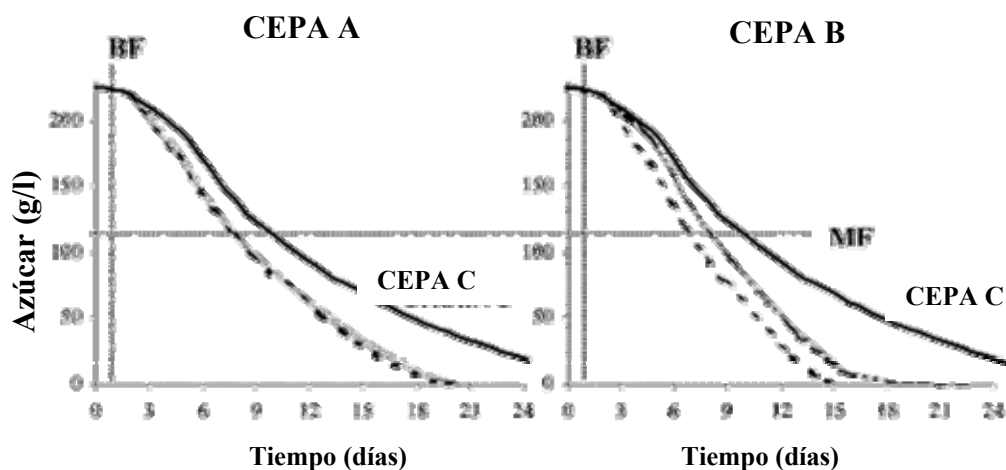


Figura 22. Evolución de la fermentación a 13 °C con las cepas A, B y C. La cepa A o B, preadaptadas (---), cultivo iniciador (- - -), no preadaptado (-); cepa C (cepa criotolerante) (—). BF y MF son los puntos inicio y mitad de la fermentación en los cuales se tomaron las muestras para el análisis.

3.3. Efecto sobre la viabilidad

A temperaturas bajas se alcanza progresivamente la población máxima y se mantiene casi durante toda la fermentación con una tasa de viabilidad muy elevada. En cambio a temperaturas más elevadas, la población máxima se alcanza muy rápidamente produciéndose una mayor mortalidad celular durante la fermentación. Los efectos tóxicos del etanol se acrecientan cuanto más alta sea la temperatura de fermentación. Una cepa de *Saccharomyces* termotolerante producía menor cantidad de etanol cuando fermentaba a 41 °C que cuando lo hacía a 31 °C. Incluso con un porcentaje de glucosa del 20% se vio que no podía finalizar la fermentación dejando sobre un 4.5% de glucosa en el medio. Sin embargo, doblando el aporte nutricional del medio podía conllevar una completa utilización de la glucosa y una máxima producción de etanol mejorando la fermentación de glucosa a altas temperaturas (D'amore et al., 1989).

3.4. Modificación de la actividad metabólica de las levaduras con diferente producción de metabolitos secundarios

En función de la temperatura de fermentación se modifica la producción de metabolitos secundarios como glicerol, ácido acético, ácido succínico, compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ésteres de acetato y ésteres etílicos de ácidos grasos (Fleet & Heard, 1993). Los ésteres de acetato en *S. cerevisiae* resultan de la combinación de acetyl-CoA con un alcohol por la acción de las enzimas alcohol acetil transferasas Atf1p y Atf2p (Lambrechts and Pretorius 2000) y los ésteres etílicos son generados a partir de un acil-CoA y etanol por la acción de Eht1p y Eeb1p (Mason & Dufour, 2000; Saerens et al., 2006).

Una mayor concentración de ésteres responsables de las características afrutadas de los vinos son obtenidos a bajas temperaturas de fermentación. Esto es debido al incremento de la estabilidad de los compuestos volátiles, una reducida pérdida por evaporación y un metabolismo diferencial de la levadura a causa de una síntesis de ácidos grasos alterada que modifica la composición de la membrana plasmática (Boulton et al, 1996, Killian & Ough 1979, Walker et al., 1998).

Torija et al. (2003) observaron que el porcentaje de etanol disminuía al aumentar la temperatura lo que indicaba por una parte una disminución del uso del sustrato y por otra, una mayor evaporación a temperaturas más elevadas. En cambio, el ácido acético y el glicerol se incrementaban al aumentar la temperatura. El acetaldehído presentaba la máxima concentración a 20 °C y mínima a 35 °C. La suma de todos los productos secundarios mayoritarios (glicerol, ácido acético, ácido succínico y acetaldehído) aumentaba conforme la temperatura de fermentación incrementaba (**Tabla 1**).

Tabla 1. Análisis químicos de vinos (Adaptada de Torija et al., 2003).

Concentración (g l ⁻¹)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Etanol	93.60 ± 0,56 ^a	93.04 ± 0.88	90.00 ± 0.56	89.60 ± 0.00	79.52 ± 1.84
Glicerol	6.05 ± 0.11	6.59 ± 0.07	6.91 ± 0.11	7.18 ± 0.02	7.38 ± 0.08
Acetaldehído	0.05 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Ácido succínico	0.74 ± 0.06	0.89 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.70 ± 0.03
Ácido acético	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.22 ± 0.04
Suma de productos	100.52	100.74	97.86	97.87	87.84
CO₂	89.53	88.99	86.08	85.70	76.06
Productos +CO₂	190.05	189.73	183.94	183.57	163.90

Molina et al. (2007) observaron perfiles aromáticos muy distintos en fermentaciones con mosto sintético realizadas a 15 y 28 °C. La diferencia aromática mayor entre ambas temperaturas se encontraba en una mayor concentración de ésteres etílicos a bajas temperaturas relacionados con aromas frescos y afrutados, mientras que a 28 °C aumentaban los aromas de plátano, piña (2-metil acetato, etil 2-metil butanoato,) y florales (2- fenil etanol y 2-fenil etil acetato) producidos por la levadura. También estudiaron la expresión de genes implicados en la biosíntesis de los aromas para determinar cómo afectaba la temperatura a su expresión (*ADH1*, *PDC1*, *BAT1*, *BAT2*, *LEU2*, *ILV2*, *ATF1*, *ATF2*, *EHT1*, *IAH1*). La mayoría de estos genes presentaban diferentes perfiles de expresión a bajas temperaturas. De modo que la temperatura de fermentación juega un papel importante para modular el aroma del vino de acuerdo a la demanda del mercado.

3.5. Efecto de la temperatura sobre la composición lipídica de las levaduras

Muchos organismos, al igual que *S. cerevisiae*, han desarrollado diferentes mecanismos para mantener una fluidez de membrana apropiada a pesar de la temperatura ambiental. Estos mecanismos incluyen cambios en las proporciones de los tipos de lípidos y alteraciones en el ratio lípidos/proteínas (Klein et al., 1999). El cambio más conocido en las membranas celulares a causa de las bajas temperaturas son las insaturaciones de las cadenas de ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos.

El estado físico de los fosfolípidos cambia con la temperatura. Entre el estado líquido verdadero y el estado sólido, estos lípidos pasan por estados en los que tienen una consistencia más o menos fluida. Al aumentar la temperatura, un fosfolípido pasa de la fase gel (estado sólido), a la fase cristal líquido (estado fluido) (**Fig. 23**). El paso de un estado a otro se denomina transición de fase (Jain, 1983). El estado de las membranas a temperaturas óptimas de crecimiento para un organismo dado es la fase cristal líquido que implica una mayor fluidez y por lo tanto un mejor intercambio entre célula y ambiente.

TEMPERATURA

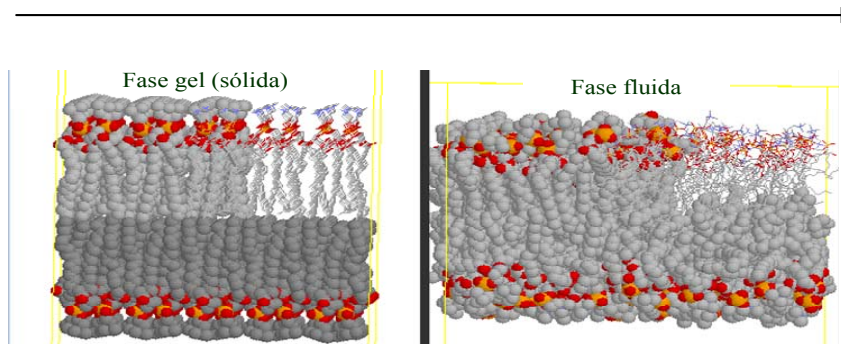


Figura 23. Fases gel y cristal líquido de los fosfolípidos (Adaptado de <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstruct/oldynamicves.html>).

Numerosos factores influyen sobre la temperatura de transición de fase como la naturaleza de la parte polar del fosfolípido, contenido en agua, presencia o no de iones. Pero el factor predominante es la naturaleza de los ácidos grasos presentes en la molécula.

Cuanto mayor sea el grado de saturación de los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos que forman la membrana, mayor será el grado de rigidez de la misma. Sin embargo, si aumenta el grado de insaturación de los ácidos grasos, las interacciones de Van der Waals entre las colas hidrófobas disminuyen, y por lo tanto hay menor cohesión y mayor fluidez.

La temperatura de transición de fase (T_m) de un ácido graso aumenta con la longitud de la cadena, pero también depende de la posición del ácido graso esterificado al glicerol (**Tabla 2 y 3**). La insaturación y la posición del doble enlace sobre la cadena la modifican (C16:1*cis*9 presenta un T_m de $-36\text{ }^\circ\text{C}$, C18:1*cis*9 presenta un T_m de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y C18:1*trans*9 presenta un T_m de $+12\text{ }^\circ\text{C}$). El hecho de que el doble enlace se sitúe en el centro de la cadena contribuye a disminuir la temperatura de transición de fase, (C18:1*cis*6 = $+1\text{ }^\circ\text{C}$).

Tabla 2. Temperaturas de transición de fase de la fosfatidilcolina (Adaptado de Silvius, 1982)

Fosfolípidos	T _m °C
Fosfatidilcolina	
12:0 PC	-1
14:0 PC	23
16:0 PC	41
18:0 PC	55
20:0 PC	66
16:1 PC	-36
18:1c9 PC	-20
18:1t9 PC	12
18:1c6 PC	1
18:2 PC	-53
18:3 PC	-60
14:0-16:0 PC	35
16:0-14:0 PC	27
16:0-18:1 PC	-2
18:1-16:0 PC	-9

Tabla 3. Temperaturas de transición de fase de diferentes fosfolípidos (Adaptado de Silvius, 1982)

Fosfolípidos	T _m °C
Fosfatidilcolina (PC)	
16:0 PC	41
16:0-18:1 PC	-2
Fosfatidilglicerol (PG)	
16:0 PG	41
16:0-18:1 PG	-2
Fosfatidilserina (PS)	
16:0 PS	54
16:0-18:1 PS	14
Ácido fosfatídico (PA)	
16:0 PA	67
16:0-18:1 PA	28
Fosfatidiletanolamina (PE)	
16:0 PE	63
16:0-18:1 PE	25

También hay que tener en cuenta que la región polar de los fosfolípidos influye en la T_m de éstos. Así las temperaturas de la fosfatidiletanolamina es superior en torno a 20 °C a la de la fosfatidilcolina, con composiciones iguales de ácidos grasos (Lee, 1983) (**Tabla 2 y 3**).

El hecho de que fosfolípidos con ácidos grasos insaturados tengan una temperatura de transición de fase menor y mayor flexibilidad que los fosfolípidos con ácidos grasos saturados implica como mecanismo de adaptación a las bajas temperaturas la inducción de las desaturasas cuya función es incorporar insaturaciones en posiciones definidas en los ácidos grasos que están unidos a glicerolípidos de membrana (Weber et al., 2000). En *S. cerevisiae*, la exposición a bajas temperaturas incrementa la expresión de *OLE1* que codifica la única desaturasa conocida en levaduras (Nakagawa et al., 2002). Esta desaturasa solamente puede introducir un solo doble enlace convirtiendo un determinado ácido graso saturado en el correspondiente de igual número de carbonos pero insaturado. Se ha visto que un incremento en la expresión de *OLE1* produce un aumento del grado de insaturación de los ácidos grasos totales cuando la temperatura del cultivo desciende de 30 °C a 10 °C (Nakagawa et al., 2002). Sin embargo, *OLE1* no parece ser esencial en la adaptación a bajas temperaturas ya que la sobreexpresión no le confiere ventajas en el crecimiento a 10 °C excepto en un medio con el 15% de dextrosa (Kajiwara et al., 2000). Por otra parte la sobreexpresión de *OLE1* es tóxica y reduce el crecimiento a 30 °C (Stukey et al., 1989).

Rodriguez-Vargas et al. (2007) expresaron dos desaturasas de girasol codificadas por los genes, *FAD2-1* y *FAD2-3*. Estas desaturasas eran capaces de introducir dos insaturaciones y sintetizar C16:2 y C18:2, consiguiendo aumentar el índice de insaturación y la fluidez de membrana. El contenido total en ácidos grasos permaneció constante y el nivel de monoinsaturados descendió. La sobreexpresión de las desaturasas en cepas auxótrofas para el triptófano aumentaba su crecimiento a 30 °C pero lo disminuía a 15 °C, sin embargo este fenotipo sensible al frío mejoró al aumentar la disponibilidad de triptófano y se recuperó totalmente en las cepas protótrofas para el triptófano. Estos resultados sugieren que modificaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática afectan a la captación de triptófano posiblemente a causa de la sensibilidad de sus permeasas a los cambios de fluidez.

Además de los fosfolípidos y el grado de insaturación de sus ácidos grasos, los esteroides también participan en la adaptación de la célula a la temperatura ambiental y en general en la resistencia a diferentes tipos de estrés. Los esteroides interactúan con los fosfolípidos cuando sucede una bajada de temperatura y les previenen de la transición conformacional. Es decir, los esteroides juegan un papel de reguladores, rigidificando una estructura demasiado fluida o fluidificando una estructura demasiado rígida, permitiendo prevenir la transición de fase fluida a fase gel, que normalmente ocurre a bajas temperaturas. Consecuentemente, a mayor cantidad de esteroides en la membrana de las levaduras, menor es la influencia de los fosfolípidos participando en la transición de fase (Schechter, 1997).

En condiciones de vinificación en blanco, las levaduras crecen en un medio rico en azúcares con generalmente carencia de nitrógeno (factor que permite el incremento de biomasa y la síntesis de proteínas) y oxígeno (factor que permite la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides). Si además la temperatura de fermentación es baja, las células tienen la necesidad de aumentar el grado de insaturación y la síntesis de esteroides, para aumentar la fluidez de membrana. Las condiciones anaerobias del proceso ponen en peligro la síntesis de estos compuestos dependientes de oxígeno. Una supuesta alternativa descrita (Rozès, 1992; Bardi et al., 1999; Torija et al., 2003) es la síntesis de ácidos grasos de cadena media (MCFA), que igualmente podrían disminuir el grado de compactación y aumentar la fluidez de la membrana.

Los MCFA y sus ésteres etílicos son unos de los principales compuestos aromáticos de las bebidas alcohólicas (Suomalainen & Lehtonen, 1979; Kodama, 1993). Sin embargo, se ha encontrado un exceso de MCFA en mostos donde han ocurrido paradas de fermentación (Taylor & Kirsop, 1977; Geneix et al., 1983; Lafon-Lafourcade, 1984; Viegas et al., 1985, 1989; Edward et al., 1990; Viegas & Sa-Correia, 1991; Delfini et al., 1993; Ravaglia & Delfini, 1993). Es decir, los MCFA pueden llegar a ser tóxicos para las células. La presencia de etanol permite la solubilización de los MCFA (C8 y C10), subproductos de la fermentación alcohólica, en un pH de 3 a 5.4. Estos MCFA entran a través de la membrana plasmática por difusión pasiva de su forma no disociada, los cuales son solubles en la membrana de fosfolípidos, disminuyendo las interacciones lípido-lípido y lípido-proteínas, incrementando la permeabilidad. Estos ácidos grasos junto con el etanol disminuyen la eficacia de la membrana plasmática en retener, contra un gradiente de concentración, compuestos intracelulares como aminoácidos entre otros. Cuanto más liposoluble más toxicidad presenta el ácido graso, los ácidos grasos de cadena más larga no son tan intrusivos en las membranas como los de cadena corta. El incremento de la concentración de protones intracelular a causa de la disociación de estos ácidos grasos de cadena corta en el citoplasma y el incremento de los requerimientos de energía (disminución de la concentración de ATP y inhibición de la ATPasa) para el mantenimiento del pH intracelular pueden ser factores importantes para su acción como inhibidores del crecimiento (Viegas et al., 1989).

Bardi et al. (1999) comprobaron que los MCFA no son necesarios para la síntesis de lípidos estructurales de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. La producción de altas concentraciones de MCFA en fermentaciones sin aireación y con ausencia de oxígeno se trata de un efecto secundario, y no una causa, de las fermentaciones lentas o con paradas. En condiciones de anaerobiosis, aumentan los SFA en la célula y se inhibe la acetil-CoA carboxilasa (*ACC*) por lo que se impide la elongación de los ácidos grasos. En estas condiciones se produce la liberación por parte de la sintetasa de ácidos grasos (*FAS*) de MCFA acil-CoA que son hidrolizados para reciclar el CoA-SH. Los MCFA no están inmovilizados en estructuras celulares sino que se encuentran libres en el medio

Torija et al. (2003) observó que *S. cerevisiae* adaptaba una fluidez óptima de membrana aumentando el grado de insaturación en fermentaciones a bajas temperaturas, mientras que *S. bayanus* solamente aumentaba el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (MCFA).

Beltran et al. (2006) realizaron un estudio comparativo de fermentaciones a bajas temperaturas (13 °C) y a 25 °C, a nivel industrial, utilizando una cepa comercial. También observaron modificaciones en la composición lipídica de las levaduras: aumento del grado de insaturación al principio de la fermentación y disminución de la longitud de cadena tal como la fermentación progresaba. Las modificaciones las relacionaron en parte con una menor expresión de los genes *FAA3*, *FAA1* y *SUR4* a 13 °C, mientras que los genes que codifican para la síntesis mitocondrial de ácidos grasos estaba sobreexpresada con una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta y mediana. Estos ácidos grasos podrían ser convertidos en los correspondientes ésteres etílicos, mejorando la calidad aromática de los vinos a bajas temperaturas. La expresión de genes implicados en el metabolismo de fosfolípidos (*SLC1*, *CDS1*, *PGS1*, *CRD1*, *DEP1*) era relativamente mayor a 13 °C que a 25 °C en la mitad o final de fermentación, lo que se atribuía a una respuesta compensatoria del descenso de fosfolípidos o a una regulación postranscripcional de los correspondientes enzimas.

Tai et al. (2007) vieron que los genes del metabolismo de los lípidos eran el único grupo de genes regulados de igual forma en estudios de adaptación a bajas temperaturas en cultivos continuos y en “batch” (Sahara et al., 2002, Schaeede et al., 2004). Tres de los genes que se sobreexpresaban a bajas temperaturas estaban implicados en el metabolismo lipídico (*SFK1*, *YPC1* y *YELO73*), los cuales intervenían en la regulación o en la vía de síntesis de los fosfolípidos o ceramidas (Tai et al., 2007).

También se ha estudiado la adaptación de levaduras psicrófilas a bajas temperaturas observando que los mecanismos de respuesta al frío relacionados con el metabolismo lipídico son similares, siendo uno de ellos el aumento de los ácidos grasos insaturados (Rossi et al., 2009)

La ruta HOG (high osmolarity glicerol) se trata de una de las principales rutas en cascada de respuesta al estrés osmótico en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002; Westfall et al., 2004). La activación de HOG se vio que también era inducida por el agente rigidificador de membrana (DMSO) (Panadero et al., 2006), por lo que se le atribuye a esta ruta un posible papel señalizador de la bajada de la temperatura del medio de crecimiento.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Acharya U, Patel S, Koundakjian E, Nagashima K, Han X, Acharya JK (2003) Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration. *Science* 299:1740–1743.
2. Aguilar PS, and de Mendoza D (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol* 62:1507–1514.
3. Almaguer C, Mantella D, Perez E, and Patton-Vogt J (2003) Inositol and phosphate regulate GIT1 transcription and glycerophosphoinositol incorporation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2:729–736.
4. Antunovics Z, Nguyen HV, Gaillardin C, Sipiczki M (2005) Gradual genome stabilisation by progressive reduction of the *Saccharomyces uvarum* genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5:1141-50.
5. Aranda A, Querol A, del Olmo M (2002) Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSPgenes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol* 177:304–312.
6. Athenstaedt K, Zweytick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G (1999) Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:6441-6448.
7. Bardi L, Cocito C, Marzona M (1999) *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int J Food Microbiol* 47:133-40.
8. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1990) *Yeasts: characterisation and identification*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge
9. Bauer FF & Pretorius I.S (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine *S Afr J Enol Vitic* 21: 27-50.
10. Belloch C, Orlic S, Barrio E, Querol A (2008) Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int J Food Microbiol* 122: 188–195.
11. Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón JM, Rozès N, Mas A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 2: 287-293.
12. Beltran G, Novo M; Leberre V; Sokol S; Labourdette D; Guillamón JM; Mas A; François J, Rozès N (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res* 6:1167–1183.
13. Beltran G, Novo M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2008) Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int J Food Microbiol* 121:169-77.
- 14.
15. Beudeker RF, van Damm HW, van der Plaats JB, Vellenga K (1990) Developments in baker's yeast production. In: Verachtert H, deMot R (eds) *Yeast: biotechnology and biocatalysis*. MarcelDekker, New York, pp 103–146
16. Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkel RE (1996) *Principles and Practices of Winemaking*. New York: Chapman and Hall.
17. Borneman AR, Forgan AH, Pretorius IS, Chambers PJ (2008) Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res* 8:1185–1195.
18. Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221–17224.

19. Brown DA (2001) Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 11:R446–R449.
20. Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich HG. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:2641–2646.
21. Bureau G, Brun O, Vignes A, Maujean A, Vesselle G, Feuillat A (1982) Etude d'une microflore levurienne champenoise. *Connaiss Vigne Vin* 16:15-32.
22. Bürgermeister M, Birner-Grünberger R, Nebauer R, Daum G (2004) Contribution of different pathways to the supply of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine to mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1686:161-8.
23. Castellari L, Ferruzzi M, Magrini A, Giudici P, Passarelli P, Zambonelli C (1994) Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 33: 49–52.
24. Codon AC, Gasent-Ramirez JM, Benitez T (1995). Factors which affect the frequency of Sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl Environ Microbiol* 61: 630-638.
25. Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S, Sohier D (2006) Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations *Int J Food Microbiol* 108:130-5.
26. D'Amore T & Stewart GG (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enz Microb Technol* 9, 322-330.
27. D' Amore. T, Celotto G, Russell I. and Stewart GG (1989) Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °C In: *vmc Microbiology and Technology* 11. 411-416.
28. Daum G; Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1471-1510.
29. Daum G, Paltauf F (1980) Triacylglycerols as fatty acid donors for membrane phospholipid biosynthesis in yeast. *Monatsh Chem* 111:355–363.
30. Degre R. (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: Fleet, G.M. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur., Switzerland, pp. 421-447.
31. Delfini C, Bardi L, Cocito C, Conterno, Dell'oro V, Ravaglia S (1993) Concentration en oxygène, en acides aminés, en acides gras et en sterols libres du mout et composition aromatique du vin, *Actes Symposium International Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins*. Montpellier.
32. Demuyter C, Lollier M, Legras JL, Le Jeune C (2004) Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J Appl Microbiol* 97:1140-8.
33. Dias L, Dias S, Sancho T, Stender T, Querol A, Malfeito-Ferreiro M, Loureiro V (2003) Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol* 20:567-574.
34. Dickson RC (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu Rev Biochem* 67:27-48.
35. Dickson RC, Lester RL (2002) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1583:13-25.
36. Dickson RC, Sumanasekera C, Lester RL (2006) Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res* 45:447-65.
37. Dimster-Denk D, Rine J (1996) Transcriptional regulation of a sterol biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16:3981–3989.

38. Dowd SR, Bier ME, Patton-Vogt JL (2001) Turnover of phosphatidylcholine in *Saccharomyces cerevisiae*. The role of the CDP-choline pathway. *J Biol Chem* 276:3756-3763.
39. Edwards CG, Beelman RB, Bartley CE, McConnel AL (1990) Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am J Enol Vitic* 41:48-56.
40. Eisenkolb M, Zenzmaier C, Leitner E, Schneiter R (2002) A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol Biol Cell* 13:4414-28.
41. Falcone DL, Ogas JP, and Somerville CR (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* 4: 17.
42. Fernández-Espinar MT, López V, Ramón D, Bartra E, Querol A (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* 70:1-10.
43. Fernandez-Murray JP & McMaster CR (2005) Glycerophosphocholine catabolism as a new route for choline formation for phosphatidylcholine synthesis by the Kennedy pathway. *J Biol Chem* 280:38290-38296.
44. Fisher EC, Almaguer R, Holic P, Griac, Patton-Vogt J (2005) Glycerophosphocholine-dependent growth requires Gde1p (YPL110c) and Git1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280:36110-36117.
45. Fleet GH & Heard GM (1993) Yeasts-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. Fleet, GH pp 27-54, Switzerland, 1993; Harwood Academic publishers. ISBN 3-7186-5132-7.
46. Frey CN (1957) History of the development of active dry yeast, in yeast- Its characteristics, Growth, and Function in Baked Products (eds. C.S. McWilliams & M. S. Peterson) National Academy of Sciences- National Research Council, Washington, DC, pp 7-33.
47. Funato K & Riezman H (2001) Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* 155: 949-959.
48. Futerman AH, Hannun YA (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5:777-782.
49. Gao C & Fleet GH (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J Appl Bacteriol* 65:405-409.
50. Geneix C, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. (1983).Effect des acides gras sur la viabilité des populations de *S. cerevisiae* *C R Acad Sci* 1983:943-947.
51. Giudici P, Caggia C, Pulvirenti A, Zambonelli C, Rainieri (1998) Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *S Lett Appl Microbiol* 27:31-4.
52. Goddard MR (2008) Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 9:2077-82.
53. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546, 563-7.
54. González SS, Barrio E, Gafner J, Querol A (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research* 6: 1221-1234.

55. González SS, Gallo L, Climent MA, Barrio E, Querol A (2007) Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int J Food Microbiol* 116:11-8.
56. Guillas I, Kirchman PA, Chuard R, Pfefferli M, Jiang JC, Jazwinski SM, Conzelmann A (2001) C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J* 20: 2655–2665.
57. Hannun YA & Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10: 73–80.
58. Hannun YA & Obeid LM (2002) The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277:25847-50.
59. Hansen R, Pearson SY, Brosnan JM, Meaden PG, Jamieson DJ (2006) Proteomic analysis of a distilling strain of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial grain fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:116-25.
60. Heard GM & Fleet GH (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J Appl Bacteriol* 65: 23–28.
61. Hechtberger P, Zinser E, Saf R, Hummel K, Paltauf F, Daum G (1994) Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 225:641–649.
62. Herker EH, Jungwirth KA, Lehmann C, Maldener C, Frohlich KU, Wising S, Howlett NG and Avery SV (1997) Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 539-545.
63. Hohmann S (2002) Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372.
64. Ivorra C, Pérez-Ortín JE, del Olmo M (1999) An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol Bioeng* 64:698–708.
65. Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1511–1527.
66. Jain MK & Wu NM (1977) Effect of small molecules on the dipalmitoyllecithin liposomal bilayers: phase transition in lipid bilayer. *J Memb Biol* 34: 157-201.
67. Kajiwara S, Aritomi T; Suga K; Ohtaguchi K, Kobayashi O (2000) Overexpression of the *OLE1* gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 568-74.
68. Kennedy, EP and Weis SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J Biol Chem* 222: 193-214.
69. Kiewietdejonghe A., Pitts M, Cabuhat L, Sherman C, Kladwang W, Miramontes G, Floresvillar J, Chan J, Ramirez RM (2006) Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:205-17.
70. Killian E & Ough CS (1979) Fermentation esters—formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am J EnolVitic* 30: 301–305.
71. Klein W, Weber MHW, Marahiel MA (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* 181:5341-5349.
72. Kobayashi SD & Nagiec MM (2003) Ceramide/long-chain base phosphate rheostat in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of ceramide synthesis by Elo3p and Cka2p. *Eukaryot Cell* 2: 284–294.

73. Kodama (1993) Sake-Brewing yeasts In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), The yeasts, Vol. V: Yeast technology. Academic Press Limited, London, p. 620.
74. Kornberg A & Pricer WE. (1953). Enzymatic esterification of alpha-glycerophosphate by long chain fatty acids. J Biol Chem 204: 345–357.
75. Lafon-Lafourcade S, Geneix C, Ribereau-Gayon P (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. Appl Environ Microbiol. 47:1246-1249.
76. Lambrechts MG & Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. S Afr J Enol Vitic 21:97-129.
77. Lands WE (2000) Stories about acyl chains. Biochim Biophys Acta 1483: 1–14.
78. Lee AG (1983) In Membrane Fluidity in Biology (Aloia, R. C., Ed.) Vol. 2, pp 43-88, Academic Press, New York.
79. Le Jeune C, Lollier M, Demuyter C, Erny C, Legras JL, Aigle M, Masneuf-Pomarède I (2007) Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus var. uvarum*. FEMS Yeast Res 7:540-9.
80. Levine TP, Wiggins CA, Munro S (2000) Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 11:2267–2281.
81. Longo E, Cansado J, Agrelo D, Villa T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. Am J Enol Vitic 42:141-144.
82. Luparia V, Soubeyrand V, Berges T, Julien A, Salmon JM (2004) Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. Appl Microbiol Biotechnol 65:25-32.
83. Llauradó J, Constantí M, Rozès N, Mas A (2000). Fermentaciones a baja temperatura (13 °C). Alimentación, equipos y tecnología. 2: 87-94.
84. Llauradó J, Rozès N, Bobet R, Mas A, Constantí M (2002) Low temperature alcoholic fermentation in high sugar concentration grape musts. J Food Sci 67: 268–273.
85. Martin CE, Oh CS, Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. Biochim Biophys Acta. 1771: 271–285.
86. Martínez J, Millán C, Ortega JM (1989) Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from “Pedro Ximenez” grapes. S.Afr J Enol Vitic 10:31-35.
87. Martini A, Vaughan-Martini A (1990) Grape must fermentation: Past and Present. En: J.F.T. Spencer JFT and. Spencer DM ed. Yeast technology. Springer-Verlag, Berlin, pp. 105-123.
88. Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, Dubourdiou D. (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Appl. Environ Microbiol 64: 3887–3892.
89. Mason AB & Dufour J (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. Yeast 16:1287–1298.
90. Massoutier C, Alexandre H, Feulliat M, Charpentier C. Isolation and characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. (1998) Vitis 37: 55–59.
91. Merkel O, Oskolkova OV, Raab F, El-Toukhy R, Paltauf F (2005) Regulation of activity in vitro and in vivo of three phospholipases B from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J 387: 489–496.

92. Merrill AH Jr (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 277:25843-6.
93. Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds *Appl Microbiol Biotechnol* 77:675–687.
94. Mortimer R & Polsinelli M (1999) On the origins of wine yeast. *Res Microbiol* 150, 199-204.
95. Müllner H & Daum G (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol* 51:323-47.
96. Nagodawithana TW and Trivedi NB (1990) Yeast selection for baking. En: Panchal CJ (ed) *Yeast strain selection*. Marcel Dekker, New York, pp 139–184.
97. Nakagawa Y, Sakumoto N, Kaneko Y, Harashima S (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys Res Commun* 291:707-713.
98. Naumov GI, Naumova ES, Antunovics Z, Sipiczki M (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 727–730.
99. Naumov GI, Nguyen HV, Naumova ES, Michel A, Aigle M, Gaillardin C (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int J Food Microbiol* 65: 163–171.
100. Novo M, Beltrán G, Torija MJ, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation rehydration and low temperature. *Int J Food Microbiol* 9:51-55.
101. Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, Cambon B, Legras JL, Wincker P, Casaregola S, Dequin S (2009) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16333-8.
102. Oh CS, Toke DA, Mandala S, Martin CE (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* 272: 17376–17384.
103. Panadero J, Pallotti C, Rodríguez-Vargas S, Randez-Gil F, Prieto JA (2006) A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:4638–4645
104. Parks LW (1978) Metabolism of sterols in yeast. *CRC Crit Rev Microbiol* 6: 301-341.
105. Parks LW & Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* 49:95-116.
106. Patton JL & Lester RL (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol* 173:3101–3108.
107. Patton JL, Pessoa-Brandao L, Henry SA (1995) Production and reutilization of an extracellular phosphatidylinositol catabolite, glycerophosphoinositol, by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177: 3379–3385.
108. Patton-Vogt J (2007) Transport and metabolism of glycerophosphodiester produced through phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta* 1771: 337–342.
109. Pereira MD, Eleutherio ECA, Panek AD (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* 1:11.
110. Pereira Ede J, Panek AD, Eleutherio EC (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperon* 8:120-4.

111. Pérez-Torrado R, Bruno-Bárcena JM, Matallana E (2005) Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl Environ Microbiol* 71: 6831-6837.
112. Pérez-Torrado R, Carrasco P, Aranda A, Gimeno-Alcañiz J, Pérez-Ortín JE, Matallana E, del Olmo M (2002) Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *Syst Appl Microbiol* 25: 153-161.
113. Pérez-Torrado R, Gómez-Pastor R, Larsson C, Matallana E (2009) Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:951-60.
114. Perry DK & Hannun YA (1998) The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1436: 233–243.
115. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675–729.
116. Posten CH & Cooney CL (1993) Growth of microorganisms. In: Rehm J, Reed G (eds) *Biotechnology*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 113–162.
117. Querol A, Jiménez M, Huerta T (1990) A study on microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci* 55: 114-122.
118. Ravaglia S & Delfini C (1993). Production of MCFA and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital J Food Sci* 1:21–36.
119. Redzepovic S, Orlic S, Sikora S, Majdak A, Pretorius IS. (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett Appl Microbiol*. 35:305-10.
120. Reed G. & Nagodawithana TW (1988) Technology of Yeast Usage in Winemaking *Am J Enol Vitic* 39:83-90.
121. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (2000) *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinification Vol. I*. West Sussex, England: Wiley.
122. Rietveld A & Simons K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1376:467–479.
123. Rose AH & Vijayalakshmi G (1993) Baker's yeasts. In: Rose AH, Harrison JS (eds) *The yeasts*, vol 5. 2nd edn. Academic Press, London, pp 357–397.
124. Rosen K (1989) Preparation of yeast for industrial use in the production of beverages. In: Cantarelli C, Lanzarini G (eds) *Biotechnology applications in beverage production*. Elsevier Applied Science, London, pp 169–187.
125. Rodríguez RJ & Parks LW (1983). Structural and physiological features of sterols necessary to satisfy bulk membrane and sparkling requirements in yeast sterol auxotrophs. *Arch Biochem Biophys* 225:861-871.
126. Rodríguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Randoz-Gil F (2007) Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ Microbiol* 73:110-6.
127. Rosini G, Federichi F, Martini A (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol Ecol* 8:83-89.

128. Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM, Matteuzzi D (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 69:363-72.
129. Roustan JL & Sablayrolles JM (2002) Trehalose and glycogen in wine-making yeast: methodological aspects and variability. *Biotechnol Lett* 24:1059-1064.
130. Rozès N, Garcia Jares C, Larue F, Lonvaud-Funel A (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J Sci Food Agri* 59:351-359.
131. Rozès N, Larue F, Ribéreau-Gayon P. (1988) Effect of a variation grape must temperature on the fermentation ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 10:821-824.
132. Saerens SM, Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Voet AR, Van Dijck P, Delvaux FR, Thevelein JM (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem* 281:4446-4456.
133. Sahara T, Goda T, Ohgiya S (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem* 277:50015-50021.
134. Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* 1463:267-78
135. Sankaram MB & Thompson TE (1990) Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* 29:10670-10675.
136. Schneiter R & Kohlwein SD (1997) Organelle structure, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* 88:431-4.
137. Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004) Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15:5492-5502.
138. Schorling S, Vallée B, Barz WP, Riezman H, Oesterhelt D (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 12:3417-3427.
139. Schroeder R, London E, Brown D (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12130-12134.
140. Schuck S & Simons (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117:5955-5964.
141. Schütz M & Gafner J (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol* 19:253-257.
142. Scott JD & Pawson T (2000) Cell communication: the inside story. *Sci Am* 282:72-79.
143. Servouse M & Karst F (1986) Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 240:541-547.
144. Sharma SC (2006) Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:1047-51
145. Silvius JR (1982) Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins, Silvius JR, Lipid-Protein Interactions, John Wiley & Sons, Inc., New York, Reprinted with permission from John Wiley & Sons, Inc. Lipid Thermotropic Phase Transition Data base (LIPIDAT)- NIST Standard Reference Database.

146. Simons K & Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39.
147. Sipos G, Reggiori F, Vionnet C, Conzelmann A (1997) Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16:3494-505.
148. Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004) Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15:5492–5502.
149. Sharf R & Margalith P (1983) The effects of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17:311–313.
150. Shechter E (1997) In: Masson (Ed.), *Biochimie et Biophysique des Membranes. Aspects Structuraux et Fonctionnels*, Paris.
151. Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
152. Smith SW & Lester RL (1974) Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J Biol Chem* 249:3395–34.
153. Ståhlberg K, Neal AC, Ronne H, Ståhl U (2008) Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae* *J Lipid Res* 49:1794-806.
154. Stukey JE, McDonough VM, Martin CE (1989) Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264:16537-16544.
155. Suomalainen H & Lehtonen M (1979) The production of aroma compounds by yeast. *J Inst Brew* 85:149-.
156. Swain E, Baudry K, Stukey J, McDonough V, Germann M, Nickels JT, Jr (2002) Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:26177–26184.
157. Tai SL, Daran-Lapujade P, Walsh MC, Pronk JT, Daran JM (2007) Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. *Mol Biol Cell*. 18:5100-12.
158. Taylor FR & Parks LW (1978) *J Bacteriol* 136: 531-537.
159. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón, JM., Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 85:127-136.
160. Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A. (2002). Effects on fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 80:47-53.
161. Toulmay A, Schneiter R (2007) Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* 89: 249-54..
162. Vallée B & Riezman H (2005) Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J* 24:730-41.
163. Van Dijck P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* 61:109-115.
164. Viegas CA, Sa Correia I, Novais JM (1985). Synergistic inhibition of the growth of *Saccharomyces bayanus* by ethanoland octanoic or decanoic acids. *Biotechnol Lett* 7: 611-614.
165. Viegas CA, Rosa MF, Sá-Correia I, Novais JM (1989) Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolc Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 55:21-28.
166. Viegas CA & Sa-Correia I (1991). Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J Gen Microbiol* 137:45–651.

167. Valachovic M, Hronská L, Hapala I (2001) Anaerobiosis induces complex changes in sterol esterification pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett. 197:41-5.
168. Wagner & Daum G (2005) Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Soc Trans 33: 1174–1177.
169. Walker G (1998) Yeast physiology and biotechnology. Wiley, New York.
170. Wang HY, Cooney CHL, Wang DI (1979) Computer control of baker's yeast. Biotechnol Bioeng 21:975–995 568.
171. Weber MH, Klein W, Muller L, Niess UM, Marahiel MA. (2001) Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. Mol Microbiol 39:1321-1329.
172. Westfall PJ, Ballon DR, Thorner J (2004) When the stress of your environment makes you go HOG wild. Science 306: 1511–1512.
173. Wu WI, McDonough VM, Nickels JT, Jr, Ko J, Fischl AS, Vales TR, Merrill AH, Jr, Carman GM (1995) Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B1. J Biol Chem.270:13171–13178.
174. Zaccheo O, Dinsdale D, Meacock PA, Glynn P (2004) Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells. J Biol Chem 279:24024–24033.
175. Zheng Z & Zou J (2001) The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 276:41710–41716.
176. Zuzuarregui A, Carrasco P, Palacios A, Julien A, del Olmo M (2005) Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. J Appl Microbiol 98:299–307.
177. Zuzuarregui A & del Olmo M (2004) Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeasts selection. Anton Leeuw Int J G 85:271-280.
178. Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J, Daum G (2000) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 267:1075-82.

CAPÍTULO I

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Effect of Active Dry Wine Yeast storage upon viability and lipid composition

Marian Redón¹, José M Guillamón^{1,2}, Albert Mas¹ and Nicolas Rozès¹

(1) Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

(2) Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, P.O. Box 73, 46100 Valencia, Spain

World J Microbiol Biotechnol 24:2555–2563

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Abstract

Alterations in the plasma membrane of Active Dry Wine Yeast (ADWY) produce deleterious effects upon yeast fermentation activity. The aim of this study was to evaluate the changes in viability mediated by plasma membrane alterations induced by poor ADWY storage conditions. Yeast recovery was analysed after growth in optimal medium. The effects upon vitality were measured by impedance variation. Cell membrane functionality was measured by anisotropy and cell lipid composition was also determined. The results showed a reduction in viability of up to 57-87% in the stored yeast. The storage effect increased saturated fatty acids, and reduced unsaturated fatty acids and phospholipid contents. The stored yeast recovery was related to membrane functionality and significant increases in unsaturated fatty acid, sterol and phospholipid concentrations. Good vitality was positively correlated to high unsaturated fatty acid, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine concentrations and negatively to high saturated fatty acid and phosphatidylcholine contents.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae* - Fatty acids - Sterols - Rehydration - Vitality

Introduction

Changes in cell membrane composition strongly affect yeast viability and, thus, can jeopardize fermentation performance. Several factors can affect membrane composition, among them storage in inappropriate conditions. Active Dry Wine Yeast (ADWY) is commonly used in wine production. The main advantage of ADWY over fresh yeast is its extended shelf life, as dried yeast and a constant low temperature (4 °C) that enable survival for 2–5 years. However, this extended survival also depends on avoidance exposure to oxygen and moisture during storage (by means of vacuum packaging). Freezing is also advisable for long term storage. However, it is not unusual for ADWY left over after one season to be improperly stored and used the next season. Because of this, yeast might perform poorly under stressful conditions such as grape must fermentation, especially at some frequent enological conditions such as low fermentation temperature, high sugar or low nitrogen concentrations. Furthermore, the use of old AWDY with theoretically reduced viability can lead to poor imposition, high mortality and, thus, to stuck or sluggish fermentations (Ribéreau-Gayon et al. 2004).

Long storage may induce several stress types. Opened seals expose the yeast to the air and consequently to oxidative stress as well as a humidity which may not be enough to cause rehydration, but which will give rise to the deleterious effects of increased water stress (Hansen et al. 2006). These effects are synergetic with those caused by temperature changes as often storage can be in uncontrolled environments. Among other things, poor storage may affect yeast viability, membrane integrity and, above all, lipid composition (Becker and Rapoport 1987; Boyaval and Schuck 1994). Biological membranes are the first barrier between cells and their environment, and changes in plasma membrane composition may be an important adaptive response to stressful conditions. These adaptive changes have been reported as responses to heavy metal exposure (Howlett and Avery 1997), osmotic pressure (Laroche et al. 2001), heat shock (Carratù et al. 1996) or low fermentation temperature (Torija et al. 2003).

The main components of cell membrane are proteins and lipids, with the lipid composition of the cell being mostly bound to the different cell membranes. Thus, synthesis of lipids is necessary to form new organelles and membranes, and consequently for normal cell proliferation and growth. The bulk of the lipid in *Saccharomyces cerevisiae* membranes is constituted by fatty acids (FA), phospholipids (PL), sterols and sphingolipids (Daum et al.

1998). The FA composition of PL is an important parameter of the biophysical properties of cellular membranes and as such must be subjected to change with temperature to ensure constant membrane fluidity, which Sinensky (1974) termed homoviscous adaptation. The FA of *S. cerevisiae* are mainly made up of the unsaturated fatty acids (UFA) oleic acid (18:1) and palmitoleic acid (16:1) together with the saturated fatty acids (SFA) palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) (Daum et al. 1998). The fatty acyl packing of these chains determines to a large extent the membrane fluidity. The packing increases as the length of the acyl chains increases and the unsaturation decreases, which leads to a more ordered structure and a decrease in fluidity. Perturbations of the bilayer, such as increased hydrostatic pressure, lowering of the temperature, or addition of sterols to phospholipids, decrease both fluidity and the area of a lipid molecule (Shinitzky 1984).

PLs are regarded as a primary structural element of biological membranes and can pass through a variety of different phase organizations depending on temperature, pressure, degree of hydration and the chemical composition of the PL itself (Beney and Gervais 2001). The major PL in the yeast cell is phosphatidylcholine (PC, ~33% of total PL) but it only represents ~11% of the total PL of the plasma membrane (Tuller et al. 1999). The proportion of PC in other subcellular membranes is around 33–40% of total PL. Consequently, the yeast plasma membrane contains mainly phosphatidylserine (PS, ~32%), phosphatidylinositol (PI, ~27%), phosphatidylethanolamine (PE, ~25%) and phosphatidic acid (PA, ~3%), asymmetrically distributed across the bilayer of the membrane. Generally, the inner leaflet of the *S. cerevisiae* plasma membrane is enriched with PE, PI and PS, while the external leaflet is enriched with PC and sphingolipids (Van der Rest et al. 1995).

Sterols are essential lipid components of eukaryotic membranes and have been shown to be responsible for a number of important physical characteristics of membranes. The main fungal sterol is ergosterol, found between 90 and 98% of total sterols in the plasma membrane (Zinser et al. 1993).

The aim of this study is to analyse the damage to yeast produced by extended storage in poor conditions. To achieve this we analysed the viability and vitality of the same ADWY in two different batches, a damaged one that was opened and exposed to air for 2 years, and a new one, as a control. Yeasts were also recovered in an optimal medium to evaluate the extent of the damage and the recoverability of the cells. As membrane damage was expected, different membrane indicators were tested for viability and the cell lipid composition was analysed.

Material and methods

Strain and growth media

Two identical lots of the ADWY *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand S.A., Canada) were used; one was used after poor storage conditions (seal opened for two years at 4 °C) and the second was stored unopened. The two ADWY were analysed after rehydration according to the manufacturer's instructions (30 minutes in water at 37 °C) and after recovery overnight in optimal medium, YEPD (glucose 20 g/L, peptone bacteriological 20 g/L and yeast extract 10g/L). The yeast was grown in Erlenmeyer flasks (500 mL), filled with 120 mL of the medium and fitted with cotton, and was incubated at 25 °C and 150 rpm. The total population inoculated in each flask was 2×10^6 cells/mL determined by counting under the microscope. All the experiments were done in triplicate.

Cell counting and vitality assays

Culturability

Cell culturability was determined after plating on a YEPD agar using an automatic spiral plater (AES Laboratoire, Combourg, France). Colony forming units (CFU) were counted using the ProtoCOL SR/HR counting system software version 1.27, supplied by Synbiosis (Cambridge, UK).

Microscopic counting

Cell viability was determined under the microscope by two methods. The first method was staining with methylene blue (0.01% w/v methylene blue, 2% w/v sodium citrate dehydrate in phosphate buffer saline, PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4). The second was using the commercial kit LIVE/DEAD Bac-Light (Molecular Probes, USA) reported by Zhang and Fang (2004). The intensities of SYTO 9 and propidium iodide (PI) were monitored at 480/500 nm (Excitation/Emission) and 488-540/617 nm, respectively (Haugland 1996). The sample was prepared by mixing 0.5 mL of cells (1×10^7 cells/mL) with 1.5 mL SYTO 9 and 0.7 mL PI. The sample was homogenised and the total population was counted under clear field. SYTO 9 penetrates all cells regardless of their viability, whereas PI stains only non-viable cells with damaged membrane integrity. So viable cells emit green fluorescence and damaged cells red-orange fluorescence.

Vitality assay

To measure cell vitality a *Bac-Trac*® 4300 microbiological analyser (SY-LAB Instruments, Austria) was used. It measures the electric impedance produced by a solution of KOH (0.02%). This impedance decreases due to reaction between KOH and the CO₂ produced by the yeast. 5 mL of YEPD were inoculated with 10×10^6 Yeast cells in an open vial that allowed CO₂ to contact the KOH solution. The impedance level was monitored every 10 minutes by *Bac-trac* and a curve expressing the percentage decrease in impedance over time was drawn. Cell vitality was expressed as the time needed (in hours) to reach maximum fermentation rate at 13 °C, considered as the point where 50% decrease in total impedance was reached. We worked at this low temperature because metabolism was slower and differences in vitality were clearly shown. As a reference the same assay was performed at 25 °C. Viability and vitality assays were carried out in triplicate.

Determination of total yeast FA

Sedimented cells (5×10^8 cells/mL) were placed in sealed tubes with a Teflon-lined screw cap and saponified using 1 mL of 5% NaOH in 50% methanol/water (Rozès et al. 1992). The tubes were placed in a dry bath (100 °C) for 30 minutes. Then the saponified material was cooled at room temperature and 2 mL HCl 6 mol/L was added. Free FAs were extracted by the addition of 0.5 mL hexane/methyl tert-butyl ether (MTBE) (1:1, v/v). Each tube was twice vortexed for 30 seconds. The organic phase was collected after centrifugation (1,300 g, 3 min).

Analytical gas chromatography was performed on a Hewlett-Packard 6850 (Agilent Technologies). One µL of cellular extract was injected (splitless, 1 min) into an FFAP-HP column (30m x 0.25mm x 0.25µm from Agilent) with an HP 6850 automatic injector. The initial temperature was set at 140 °C and increased by 4 ° C/min up to 240 °C. The injector and detector temperatures were 250 C and 280 °C, respectively. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.7 mL/min. Heptanoic and heptadecanoic acids (10 and 40 mg/mL, respectively) were added as internal standards before the saponification of cells. Relative amounts of fatty acids were calculated from their respective chromatographic peak areas. These values were related to the dry weight of cells and expressed as a percentage of the total fatty acid extracted.

Lipid composition of cells

Prior to lipid extraction, a solution of 100 μL of cold methanol and 10 μL of EDTA 0.1 mol/L was added to yeast cells (15-20 mg dry mass) with 1 g of glass beads (0.5 mm, Biospec Products) in Eppendorf's tubes and then mixed for 5 minutes in a mini-bead-beater-8 (Biospec Products, Qiagen). Lipid extraction was performed by five steps, four steps with 300 μL chloroform/methanol (2:1, v/v, for 1 hour) and the fifth with 300 μL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) overnight. Both organic phases were transferred to a 15 mL glass screw-cap tube and cleaned up twice by adding KCl 0.88% (one-fourth of the total volume of the extract). After vortexing and cooling at 4 °C for 10 minutes, the samples were centrifuged at 1,000 g for 5 min. The organic phase was collected and finally concentrated to dryness under a nitrogen stream. The residue was dissolved in chloroform/methanol (2:1, v/v) and stored at -80 °C until analysis.

Yeast neutral lipid (NL) composition by thin-layer chromatography (TLC)

The neutral lipid composition of yeasts was separated by one-dimensional TLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20cm, 250 μm) (Merck, Germany). The plate was developed in two steps with (i) hexane, methyl tert-butyl ether (MTBE), glacial acetic acid (70:30:3, v/v/v) to the half of the plate and (ii) hexane to 9.5 cm. The standard lipids (lanosterol, ergosterol, squalene, cholesteryl oleate, ethyl oleate, diolein, triolein, all purchased from Sigma) were applied to every plate in the range of 1-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. After TLC, lipids were charred with 10% CuSO₄ in 8% H₃PO₄ and heated at 180 °C for 4 min on a TLC Plate Heater (CAMAG). An image of the plate was acquired with Image Scanner (Amersham Biosciences). Each spot of the image was quantified as integrated optical densities (IOD) with Quantity One software (Bio-Rad) and the calibration curves were constructed by plotting the IOD of the lipid standard *versus* the amount of lipid loaded.

Separation and quantification of the yeast PL by TLC

The yeast extract phospholipids were separated by one-dimensional TLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20 cm, 250 μm) with chloroform:acetone:methanol:glacial acetic acid:water (50:15:10:10:5, v/v/v/v/v). After charring the plate with 10% CuSO₄ in 8% H₃PO₄ and heated at 180 °C for 4 min, PL were identified by known standards purchased from Sigma (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL) and

phosphatidic acid (PA). To quantify PL, calibration curves were constructed from the application of standards to every plate in the range of 1-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Fluidity measurements

The fluidity of the yeast plasma membrane was measured in whole cells using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, Sigma) as a fluorescent probe reporter. The yeast cells were harvested, washed twice with PBS buffer and resuspended in 10 mL of PBS buffer to a density of 1×10^7 cells/mL. The cells were incubated after adding 50 μL of DPH stock solution (5×10^{-4} mol/L diluted in tetrahydrofuran, Sigma) at 25 °C without light. After 45 min of incubation under agitation, samples were then placed in the stirred and thermostatted cuvette holder of the spectrofluorometer (Varian). The temperature was maintained by circulating water from a thermostatically controlled bath. The excitation and emission wavelengths were 355 nm and 425 nm, respectively. The degree of fluorescence polarisation (p) was calculated according to Ansari et al. (1993), using the following equation: $p = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2 GI_{VH}}$ with $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$ where I is the corrected fluorescence intensity, and subscripts V and H indicate the orientation (vertical or horizontal) of the excitation and analyser polarizers. For each measurement, fluorescence intensities were corrected by subtracting the intensity of light measured both with unlabelled cells in PBS buffer and with DPH in PBS buffer without the cells.

Statistical data processing

The statistical treatment of the data was analysed by using the SPSS 13 software package. Analysis of variance (ANOVA, Tukey test) was used to determine differences among different treatments and ADWY origin (the statistical level of significance was set at $P \leq 0.05$). Correlation matrixes of variables were also calculated using the same statistical program by the method of Pearson.

Results

Effects of storage upon viability, vitality and fluidity

The viability of the rehydrated ADWY (RY) was tested by plating and by optical microscopy. In the optical microscopy the counting included total cells, cells not stained by methylene blue and fluorescence after treatment with propidium iodide. The different methods allowed us to

discriminate among those cells able to show membrane selectivity (propidium iodide) and cell activity (methylene blue), which is considered as the viable population, and those that were able to sustain growth and form a colony, named as culturable population. As can be seen in Table 1, the values obtained by the two microscopy methods to evaluate cell membrane integrity and cell activity yielded similar values, which may differ from those obtained by plating, thus indicating the different cell capabilities tested. The results showed a considerable lack of cell viability after the drying process and this brought the culturable population down to 55% after rehydration in the best conditions (control RY). However, viable cells were up to 75% of the total population. For the stored RY the values after rehydration showed a clear decrease in the viable population, measured as either viable (43%) or culturable (13%) populations. Recovery was clear after overnight growth in the optimal medium (YEPD), yielding cells that were able to grow in the same range as those that were able to exclude or eliminate optical or fluorescent dyes, with values ranging between 84% and 92% (Table 1). It is noteworthy that the value for the stored RY was very close to the control one, showing a very good recovery after the treatment.

Table 1. Total and viable cell estimation by different methods (percentage of viable/total cells)

	Total cells Optical microscopy (cells/mL)	Viability		
		Methylene blue (cells/mL)	Fluorescence (cells/mL)	Plate Counts (CFU/mL)
Control RY	$3.03 \pm 0.96 \times 10^9$	$2.27 \pm 0.82 \times 10^9$ (74.7)	$2.37 \pm 0.52 \times 10^9$ (78.0)	$1.67 \pm 0.05 \times 10^9$ (55.1)
Stored RY	$1.80 \pm 0.39 \times 10^9$	$7.73 \pm 0.96 \times 10^8$ (43.0)	$7.67 \pm 0.88 \times 10^8$ 10^8 (43.0)	$2.42 \pm 0.04 \times 10^8$ (13.4)
Control recovered	$7.13 \pm 0.18 \times 10^7$	$6.13 \pm 0.11 \times 10^7$ (86.0)	$6.60 \pm 0.32 \times 10^7$ (92.5)	$6.44 \pm 0.08 \times 10^7$ (90.2)
Stored recovered	$6.20 \pm 0.28 \times 10^7$	$5.37 \pm 0.18 \times 10^7$ (86.6)	$5.23 \pm 0.14 \times 10^7$ (84.4)	$5.31 \pm 0.03 \times 10^7$ (85.7)

The yeast vitality measured by the change of impedance as a result of the fermentative activity showed a different degree of alteration according to the temperature used to test this parameter (Fig. 1). The stored RY behaved in a similar way to the control at 25 °C, which may be considered as being within the optimal range for yeast fermentation activity. However, the effect of a limiting temperature upon cell vitality was evident and significant. In all the cases the carbon dioxide release was clearly much faster at 25 °C than at 13 °C, and at this low temperature the cell fitness became more evident. At the lowest temperature the differences due to the age of the ADWY were clearly significant, with the stored RY being considerably slower than the control. The recovery resulted in good vitality in all cases. The

recovery effects were only seen in the stored yeast at 25 °C, whereas at limiting temperature the differences were in both cases significant. It is noteworthy that at low temperature the recovered stored cells performed better than the control, suggesting that the fewer cells that are able to recover in the stored ADWY are more active after recovery from the storage stress.

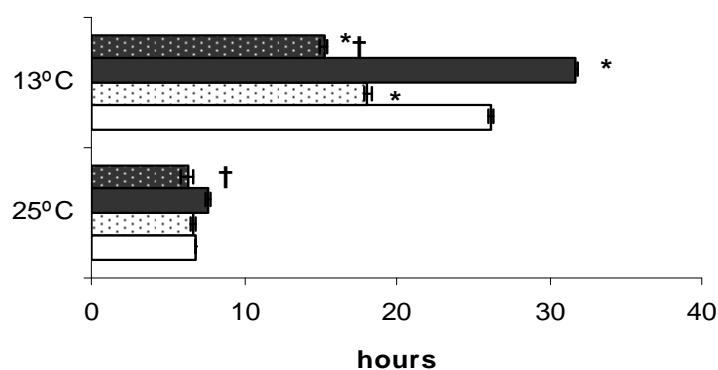


Fig. 1 Yeast fermentation capacity measured by impedance change, expressed as hours to reach 50% of the total change. Control RY (□) and Recovered (◻), Stored RY (■) and Recovered (◼) were analysed at 13 °C and 25 °C. * Significant differences due to storage; † Significant differences due to the recovery. $P \leq 0.05$

Further analysis of the storage damaging effects was done by the changes in membrane fluidity of whole cells by using hydrophobic DPH fluorescent probe (Fig. 2). The polarisation degree is higher when the membrane is less fluid, and, as expected, at low temperatures (13 °C vs. 25 °C), when phospholipids become more rigid. These differences were evident in all the cases except in the stored RY, where the physical state of the plasma membrane yielded the same polarisation degree values at both temperatures. At one temperature tested at least, there were significant fluidity differences between recovered and rehydrated cells of both ADWY. The stored RY fluidity was different from the control at both temperatures. The highest fluidity corresponds to control RY. Interestingly enough, two recovered yeasts (control and stored RY) showed the same polarisation degree whatever the measuring temperature used. Thus, it is rather clear that the reduction in viability, vitality (whichever form is analysed) and membrane fluidity are concomitantly affected by of storage, and that all these parameters can be recovered after overnight growth in an optimal medium.

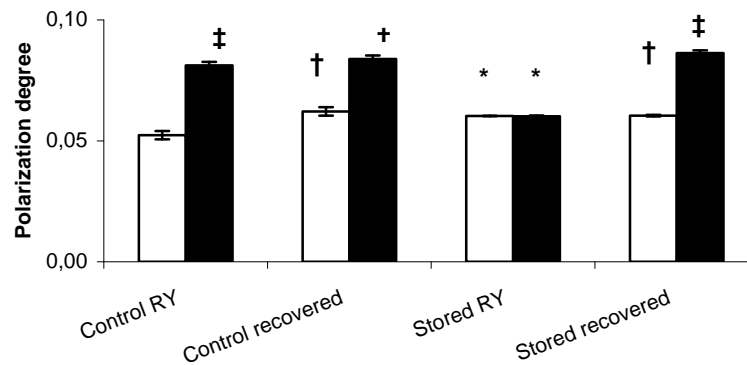


Fig. 2 Changes in the polarization degree measured at 25 °C (□) and 13 °C (■). * Significant differences due to storage; † Significant differences due to recovery and ‡ significant differences due to temperature. $P \leq 0.05$

Effect on the cell lipid composition

Storage clearly reduced the unsaturation degree of the FA (Table 2) due to a significant increase of C16 concentration, without differences in the total FA content. Moreover, the content of medium-chain fatty acid (MCFA, C10 to C14) significantly increased in stored RY. However, the effect of recovery on total FA content was similar in both groups insofar as there was a significant twofold increase. In the control RY the increase in total FA did not change the relative proportions among the different FA (only a couple of significant changes in minority medium-chain FA). However, in the stored RY there were more significant changes due to recovery. Recovered stored yeasts showed significantly higher UFA and lower SFA contents than the stored RY. This was the result of the significant reduction in the relative amounts of palmitic (C16) and stearic (C18) acids and the increase in palmitoleic acid (C16:1). Also chain length was significantly reduced in this case.

Table 2. Total yeast fatty acid composition. Fatty acids are expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight and are the mean \pm Standard Error of the Mean

	Control		Stored	
	RY	Recovered	RY	Recovered
C10	nd	0.79 \pm 0.05	0.17 \pm 0.03	1.26 \pm 0.15 ^{ab}
C12	0.13 \pm 0.02	1.10 \pm 0.04 ^b	0.32 \pm 0.04	1.00 \pm 0.23
C14	0.13 \pm 0.02	0.85 \pm 0.06 ^b	0.46 \pm 0.09	0.69 \pm 0.13
C16	18.61 \pm 0.28	41.37 \pm 3.80 ^b	27.10 \pm 0.55 ^a	31.02 \pm 3.35 ^a
C16:1	28.08 \pm 0.90	61.62 \pm 2.68 ^b	25.03 \pm 1.05	66.67 \pm 7.7 ^b
C18	8.19 \pm 0.26	17.82 \pm 0.79 ^b	11.14 \pm 0.41 ^a	6.56 \pm 0.58 ^{ab}
C18:1	28.57 \pm 1.80	59.38 \pm 1.72 ^b	29.40 \pm 1.3	45.99 \pm 6.6 ^{ab}
LC	16.86 \pm 0.02	16.78 \pm 0.18	16.83 \pm 0.01	16.60 \pm 0.01
SFA (%)	32.06 \pm 0.62	32.34 \pm 0.85	40.88 \pm 0.82 ^a	24.67 \pm 0.78 ^{ab}
UFA (%)	67.63 \pm 0.629	66.18 \pm 0.67	58.11 \pm 0.91 ^a	73.42 \pm 0.69 ^{ab}
Total FA	83.70 \pm 3.11	182.93 \pm 4.04 ^b	93.62 \pm 2.96	153.19 \pm 18.65 ^b

^a Significant differences due to storage; ^b Significant differences due to recovery; $P \leq 0.05$. RY, Rehydrated Yeast; n.d, not detected. ChL: Chain length; SFA, Saturated Fatty Acids, UFA: Unsaturated Fatty Acids.

The cell sterols were significantly lower in the stored RY as compared to the control (Table 3). This reduction was consistent with a reduction in all the sterols, yet a significant increase in sterol esters was observed in the stored RY. No differences were observed in the total triacylglycerols (TAG). The effect of an overnight recovery led to a significant increase in both total amounts of sterols and TAG. Although both groups increased their amounts, the recovery effect did not yield similar amounts between the two recovered yeasts, probably due to the lowest concentrations in the stored ones. However, the recovery tendencies in total amounts of sterols and TAG were very similar in all the cases, except for sterol esters, which reached similar amounts in both recovered cells.

Table 3. Total yeast sterol, squalene, sterol ester and triacylglyceride composition expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight.

	Control		Stored	
	RY	Recovered	RY	Recovered
Squalene	2.42 ± 0.12	4.24 ± 0.08 ^b	0.93 ± 0.04 ^a	1.83 ± 0.23 ^{ab}
Lanosterol	2.81 ± 0.14	3.94 ± 0.10 ^b	0.67 ± 0.06 ^a	1.02 ± 0.03 ^a
Ergosterol	8.23 ± 0.14	10.61 ± 0.25 ^b	1.72 ± 0.07 ^a	3.58 ± 0.08 ^{ab}
Sterol esters	2.82 ± 0.08	9.7 ± 0.35 ^b	3.59 ± 0.14 ^a	9.21 ± 0.05 ^b
Total Sterols	16.28 ± 0.09	28.49 ± 0.25 ^b	6.91 ± 0.31 ^a	15.64 ± 0.07 ^{ab}
Total TAG	2.80 ± 0.09	10.89 ± 0.30 ^b	3.08 ± 0.10	6.06 ± 0.08 ^{ab}

Statistical expression as in Table 2. TAG, triacylglycerides.

The PL content was also significantly reduced because of storage (Table 4) and this reduction was due to the similar reduction in all the studied PL levels except those of PC. In the stored RY particularly, the PS and PA contents were 7.3 and 3.7 down-fold respectively. As with the other lipids analysed, the effect of recovery was the significant increase in the overall PL content, which reflected an increase of most of the individual PL. The relative amounts of individual PL showed significant changes compared with the control. PC was in general the main PL, except for the recovered control cells where PE had the maximum concentration. The main difference between the recoveries of the two storage conditions tested was the general and significant increase of all the PL concentrations in the stored yeasts, whereas in

the control ones the significant increases were more selective and significant only in PE and PS, which increased two fold, and CL and PA.

Table 4. Total yeast phospholipid composition expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight

	Control		Stored	
	R _Y	Recovered	R _Y	Recovered
PI	2.90 ± 0.13	3.08 ± 0.17	1.33 ± 0.03 ^a	3.26 ± 0.192 ^b
PS	1.09 ± 0.03	2.11 ± 0.19 ^b	0.15 ± 0.21 ^a	0.91 ± 0.08 ^{ab}
PE	3.68 ± 0.06	7.04 ± 0.08 ^b	2.02 ± 0.09 ^a	4.87 ± 0.12 ^{ab}
PC	4.78 ± 0.15	4.50 ± 0.20	4.47 ± 0.13	6.32 ± 0.16 ^{ab}
CL	2.61 ± 0.02	3.10 ± 0.03 ^b	1.43 ± 0.06 ^a	2.40 ± 0.13 ^{ab}
PA	2.29 ± 0.09	2.90 ± 0.18 ^b	0.62 ± 0.01 ^a	1.54 ± 0.04 ^{ab}
Total PL	17.35 ± 0.14	22.73 ± 0.15 ^b	10.02 ± 0.23 ^a	19.30 ± 0.60 ^{ab}

PI, phosphatidylinositol; PS, Phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine, PC, phosphatidylcholine; CL, cardiolipin; PA, phosphatidic acid; PL, phospholipids. Statistical expression as in Table 2.

According to the correlation matrix (Table 5) carried out with the main variables most representative of this study (12 samples tested), the impedance change at 13 °C showed significant correlations with the saturation FA index. Thus, increased concentrations of UFA had a positive effect on vitality, which was measured in the shorter times for changes in impedance. Similar relations were observed with the PL, with PS and PE having a positive effect on vitality, whilst PC was negative. In agreement with these observations PC was negatively correlated with both PS and PE, both of which correlated positively with one another. Finally, ergosterol showed a strong negative correlation with the concentrations of sterol esters.

Table 5. Correlation between the yeast most relevant parameters

	I.C. 25 °C	I.C. 13 °C	EEST	ERG	PS	PE	PC
I.C. 25 °C	1						
I.C. 13 °C	0.796 **	1					
EEST	-0.038	-0.199	1				
ERG	-0.028	0.150	-0.992 **	1			
PS	-0.473	-0.589 *	-0.558	0.546	1		
PE	-0.433	-0.762 **	-0.002	0.15	0.749 **	1	
PC	0.517	0.626 *	0.583 *	-0.586 *	-0.982 **	-0.756 **	1
SFA	0.777 **	0.893 **	-0.082	0.007	-0.454	-0.452	0.519
UFA	-0.777 **	-0.853 **	0.010	-0.071	0.447	0.395	-0.522

I.C, impedance change (hours); SFA, saturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; EEST, sterol esters; ERG, ergosterol; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

* Significancy level set at $P \leq 0.05$. ** Significancy level set at $P \leq 0.01$

Discussion

It is well known that ADWY storage might cause significant stress to the yeast cell, which can result in extensive cell damage and significant loss of viability and fermentation vigour (Laroche and Gervais 2003). In order to analyse how much an extended storage period would affect ADWY performance, we used very poor conditions of storage (opened seal and two years of storage at 4 °C) to study the combined effect of humidity, oxidative damage, and time length upon vitality, viability and membrane integrity. We also analysed the recovery of the stored ADWY by cultivating them in optimal medium (YEED).

As expected, the cells of the stored RY had reduced viability, which ranged from 13 to 43% according to the method used. Interestingly enough, the two methods to measure viability (fluorescence and methylene blue) yielded similar results, showing that the measures of such methods are equivalent or show equivalent yeast capacities. Instead, culturability, which is directly related to growth capacity of the cells, showed significant differences when measured after rehydration in both control and stored RY. This fact shows that the effect of drying and rehydration *per se* is detrimental to the cells and reduces the cells' ability to reproduce quite considerably, even when the ADWY is freshly produced (Boyaval and Schuck 1994).

Although a good rehydration of ADWY is primordial for highly viable yeast inoculum and for promoting a quick fermentation start (Becker and Rapoport 1987), the storage conditions and the use of freshly produced batches can affect yeast fermentative ability, especially in stressful conditions. Previous studies showed that dehydrated yeasts had damaged plasma membranes leading to higher membrane permeability during rehydration (Rapoport et al. 1995), and this could partially be restored by supplementing Inactive Dry Yeast to repair damaged cellular membranes (Soubeyrand et al. 2005) and to allow yeasts to rapidly initiate the fermentation. However, when rehydrated yeasts are left to grow overnight in an optimal medium, in both cases (control and stored ADWY) the recovery is very significant and almost total, reaching in all cases over 85%. It is noteworthy that after YEED growth the three methods used to analyse viability yielded very similar results, which confirms the term recovery for the growth in YEED. These effects were also confirmed by analysing the vitality of the cells. However, although YEED could be a proper medium to recover cells with higher fermentation ability at the laboratory-scale, in oenological terms, this practice is not feasible as the principal commercial characteristics are lost. However, in the cellar the wide spread

practice of the “*ped-de-cuve*” could be used for cell recovery. Nevertheless, it gives us a good model to analyse yeast recovery.

The damage process probably involves different levels of action, with the cell membrane being one of the first “*targets*” of the combined stress (Laroche et al. 2001), as it is clear from the anisotropy measurements. It is relevant that in all the cases the response to the change in temperature is to increase the anisotropy or to decrease the fluidity of the membrane at low temperature, except in the case of the stored RY. The main reason for this lack of response must be the lipid composition of the cell membrane, which could be the first element affected by storage stress. Thus, cell lipid composition was analysed in order to note the relevance of lipid metabolism upon cell stress and recovery.

The effect of cell recovery was first analysed on the fatty acid composition. In this case the choice of “*recovery*” medium is important. Yeast Extract is the product of the water soluble components of the yeast cell and does not contain any lipid substances. Nevertheless, the total fatty acid composition was higher in the recovered cells than in the RY. Although the recovered control yeasts showed identical percentages in the relative individual fatty acid composition as the control RY, the recovered stored cells showed different relative FA amounts and proportions than the stored RY. The decrease in UFA content of the stored RY was mainly due to the decrease in C16:1. Several processes may cause the dramatic changes in the stored RY compared to the control: (i) an oxidation process, (ii) structural membrane damage and (iii) a hydrolysis of the membrane constituents. They could interact between themselves. Firstly, a non-enzymatic reaction involving reactive oxygen species (ROS) induced by water stress could induce the formation of MCFA glycerol-bound oxidation compounds from oxidation of monomeric TAG (Velasco et al. 2004). Secondly, another possibility would be the result, associated or not with an oxidation process, of structural membrane damage. This fact was well related to a loss of ergosterol and phospholipid content. Thirdly and finally, the drastically decreased content of PS, normally found in the inner leaflet of plasma membrane, of recovered old yeast associated with a weak viability, could point towards either a translocation of the PS from the inner to the outer leaflet or a loss of plasma membrane integrity during storage. In yeast, apoptotic cell death was triggered by various factors such as H₂O₂, cell aging, UV irradiation, and was characterized by a loss of membrane asymmetry (Laun et al. 2001; Del Carratore et al. 2002; Herker et al. 2004). Furthermore, of the results obtained, it is noteworthy that the loss of plating efficiency in both

RY could be related to a high ergosterol/PS ratio. It was 7.6 and 11.5 for the control and stored RY respectively whereas it was 5 and 3.9 for the control and stored recovery yeasts respectively. Not only is the PL localization into the plasma membrane important but surely the relation between ergosterol and some polar PLs allows cells to maintain plasma membrane integrity.

Interestingly enough a positive correlation was observed between cell vitality at 13 °C and the high percentage of some lipids. Among them, UFA, PS and PE are the lipids which best to allow cells to conserve (i) adequate fluidity and (ii) living asymmetric distribution of aminophospholipids at low temperature. If a high UFA content was known to allow yeast to maintain good homeoviscosity in membrane cells at low temperature (Torija et al. 2003), then the effects of PS and PE had not yet been described.

The recoveries in this experiment were carried out in aerobic conditions and, consequently, fewer medium-chain fatty acids and higher unsaturated fatty acids and ergosterol amounts were obtained (Suomalainen and Lehtonen 1979). Sluggish and stuck fermentations could be prevented in various ways: strong aeration, enrichment of the medium with UFA or inoculation of the precultured cells (Bardi et al. 1999). Nevertheless, it is noteworthy that both recovered yeasts have sterol ester (STE) and TAG levels higher than ones of both RY. Although STE and TAG are considered energy storage molecules, they also play an essential role in the metabolism of acetyl-CoA and fatty acids (Müllner and Daum 2004). Furthermore, this neutral lipid biosynthesis allows cells to neutralize excessive amounts of membrane-perturbing (sterols and FA) and signal-transducing (diacylglycerols) molecules. In summary, the increase in STE and TAG levels in cells grown on YEPD could signify not only an improvement in cell activity but also ensure important lipid storage to fulfil the yeast needs when fermenting grape must in adverse conditions such as hypoxia or low temperatures.

In conclusion, stored ADWY and its recovery in an optimal medium can be a good model for analysing the changes that a regular commercial process (drying, rehydrating or storing) can produce in cell vitality and viability. Furthermore, the effects upon lipid metabolism are extensive during storage and partially repaired during recovery in an optimal medium, which restores the yeast capacity to grow and start fermentation. It is also noteworthy that the vitality at 13 °C as well as good plating efficiency may be related to the PS content of yeast

cells. This behaviour makes the case for better control of PS content and its localization in the yeast plasma membrane to ensure better packaging of ADWY and consequently, to preserve the high viability of yeasts, and could be of practical interest to yeast producers. Despite good practices such as clearly stamping the expiration date on the package, and vacuum storage, foil envelopes can become permeable with time, which finally and slowly contributes to ADWY oxidation. The present study could be a starting point for further investigation into better control of ADWY packaging through better understanding of yeast lipid composition.

Acknowledgments: This work was financially supported by grants from the Spanish government (AGL2004-02307/ALI). Assistance and use of University of Zaragoza facilities for anisotropy measurements by Pilar Mañas and Guillermo Cebrián and the language supervision by the “Servei Lingüístic” of Universitat Rovira i Virgili are greatly appreciated

References

1. Ansari S, Gupta P, Mahanty SK, Prasad R. (1993) Uptake of amino acids by erg mutants of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 31:377-386
2. Bardi L, Cocito C, Marzona M. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. Int J Food Microbiol 47:133-140
3. Becker MJ, Rapoport AI (1987) Conservation of yeasts by dehydration. Adv Biochem Eng Biotechnol 35:127-171
4. Beney L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. Appl Microbiol Biotechnol 57:34-42
5. Boyaval P, Schuck P (1994) Le séchage des microorganismes par atomisation. Industries Alimentaires et Agricoles 111:807-818
6. Carratù L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B(1996) Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3870-3875
7. Daum G, Lees ND, Bard M., Dickson R (1998) Biochemistry cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:1471-1510
8. Del Carratore R, Della CC, Simili M, Taccini E, Scavuzzo M, Sbrana S (2002) Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. Mutat Res 513:83-191
9. Haugland RP (1996) Assays for cells viability, proliferation and function. In: Spence MTZ (ed) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon pp. 365–398
10. Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wising S, Büttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. J Cell Biol 164:501-507
11. Howlett NG, Avery SV (1997). Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 48:539-545

12. Laroche C, Beney PA, Marechal P, Gervais P (2001) The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:249-254
13. Laroche C, Gervais P (2003) Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. *Appl Environ Microbiol* 69:3015-3019
14. Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kolhwein S, Dawes I, Fröhlich KU, Breitenbach M (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 39:1166-1173
15. Müllner H, Daum G. (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol* 51:323-347
16. Rapoport AI, Khrustaleva GM, Ya Chamanis G, Beker ME (1995) Yeast anhydrobiosis: permeability of the plasma membrane. *Mikrobiologiya* 64:275-278
17. Ribéreau-Gayon P, Bubourdiou D, Donèche B, Lonvaud A (2004) *Traité d'œnologie. Microbiologie du vin et vinifications.* Dunod, Paris.
18. Rozès N, Garcia Jares C, Larue F, Lonvaud-Funel A (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J Sci Food Agric* 59:351-359
19. Shinitzky M (1984) Membrane fluidity and cellular functions. In: Shinitzky M (ed) *Physiology of membrane fluidity.* Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, FA, pp. 1-51
20. Sinensky M. (1974) Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:522-525
21. Soubeyrand V, Luparia V, Williams P, Doco T, Vernhet A, Ortiz-Julien A, Salmon JM (2005) Formation of micelle containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity. *J Agric Food Chem* 53:8025-8032
22. Suomalainen H, Lehtonen M (1979) The production of aroma compounds by yeast. *J Inst Brew* 85:149-156
23. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 85:127-136
24. Tuller G, Nemeč T, Hrstnik C, Daum G (1999) Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* 15:1555-1564
25. Van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Bert Poolman B, Konings WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 59:304-322
26. Velasco J, Marmesat S, Márquez-Ruiz G, Dobarganes MC (2004) Formation of short-chain glycerol-bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in used frying fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 106:728-735
27. Zhang T, Fang H. (2004) Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight. *Biotechnol Lett* 26:989-992
28. Zinser E, Paltauf F, Daum G (1993) Sterol composition of yeast organellar membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol* 175:2853-2858

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

CAPÍTULO II

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature

Marian Redón¹, José M Guillamón^{1,2}, Albert Mas¹ and Nicolas Rozès¹

(1) Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

(2) Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, P.O. Box 73, 46100 Valencia, Spain

Submitted to Eur Food Res Technol

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Abstract

The loss of viability of wine yeast strains due to low-temperature fermentations could be overcome by increasing their stress tolerance and adaptability. Changes in membrane lipid composition are one of the first responses to cold stress. The aim of this study was to analyse the various adaptation mechanisms to low temperatures by comparing the better adapted *Saccharomyces* species. The viability, vitality, fermentation capacity and lipid composition of different *Saccharomyces* species (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum* and a hybrid *S. cerevisiae/S. uvarum*) with different fermentative origins (wine, beer and baker's strains together with a laboratory strain) were compared after culturing at low (13 °C) and optimal (25 °C) temperatures. In spite of specific responses of the different strains/species, the results showed that at low temperature the medium-chain fatty acid (MCFA) and the triacylglyceride (TG) content increased whereas the phosphatidic acid content (PA) and the phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine (PC/PE) ratio decreased. Only the laboratory strain was not able to ferment the sugars, and after growing at both temperatures its lipid composition was very different from that of the other strains. The hybrid strain showed the highest sugar consumption at 13 °C and the best vitality whatever the pre-culture temperature used. The rest of the species needed a preadaptation at low temperature involving a change in their lipid composition to improve their fermentation rate at 13 °C.

Keywords Hybrid - Wine - *S. cerevisiae* - *S. bayanus* - *S. uvarum* - Fatty acid - Sterols - Phospholipid

Introduction

From a technological standpoint, one of the greatest advances in the wine industry in recent years has been the ability to control the temperature of fermentation. Temperature control avoids shifts (above 30 °C) that may result in stuck fermentations, and ensures not only a more efficient fermentation process but also products with better sensory quality. Low-temperature fermentations (10-15 °C) prevent the volatilization of primary (varietal) aromas but increase the synthesis of secondary aromas [1-3].

Although alcoholic fermentation at low temperatures has these qualitative benefits, it should be borne in mind that it also has some drawbacks, all of which are due to the difficulty that the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* has to grow at non-optimal temperatures. The optimum temperature for fermentation (or growth) of *Saccharomyces* is between 25-28 °C. Therefore, as well as the inherent difficulty of a wine fermentation (high concentration of sugars, low pH, presence of ethanol, nutrient deficiency, etc.), there is the added difficulty of a temperature that is not optimal for the development of the primary fermentation agent. In recent years, then, we have been interested in the molecular and physiological mechanisms that wine yeasts use to adapt and acclimatize to the low temperature of fermentation. We have conducted comprehensive studies at the transcriptomic [4] and proteomic [5] levels to gain insight into these mechanisms. Our findings show that genes and proteins involved in lipid metabolism are one of the metabolic groups that are most affected by low temperature, and confirm the importance of the changes in the lipid composition of the cellular membranes as an adaptive response.

S. cerevisiae has developed mechanisms to maintain the fluidity of the membrane lipids regardless of the ambient temperature. The most commonly described effect of low temperature is the increase in the degree of unsaturation of fatty acids (FA) [6]. However, this might not be a universal response in yeast. Another way of increasing the fluidity of membrane lipids is to decrease the chain length of these FA [3]. In a recent paper by our group [1], we reported some of these effects during an industrial wine fermentation. A low fermentation temperature increased the degree of unsaturation at the beginning of fermentation and decreased the FA chain length as the fermentation proceeded. The anaerobic conditions imposed during the process prevent the unsaturation of FA. Alternatively, the cell synthesizes MCFA, which reduce the chain length and increase the fluidity of the membrane

[1]. Another strategy used to confirm the importance of these changes in the lipid composition was to incubate a wine strain in the presence of different FA and ergosterol [7]. All supplemented FA were incorporated into the cell and this produced significant changes in the lipid composition. The cells incubated with C16:1 showed higher viability and a significant reduction in the length of fermentation. These cells had a higher C16:1 and ergosterol content, a shorter FA chain length and a higher ratio of sterols/phospholipids (PL).

Although *S. cerevisiae* is the predominant yeast in most fermentation processes, three other species of the *Saccharomyces* genus have also been reported to be involved in wine fermentations. *S. bayanus* var. *bayanus* (according to [8]) has been isolated from beer and *S. bayanus* var. *uvarum* or simply *S. uvarum* [9, 10] has been isolated from wine and cider fermentations [11-13]. Interestingly *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. pastorianus* and *S. kudriavzevii* have been associated with low-temperature fermentation processes in the production of wines, beers and ciders [14-16].

Likewise, *Saccharomyces* interspecific hybrids have been found in various fermentation processes [17]. The first natural *Saccharomyces* interspecific hybrid to be identified was the lager brewing yeast *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*) [18]. Recent studies of *S. bayanus* have also revealed the hybrid nature of certain strains of this species, which has subsequently been subdivided into two groups: *S. bayanus* var. *bayanus*, containing a variety of hybrid strains, and *S. bayanus* var. *uvarum*, which contains non-hybrid strains [19]. In addition, other hybrid strains of *S. cerevisiae* and *S. uvarum* [20], *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* [17, 21, 22], and even triple hybrids *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. kudriavzevii* [23] have also been isolated from fermentation processes.

In the present study, we aimed to analyze the different strategies that industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* use to adapt to low temperatures and to determine whether the response to this stress factor was universal or whether every strain/species had its own. To achieve this aim, we compared the lipid composition of six strains of the *Saccharomyces* genus after growing at optimum (25 °C) and low temperature (13 °C). Furthermore we tested their fermentative and growth behaviour at low temperature. These strains were three *S. cerevisiae* (one wine strain, one baker's strain and a laboratory strain), the type strain of *S. bayanus* (isolated from beer), a *S. uvarum* strain (isolated from wine) and a hybrid *S. cerevisiae* x *S. uvarum* (also isolated from wine).

Material and methods

Strain and growth media

The strains used in this study were: the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (EUROSCARF collection, Frankfurt, Germany), the commercial wine strain *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand S.A., Canada), the commercial baker's *Saccharomyces cerevisiae* strain Plus Vital (Lesaffre), the type strain of *Saccharomyces bayanus* (CECT 11035; CBS 380; isolated from beer), the *Saccharomyces uvarum* PJP3 (isolated from wine [24]) and the hybrid *S. cerevisiae/S. uvarum* 14a (isolated from wine [25]).

These strains were cultured, respectively, in YEPD medium (glucose 20 g/L, peptone bacteriological 20 g/L and yeast extract 10 g/L, Cultimed, Barcelona, Spain) at two different temperatures: 25 °C and 13 °C. The yeasts were grown in Erlenmeyer flasks (500 mL), filled with 120 mL of medium, fitted with cotton and agitated at 150 rpm. Samples for lipid analysis were taken when the cultures were in the stationary phase (24 hours for the cultures incubated at 25 °C and 48 hours for the low-temperature cultures).

Viability, vitality and fermentation capacity assays

Cell viability was determined after growth at both temperatures by plating on YEPD agar using an automatic spiral plater (AES Laboratoire, Combourg, France). Colony forming units (CFU) were counted using the ProtoCOL SR/HR counting system software version 1.27, supplied by Synbiosis (Cambridge, UK). Yeast growth was also measured by Optical Density (OD) at $\lambda = 600$ nm.

The same sampling point used for lipid analysis was also used to measure cell vitality with a *Bac-Trac*[®] 4300 microbiological analyzer (SY-LAB Instruments, Austria). This device measures the electric impedance produced by a solution of KOH (0.02%). This impedance decreases due to reaction between KOH and the CO₂ produced by the yeast. 5 mL of YEPD were inoculated with 10×10^6 yeast cells in an open vial that allowed CO₂ to contact the KOH solution. The impedance level was monitored every 10 minutes by *Bac-Trac* and a curve expressing the percentage decrease in impedance over time was drawn. Cell vitality was expressed as the time it took (in hours) to reach the maximum fermentation rate at 13 °C and at 25 °C, considered to be the point at which total impedance decreased by 10%.

Fermentations were carried out in a synthetic grape must (pH 3.3) as described in [26] without anaerobic factors and with 200 g/L of reduced sugars (100 g/L glucose and 100 g/L fructose). Fermentations took place at 13 °C with gentle agitation (150 rpm) in 250 mL flasks filled with 200 mL of synthetic grape must. The population inoculated in every flask was 2×10^6 cells/mL of a different yeast previously grown in YEPD at 25 °C or at 13 °C. Density was measured daily and sugar consumption was analysed using enzyme kits (Roche Applied Science, Germany). Fermentation was considered to be finished when the residual sugars were below 2 g/L.

Determination of total yeast FA of YEPD precultured cells

Sedimented cells (5×10^8 cells/mL) were placed in sealed tubes with a Teflon-lined screw cap and saponified using 1mL of 5% NaOH in 50% methanol/water [27]. The protocol was followed as detailed in Redón et al. [7]. The analysis was performed on a gas chromatograph Hewlett-Packard 6850 (Agilent Technologies) using the same protocol as above.

Lipid composition of YEPD pre-cultured cells

Prior to lipid extraction, a solution of 100 μ L of cold methanol and 10 μ L of EDTA 0.1 mM was added to the yeast cells (15-20 mg dry mass) with 1 g glass beads (0.5 mm, Biospec Products) in Eppendorf and then mixed for 5 minutes in a mini-bead-beater-8 (Biospec Products, Qiagen). Lipid extraction was performed according to the protocol detailed in Redón et al. [7].

Yeast neutral lipid (NL) composition by thin-layer chromatography (TLC)

The NL composition of yeasts was separated by one-dimensional TLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20 cm, 250 μ m) (Merck, Germany). The plate development and standards were set as in Redón et al. [7]. The image of the plate was acquired with Image Scanner (Amersham Biosciences). Each spot of the image was quantified as integrated optical densities (IOD) with ImageJ software (a public domain, Java-based image processing program developed at the National Institute of Health). Calibration curves were constructed by plotting the IOD of the lipid standard *versus* the amount of lipid loaded.

Separation and quantification of the PL yeast by HPTLC

The yeast extract PL were separated by one-dimensional HPTLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20cm, 200 µm) with chloroform:acetone:methanol:glacial acetic acid:water (13:3:2:2:1, v/v/v/v/v). The protocol for analysis was as in Redón et al. [7].

Statistical data processing

All the YEPD cultures were performed at both temperatures (25 °C and 13 °C) in biological triplicates. The data were statistically processed using the SPSS 17 software package. By analyzing variance (ANOVA, Tukey test) we determined the differences among the different strains by using the wine strain QA23 as control (the model strain used in our previous studies). We also tested the differences between both temperatures in the same strain (the statistical level of significance was set at $P \leq 0.05$). Principal Component Analysis (PCA) was also constructed using the same statistical program.

Results

Growth and fermentation kinetics

The growth of the different yeast strains was monitored during the YEPD cultures by Optical Density (OD) and plating. The maximum population and the generation time (GT) (calculated from the OD data) of each strain at both temperatures are shown in Table 1. This point of maximum OD was used to inoculate a synthetic grape must and monitor wine fermentation at 13 °C. Fermentation rate was expressed as the time needed for the different strains to ferment 5% (T5), 50% (T50) and the total sugars (T100) of the synthetic must (Table 1).

No significant differences in the maximum population or the generation time (GT) were observed at 25 °C among the different strains. The effect of temperature was similar in all the strains and at the low temperature there was a general increase in GT. Only the laboratory strain showed a significant difference with respect to the other strains at 13 °C, having the smallest population and the longest generation time. The growth rate of this strain was clearly impaired by low temperature. All the industrial strains showed the same GT and similar population sizes.

Significant differences were observed in the fermentation activity with the precultured strains at 25 °C and 13 °C. The fermentation capacity of the hybrid strain was the best after growth at

25 °C; however, *S. uvarum* and the baker's strain had slower T5, T50 and T100 than the control strain (QA23). The laboratory strain led to the least successful fermentation, which did not finish. Nevertheless, when the preculture was carried out at 13 °C, considerable differences were observed and the changes induced depended on strains and species. Thus, *S. bayanus*, the baker's strain and the hybrid showed better T50 and T100 than the wine strain *S. cerevisiae* (QA23). *S. uvarum*, which fermented slower than *S. cerevisiae* QA23, had the same fermentation performance when preadapted at the same temperature.

Table 1. Growth and fermentation kinetics of the *Saccharomyces* strains: OD max (maximum optical density), GT (generation time), viability after growth at 25 °C and 13 °C and fermentation kinetics expressed as the time taken to ferment 5% (T5), 50% (T50) and 100% (T100) of the sugars in a synthetic grape must at 13 °C expressed as mean ± SEM (Standard Error of the Mean). ^a Significance of differences was examined by ANOVA ($P \leq 0.05$) and compared with QA23 strain (control) under similar conditions. ^b Significant differences due to temperature. sf (stuck fermentation).

	Growth		Viability	Fermentation 13 °C			
	25 °C	OD ₆₀₀ max ± SEM	GT(h) ± SEM	(cfu/mL ± SEM)(x 10 ⁸)	T5(h) ± SEM	T50(h) ± SEM	T100(h) ± SEM
<i>S. cerevisiae</i> (BY4742)		11.72 ± 0.2	2.47 ± 0.02	2.22 ± 0.15	47.59 ± 3.2 ^a	526.73 ± 4.6 ^a	sf
<i>S. cerevisiae</i> (QA23)		11.65 ± 0.16	2.23 ± 0.16	2.13 ± 0.17	40.01 ± 1.6	192.92 ± 3.7	362.82 ± 11.2
<i>S. bayanus</i>		10.93 ± 0.26	2.42 ± 0.15	2.23 ± 0.13	27.18 ± 4.2 ^a	189.31 ± 3.5	369.45 ± 12.9
<i>S. uvarum</i>		11.42 ± 0.18	2.50 ± 0.17	2.42 ± 0.08	64.81 ± 3.7 ^a	258.34 ± 5.1 ^a	473.38 ± 9.8 ^a
<i>S. cerevisiae</i> (baker's yeast)		10.54 ± 0.30	2.25 ± 0.11	1.93 ± 0.11	57.88 ± 3.5 ^a	232.86 ± 4.8 ^a	427.29 ± 12.3 ^a
Hybrid (<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>)		10.77 ± 0.31	2.30 ± 0.20	2.24 ± 0.10	12.80 ± 2.5 ^a	149.12 ± 3.7 ^a	300.59 ± 13.9 ^a
	13 °C	OD ₆₀₀ max ± SEM	GT(h) ± SEM	(cfu/mL ± SEM)(x 10 ⁸)	T5(h) ± SEM	T50(h) ± SEM	T100(h) ± SEM
<i>S. cerevisiae</i> (BY4742)		5.79 ± 0.21 ^{ab}	20.25 ± 0.38 ^{ab}	0.68 ± 0.11 ^{ab}	119.14 ± 4.1 ^{ab}	601.29 ± 4.2 ^{ab}	sf
<i>S. cerevisiae</i> (QA23)		9.19 ± 0.24	8.28 ± 0.22 ^b	1.74 ± 0.14	16.60 ± 0.8 ^b	177.44 ± 3.7	356.14 ± 8.5
<i>S. bayanus</i>		10.07 ± 0.32	7.50 ± 0.12 ^b	2.07 ± 0.09	15.00 ± 4.2 ^b	143.79 ± 4.7 ^{ab}	304.78 ± 12.4 ^{ab}
<i>S. uvarum</i>		11.07 ± 0.23	6.92 ± 0.20 ^b	2.21 ± 0.16	16.50 ± 3.7 ^b	177.44 ± 5.2 ^b	356.14 ± 12.3 ^b
<i>S. cerevisiae</i> (baker's yeast)		8.88 ± 0.17	7.39 ± 0.07 ^b	1.91 ± 0.11	15.87 ± 3.1 ^b	159.69 ± 4.8 ^{ab}	319.48 ± 10.3 ^{ab}
Hybrid (<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>)		7.98 ± 0.27	6.63 ± 0.32 ^b	2.05 ± 0.08	13.83 ± 2.5	142.92 ± 4.2 ^a	317.09 ± 12.4 ^a

It should be pointed out that the fermentation was quickest to start when the strains of *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. uvarum* were precultured at the same fermentation temperature. This highest fermentation rate was maintained throughout fermentation for the *S. bayanus*, *S. uvarum* and the baker's strain but not for the *S. cerevisiae* wine strain, which showed no significant differences for the T50 and T100. On the other hand the laboratory strain showed the worst fermentation behaviour when the cells came from a 13 °C preculture and fermentations were stuck whatever the preculture fermentation temperature was. Lastly, the hybrid strain showed no significant differences in the fermentation regardless of whether the preculture took place at 13 °C or 25 °C. This strain always showed the best fermentation performance.

We also used a quick, alternative method for measuring yeast vitality (or CO₂ production) of those inocula from precultures at 13 °C and 25 °C. This method consisted of measuring the time it took to reduce the impedance of a KOH solution as a consequence of the CO₂ produced by the cells tested at low temperature (13 °C) (Fig. 1). These results indicated how quickly the different strains started fermentation at low temperature. The only difference observed was that the industrial strains produced more CO₂ than the laboratory strain. In this case, no significant differences were observed between the precultures at 13 °C and 25 °C.

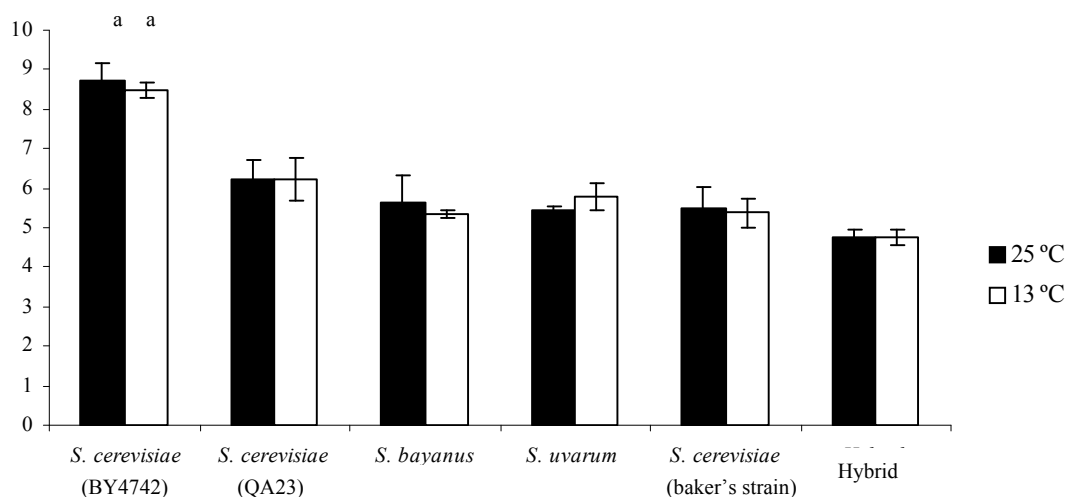


Fig. 1. Yeast vitality at 13 °C measured by impedance change after preculture at 25 °C and 13 °C and expressed as hours taken to reach 10% of the total change. ^a Significance of differences was examined by ANOVA ($P \leq 0.05$) and compared with the control (QA23 strain) under similar conditions. ^b Significant differences due to temperature.

Lipid composition of YEPD precultured cells

The changes in the lipid composition (FA, PL, sterols and triacylglycerides) of the different strains were analysed after the precultures had been carried out at optimum and low temperature (just before they were inoculated in the synthetic grape must).

FA composition

The total FA composition of the cells grown at 25 °C and 13 °C are shown in Table 2. The strains studied adapted their FA composition to the low temperature in different ways. However, significant differences were observed for *S. bayanus* and *S. uvarum* precultured at 25 °C. The former had the lowest total FA concentration and the latter the highest.

The strains studied also had significantly different FA compositions, especially when laboratory and industrial strains were compared. The former contained a higher proportion of MCFA and SFA, and a lower proportion of UFA than the industrial strains whatever the temperature studied. This high SFA content in the laboratory strain was mainly accounted for by a higher proportion of palmitic acid (C16) (results not shown). Worthy of particular mention is that the industrial strains had a slightly higher proportion of UFA in the *S. bayanus* and *S. uvarum* precultured at 25 °C and the hybrid strain, baker's strain and *S. bayanus* precultured at 13 °C than the *S. cerevisiae* wine strain.

The total FA composition of all strains tended to increase as the temperature decreased except *S. uvarum*, the total composition of which remained the same. On the other hand, they all increased their MCFA content at 13 °C. The hybrid strain complemented the increase in MCFA with a decrease in SFA, which resulted in an increase in the UFA/SFA ratio; conversely, *S. uvarum* decreased the UFA. These changes in the degree of unsaturation were mainly accounted for by the increases and decreases in palmitoleic acid (C16:1) (results not shown).

One of the mechanisms for increasing membrane fluidity at low temperature is for cells to increase their MCFA or UFA content. Therefore, UFA/SFA and (MCFA+ UFA)/SFA ratios were also calculated. It is noteworthy that the laboratory strain had the lowest ratios of all strains whatever the preculture temperature. Again, *S. bayanus* (at both preculture temperatures) and *S. uvarum* only at 25 °C, and the baker's and hybrid strains at 13 °C presented higher ratios than the control wine strain (Table 2).

Table 2. Percentages of medium-chain fatty acids (MCFA), unsaturated fatty acids (UFA) and saturated fatty acids (SFA) expressed as the mean \pm SEM (Standard Error of the Mean) of the cellular concentration of fatty acids (FA) (expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight) after growth in YEPD at 25 °C and 13 °C. MCFA is the sum of C8 to C14; SFA is the sum of C16 + C18; UFA is the sum of C16:1 + C18:1. ^a Significance of differences was examined by ANOVA ($P \leq 0.05$) and compared with the QA23 strain (control) under similar conditions. ^b Significant differences due to temperature.

Mean \pm SEM (%)	<i>S. cerevisiae</i> (BY4742)	<i>S. cerevisiae</i> (QA23)	<i>S. bayanus</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (baker's yeast)	Hybrid (<i>S.</i> <i>cerevisiae</i> x <i>S.</i> <i>uvarum</i>)
25 °C						
MCFA	1.31 \pm 0.10 ^a	0.40 \pm 0.11	0.66 \pm 0.06	0.55 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	0.43 \pm 0.09
SFA	33.04 \pm 1.00 ^a	23.54 \pm 0.73	17.17 \pm 1.15 ^a	19.28 \pm 1.26 ^a	20.28 \pm 0.33	22.49 \pm 0.33
UFA	65.65 \pm 1.00 ^a	76.06 \pm 0.69	82.17 \pm 1.13 ^a	80.17 \pm 1.25 ^a	79.41 \pm 0.33	77.07 \pm 0.40
UFA/SFA	1.99 \pm 0.11 ^a	3.23 \pm 0.01	4.78 \pm 0.27 ^a	4.16 \pm 0.20 ^a	3.92 \pm 0.30	3.43 \pm 0.07
(MCFA+UFA)/SFA	2.03 \pm 0.11 ^a	3.25 \pm 0.02	4.82 \pm 0.27 ^a	4.19 \pm 0.20 ^a	3.93 \pm 0.30	3.45 \pm 0.07
Total FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW)	97.20 \pm 1.69	90.49 \pm 4.80	67.37 \pm 5.35 ^a	124.63 \pm 3.02 ^a	80.57 \pm 5.55	92.15 \pm 2.27
13 °C						
MCFA	2.81 \pm 0.07 ^{ab}	1.50 \pm 0.25 ^b	1.44 \pm 0.14 ^b	1.57 \pm 0.19 ^b	1.09 \pm 0.18 ^b	1.09 \pm 0.05
SFA	30.39 \pm 0.75 ^a	25.25 \pm 1.39	20.00 \pm 0.11 ^a	22.49 \pm 0.73	19.5 \pm 0.17 ^a	17.97 \pm 0.76 ^{ab}
UFA	66.79 \pm 0.69 ^a	73.25 \pm 1.36	78.55 \pm 0.11 ^a	75.94 \pm 0.57 ^b	79.42 \pm 0.23 ^a	80.94 \pm 0.82 ^a
UFA/SFA	2.20 \pm 0.08	2.90 \pm 0.20	3.93 \pm 0.02 ^a	3.38 \pm 0.13	4.07 \pm 0.04 ^a	4.50 \pm 0.24 ^{ab}
(MCFA+UFA)/SFA	2.29 \pm 0.08	2.96 \pm 0.21	4.00 \pm 0.03 ^a	3.45 \pm 0.14	4.13 \pm 0.04 ^a	4.56 \pm 0.24 ^{ab}
Total FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW)	129.91 \pm 6.94	128.01 \pm 5.43	109.49 \pm 7.72	124.30 \pm 5.15	103.80 \pm 6.8	101.28 \pm 4.28

Phospholipid composition

S. bayanus and *S. uvarum* had the highest PL levels when precultured at 25 °C (Table 3). Other differences at optimal temperature were that the laboratory strain, *S. uvarum*, the baker's strain and the hybrid had a higher phosphatidic acid (PA) concentration than the control strain (QA23). Moreover, the hybrid and the laboratory strains presented the lowest CL and PC percentages, respectively. All the industrial strains increased the PC/PE ratio while it decreased in the laboratory strain. On the other hand, at low temperature, few differences were detected among the strains and no clear pattern of change was observed. The laboratory strain showed the highest total PL and PI and the lowest levels of CL and PA at 13 °C. Furthermore, the total PL content increased in *S. bayanus* and the hybrid. *S. bayanus* had higher PC and lower PI percentage than the control strain (QA23) at the same temperature (13 °C) (Table 3).

Table 3. Phospholipid (PL) composition of the different species after growth in YEPD at 25 °C and 13 °C. Percentages of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), cardiolipin (CL), phosphatidic acid (PA) expressed as the mean \pm SEM (Standard Error of the Mean) of the cellular concentration of PL concentration ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$). ^a Significance of differences was examined by ANOVA ($P \leq 0.05$) and compared with the QA23 strain (control) under similar conditions. ^b Significant differences due to temperature.

Mean \pm SEM (%)	<i>S. cerevisiae</i> (BY4742)	<i>S. cerevisiae</i> (QA23)	<i>S. bayanus</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (baker's yeast)	Hybrid (<i>S.</i> <i>cerevisiae</i> x <i>S.</i>
25 °C						
PI	15.79 \pm 0.75	17.24 \pm 0.37	19.36 \pm 0.57	15.78 \pm 0.45	16.66 \pm 0.57	17.8 \pm 1.46
PS	4.87 \pm 0.60	5.42 \pm 0.18	5.76 \pm 0.24	5.62 \pm 0.78	4.58 \pm 0.18	6.49 \pm 0.43
PE	23.54 \pm 0.06	20.94 \pm 0.16	17.32 \pm 0.26	18.14 \pm 0.70	18.38 \pm 0.43	16.09 \pm 0.16
PC	29.07 \pm 1.36 ^a	33.59 \pm 0.61	35.2 \pm 0.78	33.72 \pm 0.34	35.25 \pm 0.24	36.21 \pm 1.02
CL	11.90 \pm 0.23	12.25 \pm 0.25	10.77 \pm 0.17	11.27 \pm 0.10	10.78 \pm 0.14	9.48 \pm 0.03 ^a
PA	14.83 \pm 0.19 ^a	10.57 \pm 0.31	11.59 \pm 0.06	15.47 \pm 0.08 ^a	14.35 \pm 0.30 ^a	13.93 \pm 0.75 ^a
Total PL ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	20.01 \pm 0.50	18.17 \pm 0.53	23.92 \pm 0.39 ^a	22.77 \pm 0.75 ^a	20.05 \pm 0.30	19.27 \pm 0.96
PC/PE	1.23 \pm 0.06 ^a	1.60 \pm 0.03	2.03 \pm 0.05 ^a	1.86 \pm 0.07 ^a	1.92 \pm 0.05 ^a	2.25 \pm 0.07 ^a
13 °C						
PI	24.83 \pm 0.40 ^{ab}	17.01 \pm 1.55	20.99 \pm 1.61	10.71 \pm 0.08 ^{ab}	19.61 \pm 0.99	14.31 \pm 0.57
PS	6.49 \pm 0.12	4.51 \pm 0.61	5.57 \pm 1.66	4.20 \pm 0.62	3.54 \pm 0.48	1.80 \pm 0.15 ^b
PE	25.08 \pm 1.12	27.10 \pm 3.60	20.15 \pm 1.43 ^a	24.84 \pm 1.90	24.06 \pm 1.91	24.77 \pm 0.97 ^b
PC	30.60 \pm 0.39	30.55 \pm 0.75	33.02 \pm 1.08	38.66 \pm 0.93 ^{ab}	33.85 \pm 0.32	35.60 \pm 0.32 ^a
CL	5.53 \pm 0.17 ^{ab}	9.66 \pm 0.28	11.18 \pm 0.17	12.04 \pm 0.37	11.54 \pm 2.33	12.46 \pm 0.41
PA	7.46 \pm 0.11 ^{ab}	10.32 \pm 0.28	9.09 \pm 1.31	9.55 \pm 0.81 ^b	7.33 \pm 0.29 ^{ab}	11.05 \pm 1.27
Total PL ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	29.46 \pm 0.89 ^{ab}	20.81 \pm 0.50	24.85 \pm 1.12 ^a	20.69 \pm 0.29	23.67 \pm 0.69 ^b	24.18 \pm 0.03 ^{ab}
PC/PE	1.22 \pm 0.06	1.13 \pm 0.15	1.64 \pm 0.13	1.56 \pm 0.12	1.41 \pm 0.11	1.44 \pm 0.06 ^b

Comparing the results between the same strains but at different culture temperatures, we observed several changes caused by the low temperature. The total PL content increased when the cells were cultured at 13 °C for the laboratory (1.5-fold), baker's and hybrid strains (Table 3). The PL composition of the laboratory, *S. uvarum* and hybrid strains changed most significantly as a result of the growth temperature (Table 3). The most noteworthy changes were the increases in PI and PC, and the decrease in PA for the *S. uvarum*, and the increase in PE and decrease in PS for the hybrid. Also a noteworthy change was the decrease in the PC/PE ratio at low temperature for all the industrial strains, although only significant for the hybrid.

Sterol and triacylglyceride composition

The NL composition had a completely different pattern in the laboratory strain than in the other industrial strains at 25 °C (Table 4). The percentage of sterol esters (STE) was much lower and the percentage of free sterols much higher than in any industrial strain (except for squalene). Furthermore, total TG was also much higher than in the industrial strains. On the

other hand, *S. bayanus* and *S. uvarum* showed quite different changes: STE were higher than *S. cerevisiae* and free sterols generally lower.

When the preculture was at 13 °C the differences were reduced due to the opposite response between the laboratory strain and the industrial strains. The levels of free sterols were generally lower in the laboratory and control strains, so the differences between them disappeared, and only remained stable in STE and ergosterol (which is unaffected by the temperature). With the exception of the hybrid strain, in which lanosterol and STE are affected by preculture temperature and in opposite direction than the control strain, the other industrial strains tend to present the same values as control yeast. Total TG increases similarly in almost all the industrial strains.

Table 4. Total yeast sterol, squalene, lanosterol, ergosterol, sterol ester and triacylglyceride (TG) composition of the different species after growth in YEPD at 25 °C and 13 °C. Values are the mean percentages of total sterol concentration ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$) \pm SEM (Standard Error of the Mean). Total sterols (ST) (sum of squalene + lanosterol + ergosterol + sterol esters). ^a Significance of differences was examined by ANOVA ($P \leq 0.05$) compared with the QA23 strain (control) under similar conditions. ^b Significant differences due to temperature.

Mean \pm SEM (%)	<i>S. cerevisiae</i> (BY4742)	<i>S. cerevisiae</i> (QA23)	<i>S. bayanus</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (baker's yeast)	Hybrid (<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>)
25 °C						
Squalene	6.72 \pm 0.61 ^a	11.18 \pm 0.01	8.22 \pm 0.06	3.23 \pm 1.87 ^a	4.89 \pm 0.07 ^a	9.7 \pm 0.89
Lanosterol	33.72 \pm 0.20 ^a	22.05 \pm 0.09	15.92 \pm 0.49 ^a	23.27 \pm 1.68	19.19 \pm 1.36	16.43 \pm 0.06 ^a
Ergosterol	38.60 \pm 0.29 ^a	22.37 \pm 0.82	17.99 \pm 0.45 ^a	18.73 \pm 0.24 ^a	23.36 \pm 0.01	23.34 \pm 0.63
Sterol esters	20.96 \pm 1.10 ^a	44.40 \pm 0.73	57.87 \pm 0.88 ^a	54.76 \pm 3.16 ^a	52.55 \pm 1.44 ^a	50.53 \pm 1.58
Total ST ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	18.66 \pm 0.29	24.13 \pm 2.15	31.47 \pm 1.18 ^a	32.82 \pm 1.91 ^a	22.35 \pm 0.71	18.89 \pm 1.89
Total TG ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	19.41 \pm 0.35 ^a	8.72 \pm 0.79	5.31 \pm 0.73 ^a	9.73 \pm 0.10	4.19 \pm 1.23 ^a	11.69 \pm 0.67
13 °C						
Squalene	3.91 \pm 0.20 ^b	4.21 \pm 0.53 ^b	3.13 \pm 0.94 ^b	6.49 \pm 0.45	8.54 \pm 0.76 ^a	6.25 \pm 0.95
Lanosterol	20.80 \pm 1.5 ^b	16.54 \pm 3.81	20.42 \pm 2.18	18.35 \pm 3.13	20.17 \pm 2.32	26.29 \pm 0.1 ^{ab}
Ergosterol	37.69 \pm 2.73 ^a	25.84 \pm 2.36	21.94 \pm 1.77	23.52 \pm 2.08	25.87 \pm 2.28	28.91 \pm 2.17
Sterol esters	37.60 \pm 2.94 ^{ab}	53.41 \pm 1.07 ^b	54.51 \pm 3.01	51.65 \pm 3.40	45.42 \pm 4.72	38.55 \pm 2.12 ^{ab}
Total ST ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	30.92 \pm 0.67 ^b	28.62 \pm 0.39	35.97 \pm 0.41 ^a	37.14 \pm 2.47 ^a	31.22 \pm 0.16 ^b	31.74 \pm 1.47 ^b
Total TG ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$)	19.77 \pm 1.34 ^a	12.54 \pm 0.36 ^b	12.79 \pm 1.15 ^b	14.11 \pm 0.34 ^{ab}	9.41 \pm 0.24 ^{ab}	13.48 \pm 1.44

Principal component analysis

In attempt to point out some features between strains and temperature adaptation according to their lipid composition and fermentative capacity, a principal component analysis (PCA) was performed on the 36 individual samples obtained (6 different strains x 2 temperatures x 3 triplicates) and the 7 most significant variables for the highest possible Kaiser-Meyer-Olkin index (KMO) of sampling adequacy. Two factors with eigenvalues greater than unity were retained, explaining 84.5% of the total variance. Factor 1 explained 65.2% of the variation

and was marked by high positive loadings for SFA (+0.962), T50 (+0.884) and ST/STE (+0.868), and high negative loadings for UFA (-0.957), UFA/SFA (-0.899) and PC/PE (-0.622). Thus, the highest is the UFA content or the relation between UFA and SFA or the ratio PC/PE in the cells, the lowest was the T50. Factor 2 explained 16.7% of the variation and was only marked by a high positive loading for PA (+0.956), which could be interpreted as the effect of the preculture temperature on the PA content. Generally, the cells pre-incubated at high temperature presented a higher PA percentage.

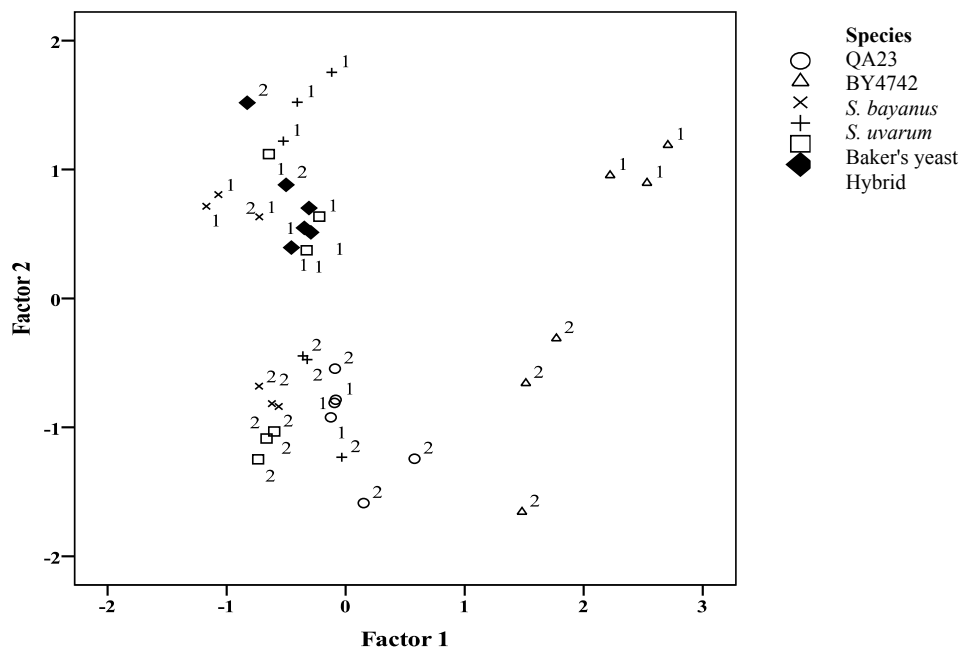


Fig. 2. Plot values of the first two factors of Principal Component Analysis (PCA) according to the species and fermentation temperature, (1) 25 °C and (2) 13 °C.

It is rather evident that three main groups are formed in this PCA (Fig. 2). On one hand, the laboratory strain, situated on the right side of the plane, was clearly separated from the other strains. On the other hand two clusters seemed to be constituted according to the preculture temperature: strains precultured at 25 °C in the upper side and precultures at 13 °C in the bottom side. However, in this latter case, the wine yeast and the hybrid are two exceptions: preculture did not lead to significant differences in the fermentation kinetics in either of them. Thus, the hybrid grouped together with the preculture at high temperature whereas the wine yeast did so at low temperature.

Discussion

The objective of this study was to gain insight into how the lipid composition of different *Saccharomyces* strains was modified as a function of (i) the growth temperature, (ii) the different species of the genus *Saccharomyces* (or a hybrid of these species) and (iii) the specialization or environment of the strains (laboratory, bread, beer and wine strains), and to analyze how the yeast growth temperature affected the fermentation capacity at 13 °C and the cell lipid composition.

Effect of the temperature on the lipid composition

In recent years, industrial interest in determining the influence that temperature can play in the adaptation of *Saccharomyces* species to both wild and fermentative habitats has been increasing [28-30]. Several studies have shown that *S. cerevisiae* is well adapted to grow at higher temperatures, while other species such as *S. bayanus*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* are better adapted to grow at lower temperatures [31]. Unlike other studies by our group, we have used YEPD as growth medium in order to avoid the complexity and adaptation to adverse conditions of grape must (high osmotic pressure, low nitrogen content, etc.) and to ensure that differences are directly connected with the growth temperature. No differences were observed among the various strains as far as the generation time or the maximum population after growth at 25 °C were concerned. The effect of low temperature was to increase the generation time in all the strains by about 3 or 4 times more than at 25 °C. However, the laboratory strain growth was considerably affected by low temperature and the generation time was 10 times higher than at 25 °C while OD and viability were lower than in the other strains. This result again highlights the different robustness of the industrial strains and the laboratory strain.

We also analysed the fermentation behaviour at low temperature with and without a preadaptation period at low temperature. The hybrid proved to be the best adapted for the grape must fermentation, and two other industrial wine yeasts (*S. cerevisiae* and *S. bayanus*) were also much better at fermenting, whereas baker's strain and *S. uvarum* were rather slow fermenters, and the laboratory strain had difficulty in finishing. The preadaptation at low temperature had an effect only on those strains that were clearly slow fermenters and also *S. bayanus*, whereas the two strains that were already adapted to quick fermentation did not improve their fermentation times, which agrees with previous observations made by our

group [32]. Thus, we can presume that the preculture or preadaptation at low temperature gives some advantage to those strains that are not well adapted to ferment at low temperature. Reduced temperatures severely decrease membrane fluidity and permeability which can influence the activities of transmembrane proteins, such as those involved in nutrient uptake [33]. In our previous studies, we observed that this loss of fluidity could be compensated for by two main mechanisms: increasing the UFA or increasing the MCFA [1, 3]. However, we believed that the mechanisms for adapting the membrane composition to different growth temperatures were strain or species-specific so, in this study, we have tested more strains. The general mechanism shown by all the strains studied was an increase in MCFA. Only the hybrid strain increased the UFA content. The preadaptation that led to some improvement in the fermentation kinetics surprisingly showed very little change in the FA composition, so we assumed that, apart from affecting MCFA, changes in FA are not related to any improvement in fermentation behaviour.

The common response of NL to low temperature was an increase in TG in the cells growing at low temperature. TG play the role of neutral storage lipids, together with STE. Their biological toxicity is lower than that of free FA and they provide an efficient and readily accessible sink of these biomolecules [34]. This accumulation of TG at low temperature might be explained by the fact that cells divide more slowly at low temperature (as seen by the longer generation time) and therefore cause an excess of FA which are accumulated in TG. It should be pointed out that some of the strains (hybrid and baker's strains) also increased the concentration of total sterols. We already reported (Redón et al., 2009) a better fermentation performance at low temperature of a strain which increased the ratio sterols/PL. In this work, it is the case for most of the strains studied, more notably for *S. uvarum* and the hybrid strain. Finally, a relevant difference in the changes of lipid composition also affects to the PA content, in which PCA help us to explain most of the adaptation to low temperature. In fact, the strains that do not present any fermentative improvement after growth at low temperature (QA23 and hybrid strains) do not change the content of this PL. Instead, all the other strains have lower the PA content at low temperature.

Differential lipid composition in the strains and species studied

Generally speaking, the strain which showed the greatest differences in its lipid composition was the laboratory strain, as a result of the greater phenotypic differences in growth and fermentation capacity at low temperature. At 25 °C, this strain showed the highest

concentration of MCFA and SFA (and the lowest of UFA) of all the strains studied. The smaller proportion of UFA in the cell membranes may explain the poor fermentation behaviour of this strain because these UFA have been involved in counteracting the toxic effects of ethanol on plasma membrane fluidity [35]. In a previous study we also observed [7] an important reduction in the fermentation length and higher viability for cells enriched in palmitoleic acid (C16:1). Although some authors have also related the cellular ergosterol content to higher viability and fermentation capacity, our results do not support this hypothesis. The laboratory strain with the highest ergosterol concentration showed the lowest viability and the poorest fermentation capacity. Mannazzu et al. [36] also concluded that viability and fermentation activity do not depend on ergosterol content. The laboratory strain also presented the lowest STE percentage at both temperatures. Both STE and TG are two classes of neutral storage lipids. As mentioned above, TG is used as a FA donor and a sink for highly abundant or unusual toxic FA. STE, which form as a critical homeostatic response to the formation of excess amounts of sterols and FA, is involved in detoxification as well as in storage [38]. So, an excess of sterols did not improve the fermentation kinetics at low temperatures and increased the STE of the cell.

PCA is a handy tool for identifying patterns of similarity and differences among different strains in which many data are analysed. PCA has highlighted the differences between the laboratory and industrial strains (factor 1). The main data building up this component are the fermentation capacity at low temperature (T50), higher ratios of UFA/SFA and PC/PE, and a lower ratio of ST/STE. These features were shared by all the industrial strains except the lab strain. Regardless of their origin and species, then, the strains isolated from fermentation processes presented a lipid constitution that was better for performing sugar fermentation. The PCA analysis also separated the strains according to growth temperature. Unfortunately, only the PA content (which was lower in the strains incubated at low temperature) clearly explained this separation. A common change in all the strains tested was the increase in MCFA, which may help to maintain membrane fluidity at lower temperatures. One main trend was a reduction in the PC/PE ratio, although it is not always significant. At low temperature the laboratory strain was a poor fermentative yeast and was always unable to finish the fermentation. This lack of capacity for low temperature fermentation may also be related to its very different lipid composition, which PCA makes very evident. It should be pointed out that most of the adaptation changes are species- or strain-specific, although the

industrial strains share some common trends in lipid composition, which allow them to ferment at suboptimal temperatures.

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the Spanish government (AGL2007-65498-C02/ALI). *Saccharomyces uvarum* PJP3 and the hybrid *S. cerevisiae/S. uvarum* 14a were kindly supplied by Prof. Isabelle Masneuf-Pomarède, ENITA de Bordeaux (France). The authors would also like to thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for checking the manuscript.

References

1. Beltran G, Novo M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2008) Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int J Food Microbiol* 121:169-77
2. Llauradó J, Rozès N, Bobet R, Mas A, Constantí M (2002) Low temperature alcoholic fermentation in high sugar concentration grape musts. *J Food Sci* 67:268-273.
3. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 85:127-136
4. Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamón JM, Mas A, François J, Rozès N (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res* 6:1167-1183
5. Salvadó Z, Chiva R, Rodríguez-Vargas S, Rándež-Gil F, Mas A, Guillamón JM, (2008). Proteomic evolution of a wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8:1137-46
6. Sakamoto T, Murata N (2002) Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr Opin Microbiol* 5:208-10
7. Redón M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2009) Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Eur Food Res Technol* 228:833-840
8. Naumov GI, Masneuf I, Naumova ES, Aigle M, Dubourdiou D (2000) Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res Microbiol* 151:683-691
9. Nguyen HV, Gaillardin C (2005) Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Res* 5:471-83
10. Pulvirenti A, Nguyen H, Caggia C, Giudici P, Rainieri S, Zambonelli C (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol Lett* 192:191-6
11. Naumov GI, Nguyen HV, Naumova ES, Michel A, Aigle M, Gaillardin C (2001) Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int J Food Microbiol* 65:163-171
12. Naumov GI, Naumova ES, Antunovics Z, Sipiczki M (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:727-730

13. Demuyter C, Lollier M, Legras JL, Le Jeune C (2004) Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J Appl Microbiol* 97:1140-8
14. Naumov GI (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J Ind Microbiol* 17:295–302
15. Giudici P, Caggia C, Pulvirenti A, Zambonelli C, Rainieri S (1998) Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Lett Appl Microbiol*. 27:31-4
16. Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis EJ, Roberts IN (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1931–1942
17. González SS, Barrio E, Gafner J, Querol A (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res* 6:1221–1234
18. Nilsson-Tillgren T, Gjermansen C, Kielland-Brandt MC, Litske Petersen JG, Holmberg S (1981) Genetic differences between *Saccharomyces carlsbergensis* and *S. cerevisiae*. Analysis of chromosome III by single chromosome transfer. *Carlberg Res Commun* 46:65-76
19. Rainieri S, Kodama Y, Kaneko Y, Mikata K, Nakao Y, Ashikari T (2006) Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl Environ Microbiol* 72:3968-3974
20. Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, Dubourdiou D (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl Environ Microbiol* 64:3887–3892
21. Lopandic K, Gangl H, Wallner E, Tscheik G, Leitner G, Querol A, Borth N, Breitenbach M, Prillinger H, Tiefenbrunner W (2007) Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res* 7:953-65
22. Gangl H, Batusic M, Tscheik G, Tiefenbrunner W, Hack C, Lopandic K (2009) Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *N Biotechnol* 25:244-51
23. Naumova ES, Naumov GI, Masneuf-Pomarède I, Aigle M, Dubourdiou D (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* 22:1099-115
24. Masneuf-Pomarède I, Bely M, Marullo P, Lonvaud-Funel A, Dubourdiou D (2010) Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* 139:79-86
25. Masneuf I, Murat ML, Dubourdiou D, Naumov GL, Tominaga T (2002) Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of "vitis vinifera" Sauvignon blanc wines. *Int J Vine Wine Sci* 36:205-212
26. Riou C, Nicaud JM, Barre P, Gaillardin C (1997) Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* 13:903-15
27. Rozès N, Garcia Jares C, Larue F, Lonvaud-Funel A (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J Sci Food Agri* 59:351-359

28. Sweeney JY, Kuehne HA, Sniegowski PD (2004) Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast Res* 4:521-525
29. Sampaio JP and Gonçalves P (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microb* 74:2144-2152
30. Goddard MR (2008) Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae's* ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 9:2077-82
31. Arroyo-Lopez FN, Orlić S, Querol A, Barrio E (2009) Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int J Food Microbiol* 131:120–127
32. Llauradó JM, Rozès N, Constantí M, Mas A (2005) Study of some *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine-making after pre-adaptation at low temperatures. *J Agric Food Chem* 53:1003-1011
33. Abe F and Horikoshi K (2000) Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20:8093-8102
34. Gabardino J and Sturley SL (2005) Homeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochem Soc T* 33:1182-1185
35. You KM, Rosenfield CL, Knipple DC (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol* 69:1499-1503
36. Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, Lodi T, Marzona M, Bardi L (2008) Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int J Food Microbiol* 121:84-91
37. Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* 49:95-116
38. Müllner H, Daum G (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol* 51:323-47

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

CAPÍTULO III

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature

Marian Redón¹, José M Guillamón^{1,2*}, Albert Mas¹ and Nicolas Rozès¹

(1) Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

(2) Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, P.O. Box 73, 46100 Valencia, Spain

*Corresponding author: José Manuel Guillamón, (email:guillamon@iata.csic.es), fax: 34-96-3636301

Eur Food Res Technol 228:833–840

Abstract

Plasma membrane is the initial sensor of different stress conditions and its composition is modified with response to environmental changes. In the present study, we have modified the lipid composition of the membrane by growing *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of different fatty acids and ergosterol. All supplemented fatty acids were incorporated into the cell and this incorporation produced significant changes in the lipid composition. The incubation with ergosterol also modified the lipid composition of the cells; however, these cells presented a strong reduction in the content of this sterol. The different cellular lipid composition has been related to viability and fermentation performance at low temperature (13 °C). The cells incubated with palmitoleic acid (C16:1) showed higher viability and significant reduction in the fermentation length. These cells presented higher C16:1 and ergosterol content, shorter chain length of the fatty acids and higher ratio of sterols/phospholipids. Therefore redesigning the composition of cellular membranes during industrial yeast propagation seems to be a promising strategy for improving fermentation performance in the winery.

Keywords Wine - Yeasts - Fatty acids - Ergosterol - Phospholipids - Low temperature

Introduction

During regular winemaking practices, yeast undergoes numerous challenges during different adaptation processes. Modern winemaking has introduced additional challenges caused by new oenological practices and global climate change. Oenological practices such as low temperature fermentations, cold and freezing macerations, grape over ripening and higher sugar concentrations are among the more frequent cellar-related challenges. The global climate is producing higher temperatures and lower rainfall which will in turn produce high sugar concentrations, nitrogen and mineral imbalances, pH changes, and changes in ripening and phenolic concentration, etc. (Schultz et al. 1998). In the face of all these new challenges, yeast has to adapt its structure and metabolism to efficiently cope with these stressful conditions.

Mostly, we are interested in adapting yeast at low temperatures. Many winemakers prefer low temperatures for white and rosé winemaking and wines produced at low temperature develop better taste and aroma than those obtained in the usual range of 18-21 °C (Beltran et al. 2006). However, decreasing the ambient temperature of fermentation brings disadvantages as well. At 12-15 °C, there is an extended lag phase before the onset of vigorous fermentation, which increases the length of the process and the risk of a halted or sluggish fermentation (Bisson et al. 1999). This period reduces cost-effectiveness and efficiency in wine production and increases the possibility of an undesirable proliferation of winery-associated microorganisms (Fleet and Heard 1993). Consequently, the fermentation of grape must and the quality of the wines produced at low temperature depend directly on the ability of the wine yeast to respond and adapt to cold. Biological membranes are the first barrier that separates cells from their environment and a primary target for damage during cold stress.

Yeast membranes are a lipid bilayer consisting of two amphipathic molecules, phospholipids (PL) and sphingolipids, whose apolar phase consists of fatty acids. The fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae* are mainly made up of the unsaturated fatty acids (UFA) oleic acid (18:1) and palmitoleic acid (16:1) together with the saturated fatty acids (SFA) palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0). The medium chain fatty acids (MCFA) (from C6 to C14) are found in lower proportion but their concentration increases with the anaerobic growth, such as the fermentation processes. The other important lipids of the membrane are the sterols with

ergosterol being the main sterol in fungi (Daum et al. 1998). Changes in either of these membrane features can significantly disturb the membrane's function and alter the activity of membrane-associated enzymes and transporters. Consequently, many organisms have developed mechanisms to maintain the appropriate fluidity of the membrane lipids regardless of ambient temperature. The most widely recognized change in cell membranes at low temperature is the unsaturation of lipid acyl chains (Sakamoto and Murata 2002). Membranes of yeast cells with an increased unsaturation index showed higher membrane fluidity (Rodríguez-Vargas et al. 2006). Moreover, unsaturated fatty acids contribute to an organism's ability to adapt to environmental stresses, with higher unsaturation correlating to higher freeze (Rodríguez-Vargas et al. 2006) and ethanol tolerance (Alexandre et al. 1994). Such adaptation involves inducing fatty acid desaturases (Weber et al. 2001) which incorporate unsaturated bonds at certain positions in the fatty acids which are linked to membrane glycerolipids. During wine fermentation, the absence of oxygen suppresses fatty acid desaturation and sterol biosynthesis by yeasts and, therefore, this anaerobic situation limits the modifications of the lipid composition needed to face environmental changes such as a fall in temperature. A possible alternative to the biosynthesis is the direct uptake from the growing medium. Yeasts can directly incorporate sterols (Ness et al. 1998, Luparia et al. 2004) and unsaturated fatty acids (Chen 1980) from grape must during industrial fermentations. We have recently confirmed that the lipid composition of grape must directly influenced the lipid composition of yeast cells (Beltran et al. 2006). The oenological industry is already exploiting the ability of yeast cells to take in and integrate lipids from the growth medium to improve their fermenting capacity. The addition of nutrients based on the presence of fatty acids and sterols either during alcoholic fermentation (Delfini and Costa 1993) or during the rehydration process of active dry wine yeasts (ADWY) (Soubeyrand et al. 2005) is a widespread practice during industrial wine fermentation.

However, most of these commercial lipid-enriched additives are very unspecific as they contain most of the cellular lipids (most of these additives are based on inactive yeasts) and, in our opinion, have unpredictable consequences on the lipid composition of the yeast cells. Thus, our aim was to analyse how cellular lipid composition was affected by specific fatty acids and ergosterol in the growth medium of a commercial wine yeast and how this modification affected cell viability, fermentation capacity and membrane fluidity.

Material and Methods

Strain and growth media

The commercial wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand S.A., Canada) was cultivated overnight in YEPD medium (glucose 20g/L, peptone bacteriological 20 g/L and yeast extract 10g/L) with different lipid molecules: lauric acid (C12); palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18), linolenic acid (C18:3) and ergosterol. They were added from stock solutions (Sigma) dissolved in ethanol. Final concentration in the YEPD medium was 0.5 mM for fatty acids and 4.2 μ M for ergosterol. These concentrations were based on previous studies (Avery et al. 1996, Deytieux et al. 2005, Watson and Rose 1980) to ensure lipid incorporation without affecting the yeast growth. The yeast was grown in Erlenmeyer flasks (500 mL) filled with 120 mL of medium, fitted with cotton and incubated at 25 °C and 150 rpm. The population inoculated in every flask was 2×10^6 cells/mL from dry yeast rehydrated in water at 37 °C. Dry weight of cells was calculated after maintaining the pellets (5×10^8 cells/mL) for 2 days at 100°C.

Viability and fermentation capacity assays

Cell viability was determined by plating on YEPD agar using an automatic spiral plater (AES Laboratoire, Combourg, France). Colony forming units (CFU) were counted using the ProtoCOL SR/HR counting system software version 1.27, supplied by Synbiosis (Cambridge, UK).

Fermentations were carried out in a synthetic grape must (pH 3.3) as described by (Riou et al. 1997) but with 200 g/L of reduced sugars (100 g/L glucose and 100 g/L fructose) and without anaerobic factors. Fermentations took place at 13 °C with a gentle agitation (150 rpm) in 0.5 L. The population inoculated in every flask was 2×10^6 cell/mL from dry yeast rehydrated in water at 37 °C. Density was measured daily and sugar consumption was assayed using enzymatic kits (Roche Applied Science, Germany). Fermentation was considered to be over when the residual sugars were below 2 g/L.

Fluidity measurements

The fluidity of the yeast plasma membrane was measured in whole cells using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, Sigma) as fluorescent probe reporter. Briefly, the process was as follows: yeast cells were harvested, washed twice with PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,

Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH 7.4) buffer and resuspended in 10 mL of PBS buffer to a density of 1×10^7 cel/mL. The cells were incubated after the addition of 50 µL of DPH stock solution (0.5 mM diluted in tetrahydrofuran, Sigma) at 25 °C without light. After 45 min of incubation under agitation, samples were then placed in the stirred and thermostatted cuvette holder of the spectrofluorometer (Varian). Measuring temperatures (13 and 25 °C) were maintained by circulating water from a thermostatically controlled bath. The excitation and emission wavelengths were 355 nm and 425 nm, respectively. The degree of fluorescence polarization (p) was calculated according to Ansari et al.(1993), using the following equation: $p = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2 GI_{VH}}$ with $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$ where I is the corrected fluorescence intensity, and subscripts V and H indicate the orientation (vertical or horizontal) of the excitation and analyser polarizers. For each measurement, fluorescence intensities were corrected by subtracting the intensity of light measured both with unlabelled cells in PBS buffer and with DPH in PBS buffer without the cells.

Determining the total yeast fatty acids

Sedimented cells (5×10^8 cells/mL) were placed in sealed tubes with a Teflon-lined screw cap and saponified using 1 mL of 5% NaOH in 50% methanol/water (Rozès et al. 1992). The tubes were placed in a dry bath (100 °C) for 30 minutes. Then the saponified material was cooled at room temperature and 2 mL HCl 6M was added. Free fatty acids were extracted by adding 0.5 mL hexane:methyl tert-butyl ether (MTBE) (1:1, v/v). Each tube was vortexed twice for 30 s. The organic phase was collected after centrifugation at 1,000 x g for 3 min.

Analytical gas chromatography was performed on a Hewlett-Packard 6850 (Agilent Technologies). One µL of cellular extract was injected (splitless, 1 min) into an FFAP-HP column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm from Agilent) with an HP 6850 automatic injector. The initial temperature was set at 140 °C and increased by 4 °C/min up to 240 °C. Injector and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively. The carrier gas (helium) at a flow rate of 1.7 mL/min. Heptanoic and heptadecanoic acids (10 and 40 mg/mL, respectively) were added as internal standards before the saponification of cells. Relative amounts of fatty acids were calculated from their respective chromatographic peak areas. These values were related to the dry weight of cells and expressed as a percentage of the total fatty acid extracted.

Lipid composition of cells

Prior to lipid extraction, a solution of 100 μL of cold methanol and 10 μL of EDTA 0.1 mM was added to the yeast cells (15-20 mg dry mass) with 1 g glass beads (0.5 mm, Biospec Products) in Eppendorf and then mixed for 5 minutes in a mini-bead-beater-8 (Biospec Products, Qiagen). Lipid extraction was performed in five steps, four steps with 300 μL chloroform/methanol (2:1, v/v, for 1 hour) and the fifth with 300 μL of chloroform/methanol 1:2 (v/v) overnight. Both organic phases were transferred to a 15 mL glass screw-cap tube and cleaned twice by adding KCl 0.88% (1/4 of the total volume of the extract). After vortexing and cooling at 4 °C for 10 minutes, the samples were centrifuged at 1,300 x g for 5 min. The organic phase was collected and finally concentrated to dryness under a nitrogen stream. The residue was dissolved in chloroform/methanol (2:1, v/v) and stored at -80 °C until analysis.

Yeast neutral lipid composition by thin-layer chromatography

The neutral lipid (NL) composition of yeasts was separated by one-dimensional TLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20 cm, 250 μm) (Merck, Germany). The plate was developed in two steps with (1) hexane, MTBE, glacial acetic acid (70:30:3, v/v/v) to the half of the plate and (2) hexane to 9.5 cm. The standard lipids lanosterol, ergosterol, squalene, cholesteryl oleate, ethyl oleate, diolein, triolein were purchased from Sigma and were applied to every plate in the range of 1-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. After TLC, lipids were charred with 10% CuSO₄ in 8% H₃PO₄ and heated at 180 °C for 4 min on a TLC Plate Heater (CAMAG). An image of the plate was acquired with Image Scanner (Amersham Biosciences). Each spot of the image was quantified as integrated optical densities (IOD) with Quantity One software (Bio-Rad). Calibration curves were constructed by plotting the IOD of the lipid standard over the amount of lipid loaded.

Separation and quantification of the yeast phospholipids by TLC

The yeast extract phospholipids (PL) were separated by one-dimensional TLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20 cm, 250 μm) with chloroform:acetone:methanol:glacial acetic acid:water (50:15:10:10:5, v/v/v/v). After charring the plate with 10% CuSO₄ in 8% H₃PO₄ and heating at 180°C for 4 min PL were identified by known standards purchased from Sigma: phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL) and

phosphatidic acid (PA). To quantify PL, calibration curves were constructed by applying standards to every plate in the range of 1-4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Statistical data processing All YEPD cultures in the presence of different lipids were performed in triplicate. The data were statistically treated using SPSS 13 software package. By analysing variance (ANOVA, P value ≤ 0.05 , Tukey test) we determined the differences among different treatments and ADWY origin.

Results

The changes in the lipid composition of a commercial *S. cerevisiae* strain were analysed after exposure to different lipid molecules. This strain was first rehydrated in water and, afterwards, inoculated in YEPD medium supplemented with one of the following molecules: lauric acid (C12); palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18), linolenic acid (C18:3) and ergosterol. The C16:1 and C18 were chosen because they represent the quantitative most relevant unsaturated and saturated fatty acids. Although *S. cerevisiae* is unable to synthesize polyunsaturated fatty acids, we also tested the influence of a polyunsaturated fatty acid such as linolenic acid which can be directly incorporated from the growth medium. Lastly, C12 and ergosterol were chosen as representatives of MCFA and sterols, respectively.

Modification of fatty acid composition

Total fatty acid composition of the cells grown in the presence of ergosterol and different fatty acids was analysed and compared with the control condition (Table 1; Fig. 1). The first result was that all the added fatty acids were incorporated into the cells. The cellular concentration of the supplemented fatty acid had significantly increased when compared to the control cells. This incorporation was clearly represented in the case of the linolenic (C18:3) acid. *S. cerevisiae* is unable to synthesize this unsaturated fatty acid (Daum et al., 1998) and, as a consequence, it was not detected in the cells of any condition, except for the cells incubated in the presence of this acid which represented 30% of the total fatty acids. The incorporation of the other supplemented fatty acids produced a significant change in the concentrations of the saturated and unsaturated fatty acids as the cell response to their incorporation (Table 1). The addition of C12 and C16:1 produced a significant shortening of the chain length when compared to the control. The presence of fatty acids in the medium also produced a general significant reduction of total fatty acids, which is also evident in both UFA and SFA. The

addition of C12 significantly increased the levels of MCFA by its direct incorporation (Fig. 1). Addition of ergosterol does not change the total content of fatty acids, yet increased the UFA.

Table 1 Cellular concentration of fatty acids, sterols, triacylglycerides and phospholipids (expressed as mean \pm SEM and $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight) after growth in lipid-supplemented YEPD

	Control	+C:12	+C18:3	+C16:1	+C18	+Ergosterol
MCFA	3.19 \pm 0.56	10.15 \pm 1.82*	1.66 \pm 0.15*	1.29 \pm 0.05*	0.50 \pm 0.07*	0.44 \pm 0.21*
SFA	59.65 \pm 1.74	37.73 \pm 2.29*	34.25 \pm 2.05*	37.47 \pm 0.90*	42.84 \pm 3.89*	43.65 \pm 1.68*
UFA	125.13 \pm 0.55	64.65 \pm 4.33*	64.52 \pm 2.11*	76.77 \pm 0.76*	95.03 \pm 3.80*	118.18 \pm 8.50
Chain length	16.96 \pm 0.18	16.33 \pm 0.06*	17.05 \pm 0.01	16.41 \pm 0.02*	17.04 \pm 0.02	16.91 \pm 0.02
Total fatty acids	187.97 \pm 6.61	112.53 \pm 9.93*	100.43 \pm 3.80*	115.53 \pm 1.21*	138.37 \pm 7.65*	162.27 \pm 9.71
Total sterols	28.50 \pm 0.25	24.71 \pm 0.34*	28.96 \pm 1.07	32.17 \pm 0.81	8.39 \pm 0.10*	8.49 \pm 0.07*
Total TG	10.89 \pm 0.30	7.15 \pm 0.25*	11.21 \pm 0.37	8.03 \pm 0.28*	3.90 \pm 0.05*	4.08 \pm 0.15*
Total PL	22.75 \pm 0.15	23.94 \pm 0.82	19.27 \pm 0.31*	22.54 \pm 0.42	19.66 \pm 0.72*	20.26 \pm 0.54*

The concentration of MCFA, SFA and UFA (expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight) and chain lengths of the total fatty acids are also shown. Statistical significance of differences was examined by ANOVA test ($P \leq 0.05$). *MCFA* Medium chain fatty acids (sum from C8 to C14); *SFA* saturated fatty acids (sum of C16 + C18); *UFA* unsaturated fatty acids (sum of C16:1 + C18:1 + C18:3); Chain length: $\Sigma(\% \text{ FA} \times \text{number of C})/100$

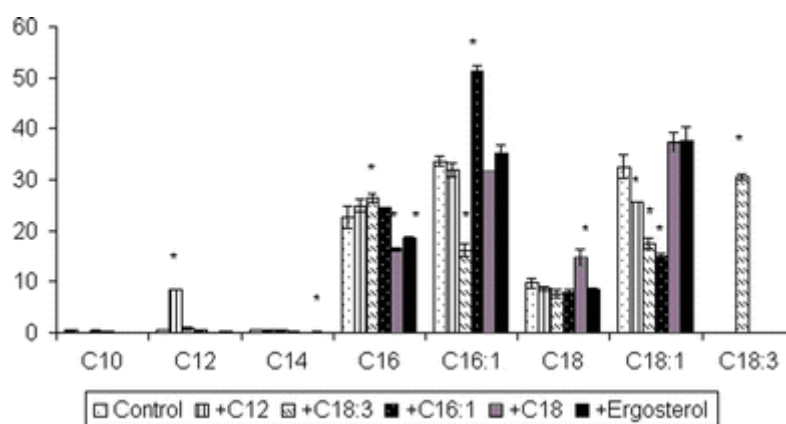


Fig. 1 Fatty acid composition of ADWY after growth in lipid-supplemented YEPD. Fatty acids were expressed as the mean of percentages of total fatty acid concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) \pm SEM (standard error of the mean). * Significance of differences was examined by ANOVA test ($P \leq 0.05$) compared with control under similar conditions

Modification of neutral lipid (sterols and triacylglycerides) composition

We detected a sharp decrease (one-third compared to control cells) in the total sterol and triacylglyceride (TG) concentrations of the cells grown in C18- and ergosterol-supplemented media (Table 1). Squalene, lanosterol, ergosterol and sterol ester composition of the cells grown in the presence of ergosterol and different fatty acids were analysed and compared with

the control condition (Fig. 2). Incubation in presence of ergosterol yielded decrease of this sterol in the plasma membrane. The incubation in C18 also showed a decrease in the cellular ergosterol and only C12 addition increased this content. It was also remarkable that a huge increase in sterol esters (SE) was seen after C18 and ergosterol addition.

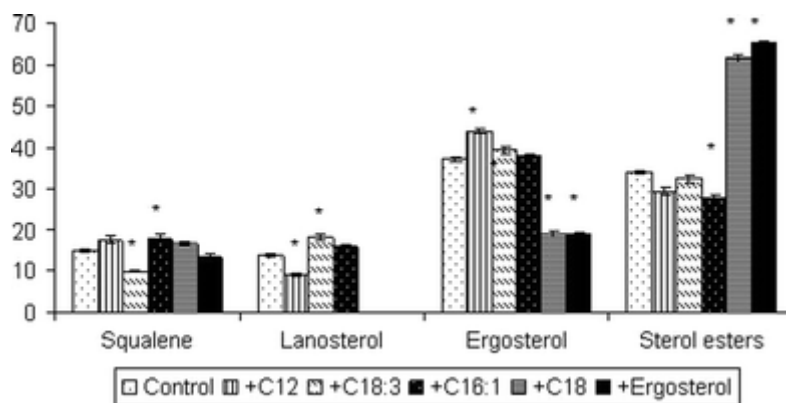


Fig. 2 Squalene, lanosterol, ergosterol and sterol ester composition of ADWY after growth in lipid-supplemented YEPD. Values are the mean of percentages of total sterol concentration ($\mu\text{g}/\text{mgDW}$) \pm SEM. * Significance of differences was examined by ANOVA test ($P < 0.05$) compared with control under similar conditions

Modification of phospholipid composition

Concentration of total PL was significantly reduced by supplementing C18:3, C18 and ergosterol (Table 1). However, the distribution of individual PL was most affected when the medium was supplemented with C18 and ergosterol (Fig. 3). In comparison with the control condition, both molecules strongly increased the percentage of PC and decreased the percentage of PS, PE and CL. It was also noteworthy the dramatic changes in the ratio of sterols/PL. This ratio was higher than 1 in the case of the cells supplemented with C12, C18:3 and C16:1 (and control cells), and lower than 0.5 for the cells supplemented with C18 and ergosterol. A general precursor of all phospholipids is PA. The cells incubated with C12, C18 and ergosterol showed a significant decrease in PA whereas cells incubated with C16:1 significantly increased their PA content. These changes of PA did not modify the total concentration of PL.

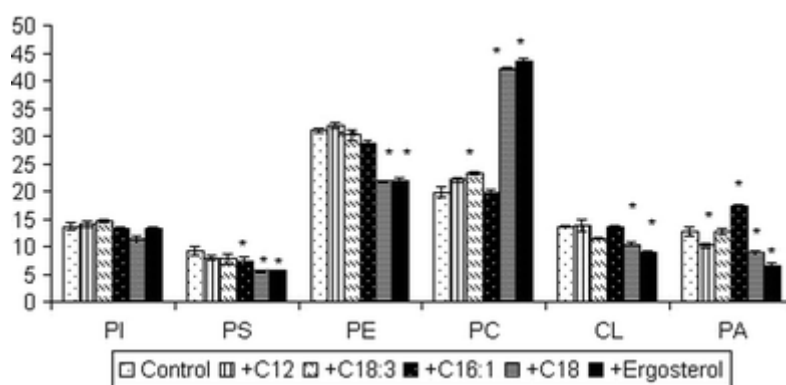


Fig. 3 Phospholipid composition of ADWY after growth in lipid-supplemented YEPD. Phospholipids were expressed as the mean of percentages of total phospholipid concentration ($\mu\text{g}/\text{mg DW}$) \pm SEM. *PI* Phosphatidylinositol; *PS* phosphatidylserine; *PE* phosphatidylethanolamine; *PC* phosphatidylcholine; *CL* cardiolipin; *PA* phosphatidic acid. * Significance of differences was examined by ANOVA test ($P \leq 0.05$) compared with control under similar conditions

Viability, fermentative capacity and membrane fluidity of the cells grown in the presence of different lipids

Growth in the presence of different fatty acids and ergosterol significantly modified the proportion or concentration of cellular fatty acids, sterols and PL. As a result we further analysed the effect of these changes on viability (plate counts) and fermentative capacity (time needed to ferment sugars of synthetic must at 13 °C; Table 2) and membrane fluidity (Fig. 4). The population size reached after growth in the presence of C18 and ergosterol was lower than the control condition (only YEPD). On the other hand, a slight but statistically significant increase was detected in the culture incubated in the presence of C16:1 (Table 2). No differences were detected in the viability of the different cultures after the fermentations (data not shown). Regarding fermentation capacity we detected significant differences in the rate at which different cultures consumed sugar (Table 2). Palmitoleic-supplemented cells finished fermentation approximately 100 h sooner than control cells. This higher fermentation capacity was already evident in the consumption of the 5 and 50% of the total sugars. Although differences in consumption were not so important, ergosterol-supplemented cells also finished wine fermentation sooner than control cells. Conversely C18-supplemented cells needed 40 h more than control cells.

Membrane fluidity is inversely proportional to the polarization degree determined by the anisotropy method. We determined the polarization degree of the cells after growth in the presence of the different lipids and at two temperatures (25 and 13 °C). The low temperature increased the degree of polarization which resulted in a rigidification of the membrane (Fig. 4). Significant differences were only detected for the cells incubated with C16:1.

However, and contrary to expectations, these cells showed higher rigidification than the control cells.

Table 2 Determination of viability of yeast cells after growth in lipid-supplemented YEPD and the time needed by these cultures to ferment 5% (T5), 50% (T50) and 100% (T100) of the sugars in a synthetic grape must

	Viability (cfu/mL) ± SEM ($\times 10^7$)	T5 (h) ± SEM	T50 (h) ± SEM	T100 (h) ± SEM
Control	4.60 ± 0.05	135.6 ± 3.6	196.0 ± 1.8	424.0 ± 13.9
+C12	4.78 ± 0.11	128.0 ± 3.7	182.8 ± 3.7*	408.0 ± 0.0
+C18:3	4.75 ± 0.11	128.2 ± 1.3	180.0 ± 3.2*	392.0 ± 13.9
+C16:1	5.41 ± 0.34*	116.0 ± 3.0*	162.8 ± 4.9*	320.0 ± 13.9*
+C18	2.33 ± 0.05*	142.4 ± 4.5	202.0 ± 1.8	464.0 ± 13.9*
+Ergosterol	2.14 ± 0.03*	127.6 ± 3.7	177.2 ± 1.8*	368.0 ± 13.9*

SEM Standard error of the mean

Statistical significant differences ($P \leq 0.05$)

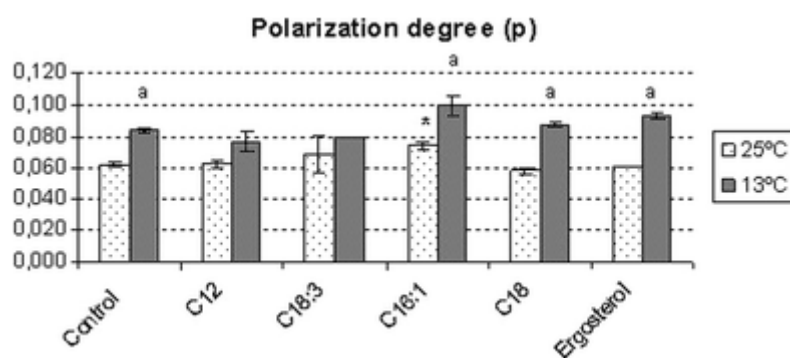


Fig. 4 Degree of polarization (p) at 25 and 13 C of ADWY after growth in lipid-supplemented YEPD. * Statistically significant differences ($P \leq 0.05$); a statistically significant differences between 25 and 13°C

Discussion

The inoculation of grape musts with ADWY is a widespread practice in the wine industry. ADWY are obtained from selected natural wine yeasts which are aerobically propagated in molasses and then desiccated. The usual process is to rehydrate the dried yeast by incubating it in water at 37°C for a short period of time followed by seeding the rehydrated cells into large fermentation tanks. In our case, we are interested in fermenting at low temperature (12–15°C) to improve the aroma of the wine. Direct inoculation of ADWY from water at 37°C to cold must add a strong thermal shock to the usual osmotic shock. Some authors have proposed a period of adaptation to the new medium (Novo et al. 2003) which would improve their fermentation capacity. A possible adaptation might be a reshaping of the plasma membrane composition which would reduce the lag phase and speedup the beginning of the fermentation (Torija et al. 2003). Plasma membrane is the first barrier that separates cells from their environment and the primary target of cold stress. Reduced temperatures severely

decrease the membrane fluidity. The two main mechanisms described to compensate for this loss of fluidity are: either increase the UFA or increase the MCFA (Beltran et al. 2006, Torija et al. 2003). The increase of unsaturated fatty acids may be mainly derived from de novo synthesis or external supply (Tehlivets et al. 2007). The synthesis of monounsaturated acids involves a desaturating with $\Delta 9$ -desaturase, Ole1p. Some authors have overexpressed the gene encoding the *S. cerevisiae* desaturase *OLE1* (Kajiwara et al. 2000) or other heterologous desaturases Rodríguez-Vargas et al. 2006) in order to increase the degree of unsaturation and membrane fluidity while improving the cold resistance of these engineered strains. However, *S. cerevisiae* is not able to synthesize unsaturated fatty acids during wine fermentations due to the anaerobic conditions (Ribéreau-Gayon et al. 2000). Moreover, the wine industry has so far been very reluctant to use genetically modified strains. Thus, we have tried to modify the lipid composition by growing yeast cells in the presence of different lipid compounds.

From our results it is obvious that yeasts are able to incorporate exogenous fatty acids and this produces significant changes in the lipid composition of the cells. Although the fatty acid uptake mechanism is still under debate exogenous lipid incorporation has been previously reported (Avery et al. 1996). We recently confirmed the incorporation of linoleic acid (C18:2) and grape phytosterols into the cellular membranes of the same strain (QA23) during industrial wine fermentations (Beltran et al. 2006). However, none of above mentioned studies analysed the effect of these incorporated lipids on the synthesis of other lipid constituents. The first remarkable effect is the decrease in total concentration of fatty acids in the cells incubated in presence of different fatty acids. The presence of a lipid compound in the growth medium might regulate the synthesis of other lipids by transcriptional repression of the genes involved in the fatty acid synthesis (Chirala 1992, Gabardino et al. 2005). Similar conclusions may be drawn from the incubation in the presence of ergosterol which produced a strong reduction in the cellular content of total sterols. Ergosterol incubation also decreased the content in TG, which are considered to be the most important storage lipids in eukaryotic cells (Gabardino et al. 2005). Much more difficult to understand is the similar effect produced by the C18 incubation. Synthesis of TG in the yeast *S. cerevisiae* requires formation of its precursor PA and diacylglycerol (DG). The decrease in TG was concomitant with a decrease in PA (statistically significant in the cells incubated with ergosterol and C18). In this case, the concentration of the precursor seems to be more important than the concentration of free fatty acids in the medium.

Our objective was to improve the fermentative capacity of commercial wine yeast after incubation in the presence of different lipids. We observed an important reduction in the fermentation length and higher viability for the cells supplemented with C16:1. Mannazzu et al. (2008) recently reported a higher viability and better fermentation performance in the yeast strains with higher C16 (palmitic + palmitoleic acids)/total fatty acids (TFA) ratio. The C16:1-supplemented cells also showed a reduction in chain length, a higher sterol content (especially of free sterols) and a higher ratio of sterols/PL. Another important feature of the C16:1-supplemented cells was that they had higher membrane rigidity than the control cells. Theoretically, shorter chain length in the fatty acids produces higher membrane fluidity. Nevertheless, a direct relation between higher sterol content and a higher sterols/PL ratio with less membrane fluidity has been already reported (Arora et al. 2004, Sharma 2006). Conversely, the C18-supplemented cells showed the lowest viability after YEPD incubation and the longest fermentation time. The main lipid characteristics of these cells were an important decrease in the ergosterol content concomitant with an increase in the SE, an important reduction both in total sterols and total TG and a significant decrease in all PL with the exception of PC whose composition increased more than two-fold. This lipid profile was practically identical to the ergosterol-supplemented cells. However, the latter showed a significant reduction in the fermentation length. The only (but also significant) difference of the ergosterol-supplemented cells was that the UFA/SFA ratio was higher than the C18-supplemented cells and much higher than the control cells.

In conclusion, the cellular lipid composition of yeast cells incubated in the presence of different lipid molecules is strongly modified by both incorporation and biosynthesis regulation. In this study, the lipid composition changed more profoundly than in other strategies such as genetic engineering (Rodríguez-Vargas et al. 2006, Kajiwara et al. 2000). Therefore, redesigning the composition of cellular membranes during industrial yeast propagation seems to be a promising strategy for improving fermentation performance in the winery. Further studies in this direction should determine the key lipid molecules for different oenological conditions. From these results we can conclude that a high content of C16:1, a shorter chain length of the fatty acids, a higher sterol content, especially of free sterols, and a higher ratio of sterols/PLs may be the important factors in improving fermentation capacity at low temperature. Another important feature to improve fermentation at low temperature seems to be a high UFA/SFA ratio such as observed in the ergosterol-supplemented cells. Conversely, the C18-supplemented cells showed a reduction in total sterols, TG and PL which

impaired fermentation activity at low temperature. Anyway, we cannot rule out the involvement of other lipid molecules which have not been determined in this study, in adaptation at low temperature. For example, sphingolipids have been related to *S. cerevisiae*'s response to heat shock (Dickson et al. 1997, Jenkins et al. 1997). The role of sphingolipids in the cold signalling mechanism and the response to cold temperatures remains to be studied.

Acknowledgments This work was financially supported by grant from the Spanish government (AGL2007-65498-C02/ALI). We thank Pilar Mañas (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza) for his help in membrane fluidity analysis. The authors would also like to thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for checking the manuscript.

References

1. Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C (1994) FEMS Microbiol Lett 124:17–22
2. Ansari S, Gupta P, Mahanty SK, Prasad RJ (1993) Med Vet Mycol 31:377–386
3. Arora A, Raghuraman H, Chattopadhyay A (2004) Biochem Biophys Res Commun 318:920–926
4. Avery SV, Howlett NG, Radice S (1996) Appl Environ Microbiol 62:3960–3966
5. Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamón JM, Mas A, François J, Rozès N (2006) FEMS Yeast Res 6:1167–1183
6. Bisson LF (1999) Am J Enol Vitic 50:107–119
7. Chen ECH (1980) Ann Soc Brew Chem 38:148–153
8. Chirala SS (1992) Proc Natl Acad Sci USA 21:10232–10236
9. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Yeast 14:1471–1510
10. Delfini C, Costa A (1993) Am J Enol Vitic 44:86–92
11. Deytieux C, Mussard L, Biron MJ, Salmon JM (2005) Appl Microbiol Biotechnol 2:266–271
12. Dickson RC, Nagiec EE, Skrzypek M, Tillman P, Wells GB, Lester RL (1997) J Biol Chem 272:30196–30200
13. Fleet GH, Heard GM (1993) Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet GH (ed) Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic publishers, Switzerland, pp 27–54. ISBN 3-7186-5132-7
14. Garbarino J, Sturley SL (2005) Biochem Soc Trans 33:1182–1185
15. Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L, Hannun Y (1997) J Biol Chem 272:32566–32572
16. Kajiwara S, Aritomi T, Suga K, Ohtaguchi K, Kobayashi O (2000) Appl Microbiol Biotechnol 53:568–574
17. Luparia V, Soubeyrand V, Berges T, Julien A, Salmon J (2004) Appl Microbiol Biotechnol 65:25–32
18. Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, Lodi T, Marzona M, Bardi L (2008) Int J Food Microbiol 121:84–91
19. Ness F, Achstetter T, Dupont C, Karst F, Spagnoli R, Degrise E (1998) J Bacteriol 180:1913–1919
20. Novo M, Beltrán G, Torija MJ, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Int J Food Microbiol 9:51–55
21. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (2000) In: Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications, vol 1. Wiley, New York, pp 101–147

Capítulo III

22. Riou C, Nicaud JM, Barre P, Gaillardin C (1997) *Yeast* 13:903–915
23. Rodríguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Randez-Gil F (2006) *Appl Environ Microbiol* 73:110–116
24. Rozès N, Garcia Jares C, Larue F, Lonvaud-Funel A (1992) *J Sci Food Agri* 59:351–359
25. Sakamoto T, Murata N (2002) *Curr Opin Microbiol* 5:208–210
26. Schultz HR, Löhnertz O, Bettner W, Bálo B, Linsenmeier A, Jähnisch A, Müller M, Gaubatz B, Váradi G (1998) *Vitis* 37:191–192
27. Sharma SC (2006) *FEMS Yeast Res* 6:1047–1051
28. Soubeyrand V, Luparia V, Williams P, Doco T, Vernhet A, Ortiz-Julien A, Salmon JM (2005) *J Agric Food Chem* 53:8025–8032
29. Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007) *Biochim Biophys Acta* 1771:255–270
30. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) *Int J Food Microbiol* 85:127–136
31. Watson K, Rose AH (1980) *J Gen Microbiol* 117:225–233
32. Weber MHW, Klein W, Muller L, Niess UM, Marahiel MA (2001) *Mol Microbiol* 39:321

CAPÍTULO IV

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Study of fermentation vitality of *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature by using phospholipid mutants

Marian Redón¹, Anna Borrull¹, Maria López^{1,2}, Zoel Salvadó¹, Ricardo Cordero¹, Albert Mas¹, José Manuel Guillamón^{1,2}, Nicolas Rozès¹

(1) Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

(2) Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, P.O. Box 73, 46100 Valencia, Spain

En preparación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Abstract

Nowadays there is an increasing interest on grape-must fermentation at low temperature to obtain white and *rosé* wines with better flavours. The fermentation at low temperatures presents some problems due to not optimal yeast condition development: long lag phases, sluggish or stuck fermentations. The phospholipid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* plays a central role in the low temperature adaptation. In order to detect the key genes in this adaptation, different phospholipid mutants from the EUROSCARF collection of *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 were tested to know if the suppression of some genes could improve the fermentation vitality of the cells at low temperature. Cell vitality, generation time and phospholipid composition from these mutants were analysed. Some knockouts improved or impaired their vitality at low temperature, whereas they were not affected at optimum temperature. The absence of some of these genes produced important changes on phospholipid composition. The complementation of the culture with the polar head choline was enough to rescue some of these mutants defective in phospholipid biosynthesis.

Key words: Deletion-Wine- Lipid metabolism-Yeast

Introduction

Fermentations at low temperatures improve the organoleptic profile of white and *rosé* wine (Beltran et al. 2006) but yeast are not adapted to grow at this temperature. Thus, some oenological problems like long lag phases, sluggish or stuck fermentations can occur. Several studies have confirmed that the lipid membranes of yeast are an important temperature stress sensor modulating their composition to reach the optimal proportion. Yeast membranes are mainly composed by a phospholipid bilayer. The major phospholipids found in the membranes of *Saccharomyces cerevisiae* include phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylserine (PS). Mitochondrial membranes also contain cardiolipin (CL) (Jiang et al. 2000). All major phospholipids are derived from phosphatidic acid (PA) via CDP-DAG pathway (*de novo* pathway). However there are alternative pathways which contribute to PE and PC biosynthesis: incorporation of ethanolamine/choline through the CDP-ethanolamine and CDP-choline branches of the Kennedy pathway; synthesis of PE or PC from lyso-PE/PC through the lysophospholipid acylation pathways (recycling pathways) (Stalberg et al. 2008; Schuiki et al. 2010). Moreover, free ethanolamine or choline can be taken up by yeast cells from the medium or formed within the cells by the action of phospholipases which degrade the PE or PC synthesized in the *novo* pathway. Ethanolamine-P can be also provided through sphingolipid degradation (Figure 1).

The membranes contain a balanced mixture of the different phospholipids classes. This composition is important for the physical properties of the membrane, such as its fluidity, which in turn may alter with variations in the temperature and other environmental conditions (Aguilar et al. 2006; Martin et al. 2007; Falcone et al. 2004). Growth and homeostasis of membrane require continuous phospholipid synthesis that is coupled to early membrane trafficking events. Lipids synthesise in the endoplasmic reticulum, mitochondria and Golgi and have to be supplied to the cell periphery to keep the lipid composition of the plasma membrane balanced and to guarantee functionality of the different compartments. Therefore cells need to adapt to temperatures or stress changes by altering the composition of their membranes. Low incubation temperatures increase the molecular order of membrane lipids by rigidification (Los et al. 2004), and alter the activity of membrane-associated enzymes and transporters (Avery et al. 2005). Yeasts have developed molecular and physiological

mechanisms to maintain the appropriate fluidity of membrane lipids regardless of ambient temperature.

The most widely described change in *S. cerevisiae* membranes at low temperatures is the increase of unsaturation (mainly palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acids) of lipid acyl chains (Sakamoto et al. 1998). Phospholipids with unsaturated fatty acids (UFA) have a lower melting point and more flexibility than do phospholipids with saturated acyl chains. Consequently, ethanol tolerance and cell viability are improved (Murata et al. 1995). Such adaptation involves the induction of *OLE1* which needs oxygen to introduce desaturation bonds and to convert the saturated fatty acids into their corresponding mono-unsaturated fatty acids. However, the absence of oxygen during white and *rosé* wine fermentations can jeopardise or impair the synthesis of these UFA. Then the alternative for maintaining an optimal fluidity at low temperature is to decrease the fatty acids chain length by synthesising medium chain fatty acids (MCFA) (Torija et al, 2003; Beltran et al. 2006). In a recent work of our group (Redón et al. 2009) we have modified the cellular lipid composition by incubating the cells in presence of different fatty acids and sterols and we observed an important reduction in the fermentation length and higher viability for cells enriched in the palmitoleic acid (C16:1). Furthermore, in this previous study (Redón et al. 2008) a positive correlation between yeast vitality at 13 °C, unsaturated fatty acids (UFA) and different phospholipids (PS, PE), was also determined.

Beltran et al. (2006) reported the expression of genes involved in phospholipid synthesis was relatively higher at 13 °C than at 25 °C. Genes encoding enzymes in both the *de novo* (*CDS1*, *CHO1*, *PSD1*, *CHO2* and *OPI3*) and Kennedy (*EK11*, *EPT1*, *CK11* and *CPT1*) pathways contain a UAS_{INO} element in the promoter. The UAS_{INO} element is binding site for the Ino2-Ino4 heterodimer complex that activates transcription. Repression of these genes is controlled by Opi1p, whose function is governed by its nuclear localization (Carman and Han, 2009). Most of these genes are repressed in presence of inositol and choline in the medium. The presence of inositol or choline decreases the levels of PA because it is converted into PI or PC. As Opi1p binds PA in the endoplasmic reticulum, the decrease of PA produces a translocation of Opi1p to the nucleus where it inhibits transcription by interacting with Ino2p (positive regulator) bound to the UAS_{INO} element (Chen et al. 2007).

The aim of this study was to detect the importance of the different metabolic routes and the key genes of phospholipid synthesis in the adaptation of *S. cerevisiae* to the low temperature of fermentation. For this objective, we screened the mutant strains of the phospholipid metabolism in order to detect differential fermentation vitality with respect to the wild strain (BY4742). This differential vitality in some mutant strains was related with cellular phospholipid composition and generation time of these mutants.

Material and methods

Strain and growth media

Phospholipid mutants of *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 from the EUROSCARF collection (Frankfurt, Germany) were studied (Table 1). Yeast cells were cultured on SC media (6.6 g/L Difco Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids), 20 g/L glucose, 0.83 g/L synthetic complete drop out mix (2 g Histidine, 4 g Leucine, 2 g Lysine 1.2 g Uracil). They were grown in Erlenmeyer flasks (500 mL) filled with 100 mL of medium, fitted with cotton and with agitation at 120 rpm at 25 °C during 48 hours. The population inoculated in every flask was 2×10^6 cells/mL from an overnight culture in YEPD at 25 °C.

For the supplementation assays, $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$ knockouts were grown on SC medium with choline or ethanolamine (2mM).

Table1. Phospholipid mutant strains used in this study.

Standard name	Systematic name	Molecular function
de novo synthesis		
$\Delta crd1$	YDL 142C	Cardiolipin synthase
$\Delta opi3$	YJR073C	Phospholipid methyltransferase
$\Delta cho2$	YGR157W	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
$\Delta psd2$	YGR170W	Phosphatidylserine decarboxylase 2 (golgi, vacuole)
$\Delta psd1$	YNL 169c	Phosphatidylserine decarboxylase 1 (mitochondria)
$\Delta cho1$	YER026C	CDP-diacylglycerol-serine phosphatidyltransferase
$\Delta cds1$	YBR029C	CDP-diacylglycerol synthase
$\Delta slc1$	YDLO52C	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
$\Delta gpt2$	YKR067W	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
$\Delta sct1$	YBL011W	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
$\Delta ayr1$	YIL124W	1-acyl dihydroxyacetone phosphate reductase
Kennedy's synthesis		
$\Delta ept1$	YHR123W	Ethanolaminephosphotransferase

<i>Δmuq1</i>	YGR007W	Phosphoethanolamine cytidyltransferase
<i>Δeki1</i>	YDR147W	Ethanolamine kinase
<i>Δcpt1</i>	YNL130C	sn-1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase
<i>Δpct1</i>	YGR202C	Phosphocholine cytidyltransferase
<i>Δcki1</i>	YLR133W	Choline kinase
<i>Δgit1</i>	YCR098C	Glycerophosphodiester transmembrane transporter
<i>Δhnm1</i>	YGLO77C	Choline/ethanolamine transmembrane transporter Glycine betaine:hydrogen symporter
Turnover pathway		
<i>Δspo14</i>	YKR031C	Phospholipase D
<i>Δlpp1</i>	YPLO16W	Phosphatidate phosphatase
<i>Δdpp1</i>	YDR284C	Phosphatidate phosphatase
<i>Δplb3</i>	YOL011W	Lysophospholipase (PI and PS)
<i>Δplb2</i>	YMR006C	Lysophospholipase
<i>Δplb1</i>	YMR008C	Lysophospholipase (PC and PE)
<i>Δnte1</i>	YML059C	Carboxylesterase and lysophospholipase (PC)
<i>Δale1</i>	YOR 175C	Lysophospholipid acyltransferase (PC, PE)
<i>Δgde1</i>	YPL110C	Glycerophosphocholine phosphodiesterase

Generation time

To determine the doubling or generation time, firstly the different strains were grown on SC at 25 °C. Cultures in stationary phase (48 hours) were diluted to 0.2 (OD600) to inoculate a new SC media at 25 °C and 13 °C. Doubling time was determined by measurement optical density at 600 nm (OD600) during exponential growth.

Mitochondrial staining

DiOC₆ from Invitrogen™ was used to stain mitochondria of living cells (Koning et al. 1993). Staining protocol and DiOC₆ working concentration were used following manufacturer recommendations. Briefly, yeast cells were grown in SD medium and aliquots (10⁶ cells/mL) at different time were resuspended in 10mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 5% glucose. DiOC₆ was added up to a final concentration of 175nM. After room temperature incubation of 15 minutes cells were observed by fluorescence microscopy (Leica DM4000 B).

Vitality

The cell vitality after SC growth at 25 °C was determined by the *Bac-Trac*® 4300 microbiological analyser (SY-LAB Instruments, Austria). It measures the electric impedance changes produced by the CO₂ trapped in a solution of KOH (0.02%). The impedance level was monitored every 10 minutes by *Bac-trac* and a curve expressing the percentage decrease in impedance over time was drawn. Analysis was performed at 13 °C and at 25 °C. To calculate the cell vitality we considered the time (in hours) to reach maximum fermentation rate, considered as the point where a 10% decrease in total impedance was reached, and we normalised this value by the time needed by the *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (control). Thus, values lower than 1 indicated a greater vitality whereas those higher than 1 indicated lower vitality.

Lipid composition of cells

Prior to lipid extraction, a solution of 100 µL of cold methanol and 10 µL of EDTA 0.1 mM was added to the yeast cells (15-20 mg dry mass) with 1 g glass beads (0.5 mm, Biospec Products) in Eppendorf and then mixed for 5 minutes in a mini-bead-beater-8 (Biospec Products, Qiagen). Lipid extraction was performed according to the protocol detailed in Redón et al. (2009).

Separation and quantification of the yeast PL by HPTLC

The yeast extract phospholipids were separated by one-dimensional HPTLC on silica gel 60F₂₅₄ plates (10 x 20cm, 250 µm) with chloroform: acetone: methanol: glacial acetic acid: water (50:15:10:10:5, v/v/v/v/v). After charring the plate with 10% CuSO₄ in 8% H₃PO₄ and heating at 180 °C for 4 min, PL's were identified by known standards purchased from Sigma: phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL) and phosphatidic acid (PA). Plates were scanned and each spot of the image was quantified as integrated optical densities (IOD) with ImageJ software (a public domain, Java-based image processing program developed at the National Institute of Health). To quantify PL's, calibration curves were constructed by applying standards to every plate in the range of 1-4 µg/µL.

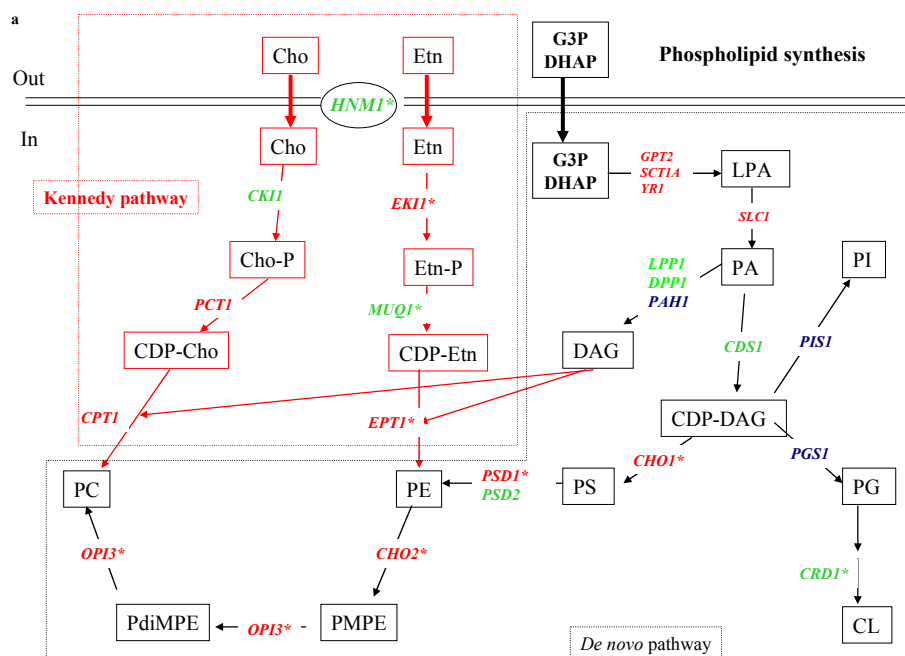
Statistical data processing

All the cultures at both temperatures (25 °C and 13 °C) were performed in triplicate. The data were statistically treated using SPSS 17 software package. By analysing variance (ANOVA, Tukey test), we determined the differences among different mutant strain and the control (the wild type) at both temperatures. The statistical level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Vitality

The first experiment was to evaluate all the phospholipid pathway mutants of the Euroscarf collection about their vitality at 13 and 25 °C. In this study, the main objective was to detect some mutants on which the time of vitality at both temperatures was significantly different of the wild yeast. The second objective was to detect some mutants which were only affected by the low temperature. The different mutants were divided in three groups based on the two main phospholipid pathways (*de novo* and Kennedy) and the turnover or recycling route. A schematic outline of these pathways is depicted in Figure 1. The results of the vitality of the different mutants can be observed in Figure 2.



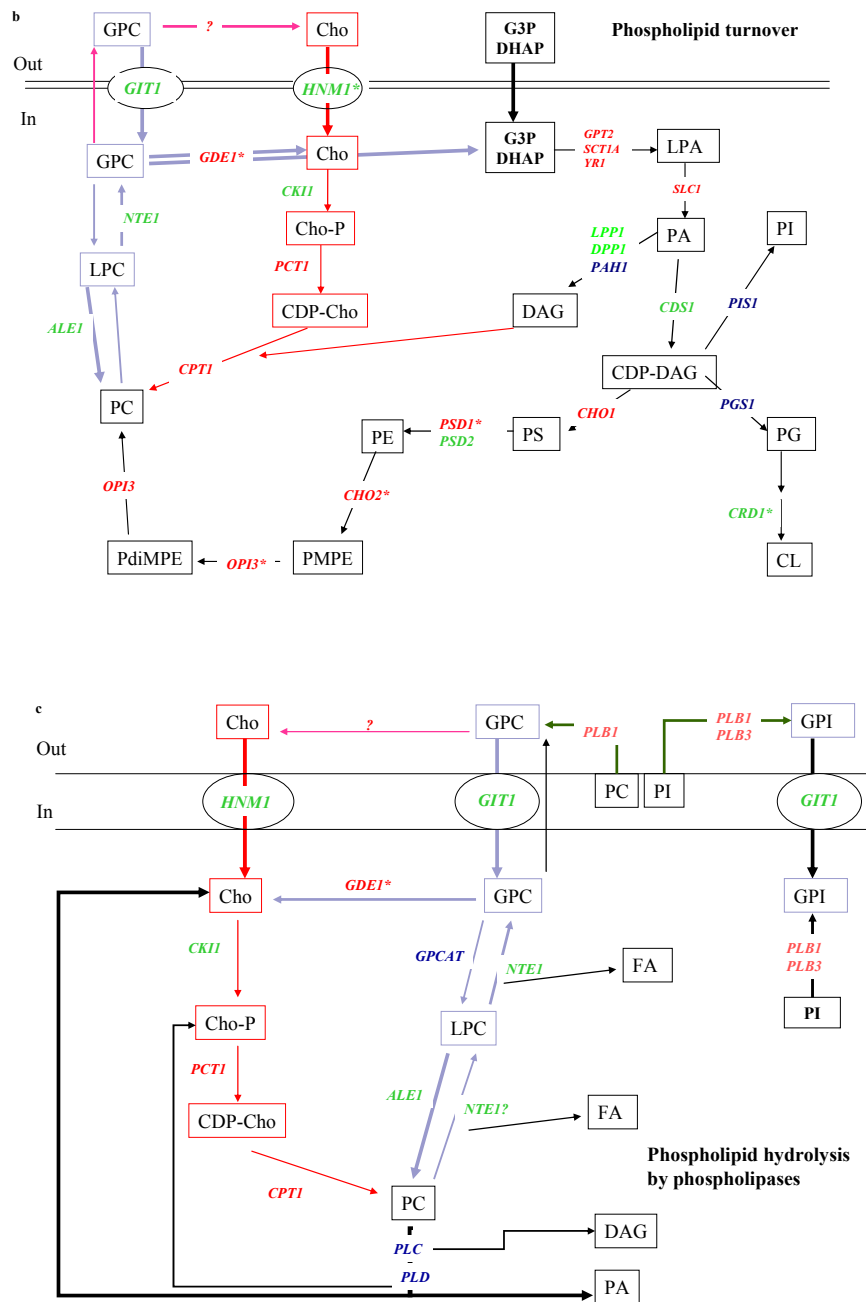


Figure 1. Schematic outline of the major pathways for phospholipid biosynthesis in yeast: a) *De novo* and Kennedy pathway. b) Phospholipid turnover (PC/PE) reacylation pathways. c) Phospholipid hydrolysis by phospholipases. The response of the different mutant strains upon vitality at 13 °C respect the wild strain: red (unfavourable response), green (favourable response) and blue (no viable or no tested). * Significant differences respect the wild type at the same temperature tested.

For the results observed in the *de novo* pathway, only the deletion of cardiolipin synthesis (*CRDI*) significantly improved the cell vitality of this mutant respect to the wild type at both temperatures. On the other hand, Δ *opi3* and Δ *psd1* strains decreased their cell vitality at both temperatures, although the decrease at 13 °C was stronger. The *opi3p* catalyzes the last two

steps in PC biosynthesis while the *psd1p* converts PS to PE in the mitochondrial inner membrane. However, keeping in mind our objective, other mutants with a significant differential effect at low temperature had a greater interest. That is the case of $\Delta cho2$ and $\Delta cho1$ which showed lower vitality than the wild type at 13 °C but it did not significantly change at 25 °C. These genes encode enzymes which catalyse the first step in the conversion of PE to PC and PS respectively.

Regarding the Kennedy pathway, the $\Delta hnm1$, $\Delta cki1$ and $\Delta muq1$ strains presented a better vitality than the wild type. Of these three mutants only $\Delta hnm1$ really improved the time for consuming sugar at 13 °C while the other two fermented faster at both temperatures. *HNMI* encodes a permease involved in the uptake of choline and ethanolamine, whereas *CKII* encodes a choline kinase, catalysing the first step in PC synthesis via the CDP-choline and *muq1p* catalyses the second step of PE biosynthesis; involved in the maintenance of plasma membrane. On the other hand, *EKII* which encodes an ethanolamine kinase, primarily responsible for PE synthesis via the CDP-ethanolamine pathway, showed a significant decrease of vitality at 13 °C. This enzyme also exhibits some choline kinase activity, thus contributing to PC synthesis via the CDP-choline pathway. Finally $\Delta ept1$ also showed worse vitality compared to the BY4742 at both temperatures. This gene was implicated to transfer CDP-ethanolamine on diacylglycerol.

The deletion in genes involved in the phospholipid turnover had a more limited effect on vitality. The most remarkable difference was that the deletion of *GDE1* significantly decreased the vitality at low temperature. This gene encodes a glycerophosphocholine (GroPCho) phosphodiesterase which hydrolyses GroPCho to choline and glycerolphosphate for use as a phosphate source and as a precursor for phosphocholine synthesis. The suppression of the turnover gene *ALE1* improved the vitality at 25 °C. The protein encoded by this gene was involved in the acylation of lysophospholipids yielding PC as a final product.

Capítulo IV

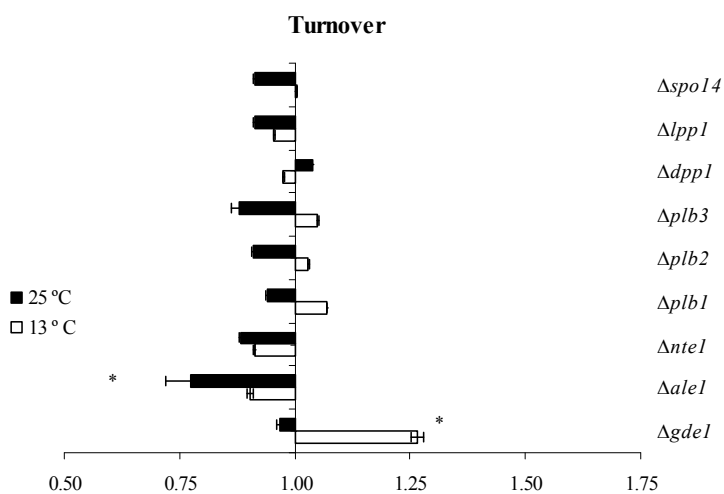
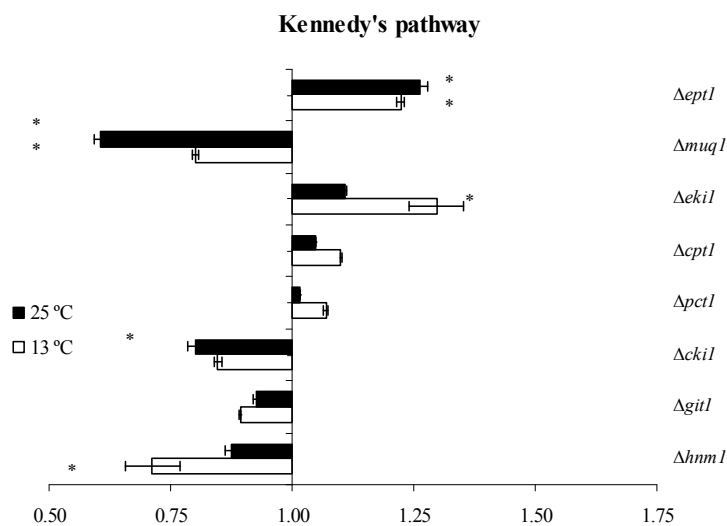
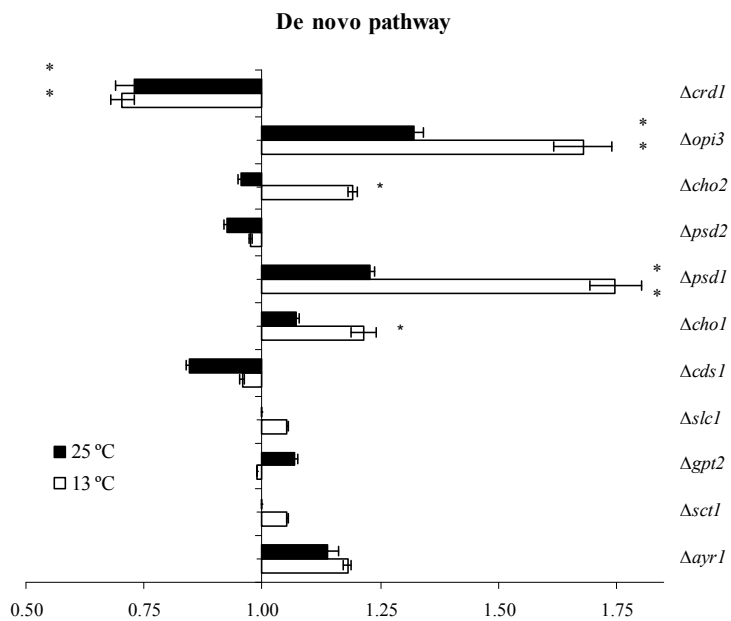


Figure 2. Vitality of the phospholipid mutant strains. The results are normalised respect to the time needed by the wild type (value = 1). Thus, the mutant strains which improved the vitality are shown on the left of the axis while the unfavourable deletions upon vitality are performed on the right. Impedance results are shown at two different temperatures 25 °C and 13 °C. * Significant differences respect the wild type at the same temperature tested.

Growth of the phospholipid mutants

The results of vitality allowed us to select these mutants which may be important in the fermentation at low temperature. Thus, the generation time of the phospholipid mutants, which had shown differences in fermentation vitality, was determined at 25 °C and at 13 °C on the SC medium (Table 2). It was remarkable the important growth impairment showed by the mutant strains $\Delta opi3$, $\Delta cho2$ and $\Delta psd1$ at 13 °C whereas they were hardly or not affected at 25 °C. Likewise, these strains showed the lowest fermentation vitality at 13 °C. However, there is not always a good agreement between fermentation vitality and growth data. Some deletions reduced the generation time at 25 °C, such as *CHO1*, *CRD1*, *PCT1* and *CKII*, but no mutant showed significant reduction in the generation time at 13 °C.

Table 2. Generation time of the different mutant strains

Mutant strains	Generation time (hours)	
	25 °C	13 °C
BY4742	3.09 ± 0.09	20.23 ± 0.04
$\Delta crd1$	2.47 ± 0.08*	18.88 ± 0.29
$\Delta opi3$	4.55 ± 0.37*	276.83 ± 76.00 *
$\Delta cho2$	4.28 ± 0.15*	106.74 ± 4.64*
$\Delta psd1$	3.28 ± 0.06	46.21 ± 0.44*
$\Delta cho1$	2.24 ± 0.12*	18.71 ± 0.32
$\Delta muq1$	2.91 ± 0.04	20.72 ± 0.48
$\Delta ept1$	2.49 ± 0.02	17.96 ± 0.96
$\Delta cki1$	1.96 ± 0.04*	19.82 ± 0.88
$\Delta eki1$	2.73 ± 0.17	19.42 ± 0.46
$\Delta hnm1$	2.82 ± 0.02	19.64 ± 0.71
$\Delta ale1$	2.90 ± 0.05	20.66 ± 0.45
$\Delta gde1$	2.98 ± 0.08	20.06 ± 0.45

Phospholipid composition of some mutants

According to the most significant results obtained in vitality and generation time, the phospholipid composition of some mutants, concretely four mutants in the *de novo* pathway, one in the Kennedy pathway and two in the PC recycling, was analysed (Fig. 3). As expected, the *PSD1* and *OPI3* deletions induced a significant reduction of PE and PC contents in the cells respectively. In the $\Delta psd1$, PI and PS were increased while PC and PE decreased. For $\Delta opi3$, the strong reduction of PC seemed to be compensated by a significant increase of PI. Furthermore, in this mutant, we detected an extra band on the HPTLC plates. This band was ninhydrin positive and this suggests us which could be the intermediates phosphatidyl-monomethylethanolamine (PMPE) and phosphatidyl-dimethylethanolamine (PdiMPE). When the deletion was produced in *CHO2*, the PI, PE and PA levels increased, while the contents of PC and CL decreased respect to the control. Finally none cardiolipin was detected in the $\Delta crd1$ but, contrary to the wild type, its precursor phosphatidylglycerol (PG) showed the same concentration than the CL content in the control. The $\Delta hmn1$, the only Kennedy pathway mutant analysed, had a significant decreased in the PC content. Otherwise, significant changes were observed in the $\Delta ale1$ for the PE level.

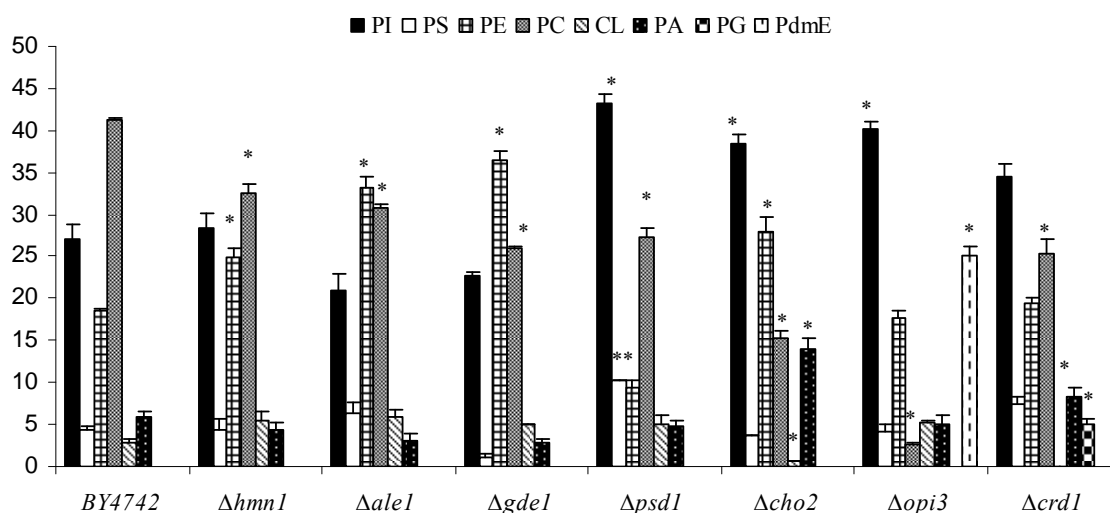


Figure 3. Phospholipid composition of different BY4742 mutants

Phenotypic analysis of $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$ mutants

Two mutant strains affected by low temperature were $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$. The genes mutated in these strains encode the previous and subsequent enzymes in the synthesis of PE respectively. As mentioned above, these mutations altered the composition of the two main phospholipids,

PE and PC. In order to check the ability of these mutant strains to circumvent the blockage in the main phospholipid synthesis pathways (*de novo* and Kennedy), we incubated the $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$ strains in the presence of different concentrations of the polar heads of these phospholipids, choline or ethanolamine. We firstly tested the fermentation vitality of these mutant strains after incubation in the presence of choline or ethanolamine. As can be seen in Fig. 4, the $\Delta psd1$ reverted to the same fermentation vitality of the wild strain BY4742 after incubation in the presence of either choline or ethanolamine. In the case of $\Delta cho2$, this strain only showed the same phenotype than the BY4742 after the incubation with choline. Even more, the incubation of $\Delta cho2$ with ethanolamine yielded the lowest vitality of all the conditions and strains tested.

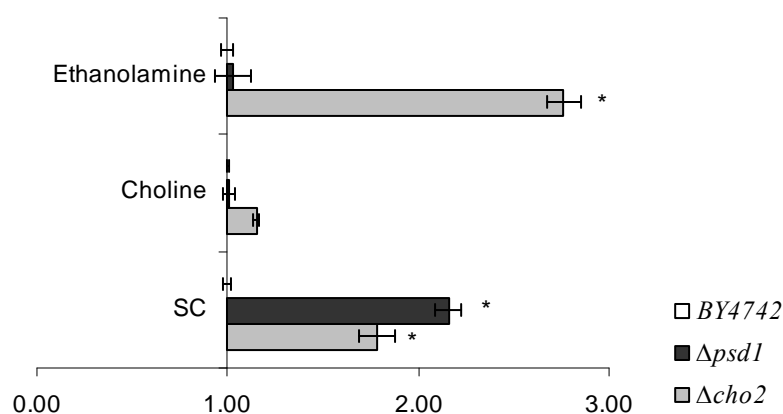


Figure 4. Effect of choline or ethanolamine (2mM) supplementation on vitality at low temperature in the mutants $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$. *Significant differences respect the wild type. Impedance expressed in hours to reach the 10% threshold, standardised with the hours needed by the wild type.

We also performed a phospholipid analysis of the wild strain and the $\Delta psd1$ and $\Delta cho2$ mutants in the presence or absence of these polar head groups in the culture media. The cellular concentration of the two phospholipids involved in the genes mutated (PE, PC and PI) are shown in figure 5. The first remarkable result is that the composition of the wild strain BY4742 was not modified by the presence of choline or ethanolamine. Thus, the *de novo* and Kennedy pathways are the most important routes in the synthesis of phospholipids. On the other hand, the incubation of $\Delta psd1$ in the presence of choline or ethanolamine yielded the same phospholipid profile that the BY4742. In the case of $\Delta cho2$, its phospholipid profile was very similar to the reference strain when it was incubated with choline, but significant

differences were observed in PE and PC content when this strain was incubated with ethanolamine (similar to the incubation in absence of the polar head groups). These results clearly fit with the reversion of these mutants in the fermentation vitality.

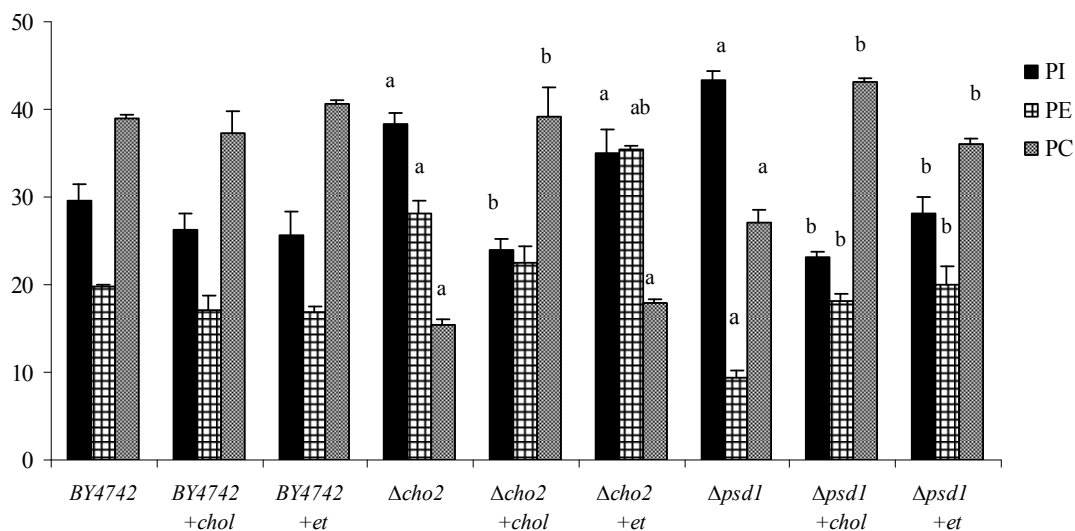


Figure 5. Phospholipid composition of the strain BY4742 and the mutant strains $\Delta cho2$ and $\Delta psd1$ with and without choline or ethanolamine (2mM) supplementation. ^a Significant differences respect to the wild type. ^b Significant differences respect to the same strain without supplementation.

Phenotypic analysis of $\Delta crd1$ mutant

As observed above, the $\Delta crd1$ strain showed better vitality than BY4742 at both temperatures (Fig. 2). Other remarkable feature of this mutant was that PG was accumulated in the cells because the impossibility to synthesise CL (Fig. 3). Because of the cardiolipin (CL) and its precursor PG are key components of the mitochondrial inner membrane and are required for both the integrity and optimal activity of many mitochondrial proteins, we determined the fluorescence of BY4742 and $\Delta crd1$ cells by microscopy after DiOC6(3) treatment, which is generally used to measure the membrane potential of mitochondria and by consequence to determine their integrity. As observed in figure 6, the $\Delta crd1$ mutant showed unstructured mitochondria after 4 hours of inoculation in a synthetic grape must whereas the wild type presented organized structures. After 8 hours, the lack of structured mitochondria was even more evident at both temperatures. At this point, the wild type at 25 °C also pointed out to the formation of these aberrant structures in the mitochondria (not well-defined mitochondria were observed). The formation of these unstructured mitochondria must be related with the

fermentative metabolism imposed during wine fermentation. The formation of these structures was quicker at 25 °C than a 13 °C fermentation, in which metabolism was slowed down.

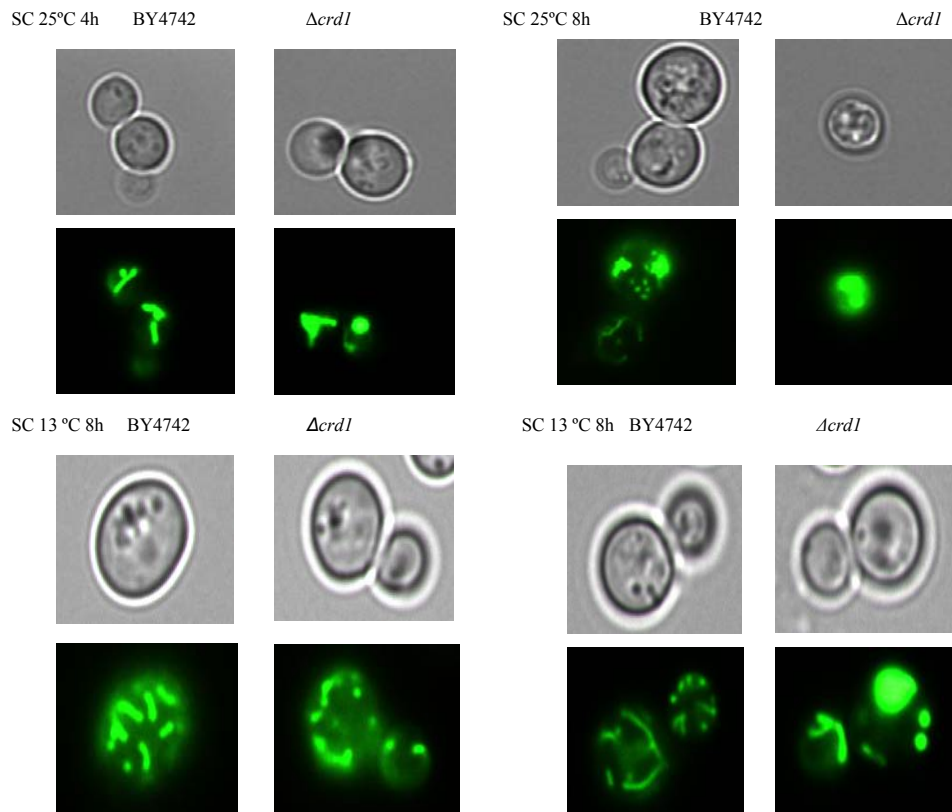


Figure 6. Yeast mitochondria staining with DiOC6(3) probe

Discussion

Plasma membrane is the initial sensor of different stress conditions and its composition is modified with response to environmental changes. In a previous study we modified the lipid composition of the membrane by growing *S. cerevisiae* in the presence of different fatty acids and ergosterol. The cells incubated with palmitoleic acid (C16:1) showed higher viability and significant reduction in the fermentation length at 13 °C. These cells presented higher C16:1 and ergosterol content, shorter chain length of the fatty acids and higher ratio of sterols/phospholipids (Redón et al. 2009). In this work we have chosen an alternative strategy by using phospholipid mutants of *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 in order to redesign the yeast lipid composition and to improve the vitality and fermentation performance at low temperature.

Of all the phospholipid mutants of the Euroscarf collection, we were mainly interested in those mutants with phenotype affected by low temperature but unaffected at optimum temperature. The both $\Delta cho2$ and $\Delta psd1$ mutants showed a lower vitality than the reference strain and presented important growth impairment at low temperature. These genes encode the enzymes involved in the synthesis of the most important plasma membrane phospholipids PE and PC (Blusztajn, 1998). The PS-decarboxylase (Psd1p) localised in the mitochondrial inner membrane (Clancey et al. 1993; Trotter et al. 1993) decarboxylates PS in order to synthesise PE by the *de novo* pathway. In this $\Delta psd1$ mutant, PE deficiency and growth retardation can be rescued with ethanolamine that serves as a precursor for PE synthesis via the Kennedy pathway. The Cho2p (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase) transfers a methyl group to PE to create PMME, a precursor of PC by the *de novo* pathway. In this $\Delta cho2$ mutant, the growth and vitality defects only reverted with the presence of choline in the medium which allowed to the cell recovered the regular synthesis of PC by the CDP-Choline branch of the Kennedy pathway. The incubation in presence of ethanolamine increased a lot the synthesis of PE by the CDP-Ethanolamine branch but, as expected, *CHO2* disruption prevented the normal content of PC. Thus, these two mutants practically presented an auxotrophic requirement for choline when growing at low temperature. This redundancy of pathways for the synthesis of PE or PC reveals the importance of these PLs for the cell which has developed a safe pathway of biosynthesis in the case that the main pathway does not function properly. Similar fermentation and growth behaviour was observed for $\Delta opi3$. This mutant presented the longest generation time at low temperature (5-fold longer than the reference strain). Similarly to the results of McGraw et al. (1989), this mutant showed the lowest cellular PC content of the studied strains.

A common trait of all the mutants that present a growth or vitality defect is a lower concentration of PC and/or PE. If it is known the importance of these PLs for cell viability, in the case of low temperature, sub-optimal concentrations of PC and PE indeed produce a great impact in cell viability and vitality. Anyway, in the light of our results, it seems that the *de novo* pathway is the preferred PE and PC synthesis pathway. *HNMI* gene is a permease which imports choline and ethanolamine into the yeast cell (Hosaka and Yamashita, 1980; Nikawa et al. 1990), allowing the use of choline or ethanolamine by the Kennedy's pathway. The $\Delta hmn1$ was not affected in its growth capacity and even improved its vitality at low temperature, and only a smaller content of PC was detected in its phospholipid profile. This result could

explain the dominant role of the *de novo* pathway in cellular PE and PC vs. the Kennedy pathway.

The most remarkable result in the genes involved in the turnover route was that the deletion of *GDE1* (glycerophosphodiesterase) significantly decreased the vitality at low temperature but growth was not affected at all. The deletion of this gene prevents the hydrolysis of GroPC by Gde1p to produce choline and glycerolphosphate. GroPC results from the PC deacylation and can be taken up by yeast cells through the Git1p permease. The phospholipid profile of $\Delta gde1$ increases PE and decreases PC respect to the wild strain.

Conversely, the deficiency or even the absence in some PL seems to contribute for better vitality and viability. This is the case of the $\Delta crd1$ mutant. CRD1 encodes the cardiolipin synthase which catalyses the last step in the synthesis of CL. Cardiolipin is a unique and ubiquitous anionic phospholipid which is present throughout the eukaryotic kingdom and is localised in the inner mitochondrial membrane. CL plays an important role not only in mitochondrial bioenergetics, which is not unexpected given the interaction of CL with mitochondrial proteins, but also in essential cellular functions not generally associated with respiratory function. Some of these include mitochondrial protein import, cell wall biogenesis, translational regulation of electron transport chain (ETC) components, ceramide synthesis and aging and apoptosis (Joshi et al. 2009). As expected, cardiolipin was not detectable in the $\Delta crd1$ strain and the phosphatidylglycerol (PG), substrate of Crd1p, was accumulated in this mutant. In yeast, PG is a low abundance phospholipid, present at best as a few tenths of a percent of total cellular phospholipids, even under the conditions of respiratory growth (Chang et al. 1998). In fact, PG was not detected in any of the mutants or wild type analysed. The absence of CL was not lethal for the cell and PG can circumvent most of the functions assigned to CL. Conversely, the lack of synthesis of both PG and CL causes more severe phenotypes (Zhong et al. 2004; Pfeiffer et al. 2003) and is unviable in the genetic background of the BY4742. However, this mutant displayed aberrant or unstructured mitochondria few hours after inoculating in a grape must. We have previously observed these unorganised structures in the mitochondria in yeast cells after fermenting several hours a grape must (Salvado et al. in preparation). Thus it could be concluded that the deletion of *CRD1* produces a premature unstructured mitochondrial. Curiously the phenotype observed for this mutant was that vitality was significantly better and the generation time slightly shorter than the wild type at low temperature. In a previous study, Jiang et al (2000) reported that $\Delta crd1$ mutant

lost vitality at elevated temperature, and that prolonged culture at 37 °C led to loss of the mitochondrial genome but it was unaffected at the optimal temperature (30 °C). Several studies have proved that yeast cells have a period of respirofermentative metabolism (Postma et al. 1989; Van Urk et al. 1990) in the first hours of fermentation which consumes the pyruvate either respirative pathway or oxidative pathway. Thus the best vitality (CO₂ production) of $\Delta crd1$ might be due to a quicker respirative metabolism blockage in favour of fermentative metabolism. Moreover, this respirofermentative metabolism would be longer at low temperature as consequence of the slow down metabolism, being more evident the differences between the *crd1* mutant and the wild type.

In summary, phospholipid biosynthesis is carried out by a network of complex pathways very regulated and with counterbalanced mechanism, mainly due to the presence of several redundant routes for the synthesis of the same metabolite. In spite of this complex metabolic network, the deletion of some key genes showed an important impact in the phospholipid constitution of the cells. The *de novo* synthesis pathway seems to be the preferred one for the cell to synthesise the main cellular phospholipids. Deletion of genes encoding enzymes of this route presented an important impact in the viability and vitality of the cells, especially those implicated in PE and PC synthesis. A correct cellular concentration of these two PLs resulted crucial for growth and fermentation capacity at low temperature. Conversely the absence of CL produced unstructured mitochondria and improved the fermentation capacity (vitality) in the first hours of fermentation whatever the culture temperature (13 or 25 °C). On the basis of these results, the construction of mutants and overexpressing strains for some of the analysed genes in a wine strain would be of a great interest. The objective of this future work would be to test if similar conclusions can be obtained in another genetic background, taking into account the great differences, widely reported, existing between a lab and an industrial strain. A longer term objective will be the application of this knowledge to obtain genetically improved wine yeasts in growth and fermentation performance at low temperature wine fermentations.

Acknowledgements

This work was financially supported by grant from the Spanish government (AGL2007-65498-C02/ALI). The authors would also like to thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for checking the manuscript.

References

1. Aguilar PS, de Mendoza D. (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol* 62(6):1507-14.
2. Avery SV, Lloyd D, Harwood JL (1995) Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* are closely correlated. *Biochem J* 312:811-816.
3. Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamon JM, Mas A, François J, Rozes N (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res* 6(8):1167-83.
4. Blusztajn JK (1998). Choline, a vital amine. *Sci.*;281:794-795.
5. Carman, G. M., and G. S. Han. 2007. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 322-330.
6. Chang SC, Heacock PN, Mileykovskaya E, Voelker DR, Dowhan W (1998) Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(24):14933-41.
7. Chen M, Hancock LC, Lopes JM (2007) Transcriptional regulation of yeast phospholipid biosynthetic genes *Biochim Biophys Acta* 1771: 310-321.
8. Clancey CJ, *et al.* (1993) Cloning of a gene (*PSD1*) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant. *J Biol Chem* 268(33):24580-90
9. Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* 17;4:17.
10. Hosaka K and Yamashit S (1980) Choline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 143(1): 176-181.
11. Jiang F, Gu Z, Granger JM, Greenberg ML (1999) Cardiolipin synthase expression is essential for growth at elevated temperature and is regulated by factors affecting mitochondrial development. *Mol Microbiol* 31(1):373-9
12. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML (2000) Absence of Cardiolipin in the *crdl* Null Mutant Results in Decreased Mitochondrial Membrane Potential and Reduced Mitochondrial Function *J Biol Chem.*275:22387-94
13. Joshi AS, Zhou J, Gohil VM, Chen S, Greenberg ML (2009) Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1793: 212-218
14. Koning AJ, Lum PY, Williams JM, Wright R (1993) DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells *Cell Motility and the Cytoskeleton* 25:111 - 128 1993
15. Los DA and Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* 1666:142-157.
16. Martin CE, Oh CS, Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1771(3):271-85. 13.

17. McGraw P, Henry S (1989). Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae opi3* Gene: Effects on Phospholipid Methylation, Growth and Cross-Pathway Regulation of Inositol Synthesis. *Genetics* 122:317-330.
18. Murata N and Wada H (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem J* 308:1-8.
19. Nikawa J, Hosaka K, Tsukagoshi Y, Yamashita S (1990) Primary structure of the yeast choline transport gene and regulation of its expression. *J Biol Chem.*; 265(26):15996-6003.
20. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278: 52873–52880.
21. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP (1989) Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb* 55: 468–477.
22. Redón M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2008) Effect of active dry wine yeast storage upon viability and lipid composition *World J Microbiol Biotechnol* 24:2555-2563
23. Redón M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2009) Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Eur Food Res Technol* 228:833-840
24. Sakamoto T, Shen G, Higashi S, Murata N, Bryant DA (1998) Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Arch Microbiol* 169:20-28.
25. Schuiki I, Schnabl M, Czabany T, Hrastnik C, Daum G (2009) Phosphatidylethanolamine synthesized by four different pathways is supplied to the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. Dec 28 .
26. Ståhlberg K, Neal AC, Ronne H, Ståhl U (2008) Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae*. *J Lipid Res.*; 49(8):1794-806.
27. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 85:127-136
28. Trotter PJ, Pedretti J, Voelker DR (1993) Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J Biol Chem* 268:21416–21424
29. Van Urk H, Voll WS, Scheffers WA, van Dijken JP (1990) Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtreepositive and Crabtree-negative yeasts. *Appl Environ Microb* 56:281–287.
30. Zhong Q, Gohil VM, Ma L, Greenberg ML (2004). Absence of cardiolipin results in temperature sensitivity, respiratory defects, and mitochondrial DNA instability independent of *pet56*. *J Biol Chem* 279: 32294–32300.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

Tradicionalmente el vino se ha elaborado mediante fermentaciones espontáneas realizadas por levaduras procedentes de la uva y de la bodega, sin inoculación de cultivos iniciadores. Esto hace que las fermentaciones espontáneas sean producto de una sucesión de diferentes cepas y especies autóctonas que crecen a lo largo del proceso fermentativo (Kunkee & Amerine, 1970; Ribéreau-Gayon et al., 1975; Lafon-Lafourcade, 1983; Zambonelli, 1988). Unas pocas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que están mejor adaptadas controlan la mayor parte de la fermentación (Frezier & Dubourdieu, 1992; Vezinhet et al., 1992; Fleet & Heard, 1993; Versavaud et al., 1993). Obviamente, la calidad del vino estará claramente afectada por la cepa de *S. cerevisiae* que lleve a cabo la vinificación (Vezinhet y Pineau, 1990; Fleet y Heard, 1993).

El interés por la elaboración de vinos blancos y rosados mediante fermentaciones a bajas temperaturas (10-15 °C) surge en busca de productos con un mejor perfil organoléptico que los obtenidos a temperaturas entre 18-21 °C (Llauradó, 2002, Beltran, 2002; Torija, 2003; Novo 2003). Sin embargo, la disminución de la temperatura a 12-15 °C también implica inconvenientes como una larga fase de latencia y riesgo de fermentaciones lentas e incluso paradas (Bisson, 1999).

La necesidad de asegurar la fermentación y la calidad del producto ha favorecido el uso de levaduras secas activas (LSA) obteniendo un inicio más rápido de la fermentación, un consumo total de azúcares fermentables, un mayor control microbiológico (Longo et al., 1992) y la producción de un vino de una calidad más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Ribéreau-Gayon, 1985; Giudici y Zambonelli, 1992; Fleet & Heard, 1993). La elección del cultivo iniciador, su calidad y adecuada conservación son factores importantes a controlar para conseguir una fermentación óptima. Las propiedades de un lote de levadura seca activa (LSA) van a evolucionar en función de las condiciones de almacenamiento y, principalmente de la temperatura de este almacenamiento. Para evitar el deterioro de sus características, debe conservarse siempre a 4 °C. En estas condiciones, y siempre que no se dañen los envases, se garantiza su perfecta conservación entre 2 a 5 años. Sin embargo, es bastante usual en las bodegas la utilización de paquetes de levadura seca activa abiertos en campañas anteriores. El almacenamiento de estos inóculos en condiciones inadecuadas (el paquete no bien sellado, mantenido a temperatura ambiente) puede ocasionar estrés a la levadura (principalmente oxidativo) y el consecuente daño celular, que redundará en una pérdida significativa de viabilidad y capacidad fermentativa (Laroche & Gervais, 2003).

El primer capítulo de esta tesis tenía vocación de puesta a punto de la mayoría de los métodos analíticos para el estudio del metabolismo lipídico en *S. cerevisiae* y su modificación como consecuencia de la baja temperatura de fermentación. Esta puesta a punto se aprovechó para comprobar el efecto del almacenamiento de un lote abierto de levadura seca activa durante 2 años a 4 °C sobre la viabilidad, la vitalidad a bajas temperaturas y la composición lipídica. Este lote almacenado, a pesar de haberse conservado a una temperatura de 4 °C, no se encontraba bien sellado y había sido utilizado muchas veces, lo que implicaba la rotura de la cadena de frío en diferentes ocasiones durante periodos relativamente largos. Esta cuestión se nos había planteado por parte de algunas bodegas que no sabían si utilizar las levaduras de un año para otro. En este trabajo, se comparó un lote de la levadura vínica comercial *Saccharomyces cerevisiae* (QA23) almacenada en condiciones no óptimas frente a un lote nuevo (control) de la misma cepa. En las células almacenadas se vio reducida su viabilidad considerablemente, sin embargo, en las células control también se vio afectada la capacidad de las células para poder reproducirse debido al efecto de secado y rehidratación, como ya fue descrito por Boyaval & Schuck (1994). En nuestro trabajo, para intentar solucionar los problemas causados por el proceso de deshidratación y por un inadecuado almacenamiento, se optó por realizar un crecimiento (*overnight*) en un medio de cultivo óptimo (YEPD). En este medio se consiguió una recuperación de la viabilidad tanto para el lote almacenado como para el lote nuevo. Igualmente se obtuvo una recuperación de la vitalidad a bajas temperaturas en ambos casos, tanto para las células almacenadas como para las células control. De modo que una posible solución para estas levaduras almacenadas de un año para otro o para aumentar la velocidad de fermentación en condiciones difíciles, como es a baja temperatura, puede ser la generación de “pies de cuba” en medios óptimos para el crecimiento. Esto permite recuperar a células dañadas tanto por el almacenamiento como por el proceso de secado.

La fluidez de la membrana disminuía a bajas temperaturas, excepto para el caso de las levaduras almacenadas. La respuesta se pensó que podría encontrarse en la composición lipídica de la membrana plasmática. De manera que se realizó un estudio de la composición lipídica de los cuatro tipos de muestras. Tras la recuperación en YEPD, se obtuvo un aumento de la composición total en ácidos grasos en las células y un cambio en los porcentajes de las diferentes proporciones de ácidos grasos individuales. Las células almacenadas presentaban una disminución del contenido en ácidos grasos insaturados (UFA) principalmente de C16:1 y una pérdida de la concentración de ergosterol y fosfolípidos totales. También se observó un descenso del contenido en fosfatidilserina (PS), causado posiblemente por una translocación

de este fosfolípido de la parte interna de la membrana a la parte externa, lo que podría desencadenar un proceso de apoptosis (Laun et al., 2001; Del Carratore et al., 2002; Herker et al., 2004). Todos estos cambios del perfil lipídico de las levaduras almacenadas rehidratadas son el resultado de un almacenamiento inadecuado y el consecuente daño estructural de la membrana y posible pérdida de la asimetría. También es importante destacar que una relación ergosterol/PS alta podía ser importante para mantener la integridad de membrana.

Relacionando todas las variables estudiadas mediante análisis de correlación, observamos que para que las levaduras presenten una buena vitalidad a bajas temperaturas es importante que en su membrana plasmática conserven un alto porcentaje en UFA, PS y fosfatidiletanolamina (PE) para mantener una fluidez y asimetría adecuada. Una buena correlación entre el contenido en UFA y las fermentaciones a bajas temperaturas ya se había demostrado en otros trabajos de nuestro grupo (Torija et al., 2003; Beltran et al., 2006). Sin embargo los efectos de la PS y PE todavía no habían sido descritos.

Las recuperaciones en YEPD se realizaron en condiciones de aerobiosis, por lo que consecuentemente se aumentaron los niveles de ácidos grasos insaturados y ergosterol (Suomalainen & Lehtonen, 1979). De igual modo se vieron incrementados los niveles de ésteres de esteroides (EE) y triacilglicerol (TAG) en los dos tipos de células recuperadas. Estas moléculas son moléculas de almacenamiento de energía y presentan la capacidad de detoxificar niveles altos de esteroides, precursores de esteroides y ácidos grasos libres (Müllner & Daum, 2004), pero también pueden servir para cubrir las necesidades de las levaduras en fermentaciones a bajas temperaturas en vinos blancos y rosados, donde se pueden encontrar en condiciones de hipoxia, con la consiguiente incapacidad de sintetizar esteroides y ácidos grasos.

Una vez parecía que teníamos localizadas las moléculas claves en una mayor tolerancia, por parte de una levadura vínica, a la baja temperatura, pensamos que debíamos comprobar si esta constitución lipídica óptima era general a todas las cepas industriales de *Saccharomyces* o si era más bien una cuestión cepa-específica. Es decir, si cada cepa presentaba una estrategia diferente de adaptación a la baja temperatura. Por este motivo, en el capítulo II se analizó como se modificaba la composición lipídica en función de la temperatura en diferentes cepas industriales de *S. cerevisiae*. Entre estas cepas había representantes de los procesos fermentativos tradicionales (cerveza, vino y elaboración de pan), pero también se incluyeron

cepas de otras especies del género *Saccharomyces* y cepas híbridas de este mismo género, que han sido previamente descritas formando parte de la microbiota de estas fermentaciones industriales. También se incluyó en el estudio una levadura de laboratorio (BY4742), que esperábamos mostrase un comportamiento fermentativo muy alejado de las industriales. En primer lugar se analizó el comportamiento fermentativo a bajas temperaturas de estas cepas tras precultivo a 25 °C y 13 °C y se estudió su composición lipídica. El precultivo a baja temperatura nos permitía comprobar si una cepa tenía facilidad de adaptación a la baja temperatura y si esta adaptación estaba relacionada con la modificación en la composición lipídica.

La mayoría de cepas analizadas mejoraron su comportamiento fermentativo a bajas temperaturas tras una previa adaptación en YEPD a bajas temperaturas. Esto demostraba que hacer coincidir la temperatura de crecimiento de un precultivo con la temperatura de fermentación mejoraba notablemente el inicio del proceso y la actividad fermentativa. Sin embargo, algunas de las cepas estudiadas no presentaban diferencias en la cinética fermentativa en función de la temperatura de crecimiento previa a la inoculación. Este es el caso de la cepa vínica QA23 y el híbrido, las cuales se caracterizaban por ya presentar una buena cinética fermentativa a baja temperatura sin una aclimatación previa a esta temperatura. De alguna manera, podemos pensar que estas cepas ya están bien adaptadas a fermentar a baja temperatura sin la necesidad de un paso previo de adaptación. Aunque también existe alguna excepción a esta conclusión. Es el caso de la levadura de laboratorio que mostraba un pobre comportamiento fermentativo con el precultivo de 25 °C, y sin embargo, si este precultivo se realizaba a baja temperatura todavía empeoraba más su cinética fermentativa. Es evidente que esta levadura presenta una pobre actividad metabólica a baja temperatura y el crecimiento a esta temperatura produce cultivos de una menor vitalidad y actividad fermentativa. Curiosamente la cepa de laboratorio presentaba la mayor proporción de ergosterol de todas las cepas estudiadas, lo cual se ha relacionado previamente con resistencia al etanol y mayor actividad fermentativa (Shobayashi et al., 2005). Sin embargo, esta cepa era incapaz de transformar los azúcares del mosto en etanol. Mannazzu et al. (2008) ya afirmaron que un alto contenido en ergosterol no era esencial para la viabilidad celular durante la fermentación, aunque una pequeña cantidad era imprescindible. Esta cepa de laboratorio se utilizó como control negativo porque no era capaz de llevar a cabo la transformación de azúcares en etanol de forma eficaz.

La mejoría en la actividad fermentativa tras un proceso de aclimatación o adaptación a la baja temperatura podía estar relacionada con la modificación de la composición lipídica de las membranas celulares. A pesar de que podíamos observar mecanismos de adaptación cepa-específicos, si podemos hablar de algunas respuestas comunes a la mayoría de las cepas industriales analizadas. Además, muchas de estas respuestas coincidían con los mecanismos de adaptación ya descritos en el capítulo I. Un resultado curioso y bastante generalizado era el aumento de la concentración de los ácidos grasos totales (TFA), fosfolípidos (PL), esteroides totales (ST) y triacilglicéridos (TAG) a baja temperatura. Si el principal objetivo de la adaptación de la célula a baja temperatura es aumentar la fluidez de la membrana plasmática, no vemos ninguna relación entre este aumento de la mayoría de los componentes lipídicos y la disminución de la rigidez. En otros trabajos anteriores se había propuesto que la fluidez de la membrana plasmática podría ser correlacionada con un descenso en las ratios esteroles/PL y esteroles/proteína y un aumento en el índice de insaturación (Alexandre et al., 1994), pero en nuestro caso se observa una tendencia al aumento de la concentración tanto de PL como de ST entre otros compuestos citados anteriormente, aunque no en todos los casos el incremento de su concentración es significativo. Una posible explicación de esta acumulación de lípidos (algunas moléculas actúan como reservorios lipídicos) podría ser a causa de un desacople entre crecimiento, mucho más lento a baja temperatura, y síntesis lipídica. Esta posibilidad debería ser analizada en un futuro comprobando la actividad de algunas enzimas claves del metabolismo lipídico y la tasa de síntesis de algunas moléculas lipídicas. La acumulación de ácidos grasos en las células supondría la síntesis de TAG. Los TAG pueden tener una función de detoxificación de exceso de ácidos grasos y están a la vez relacionados con la síntesis de fosfolípidos compartiendo intermediarios como el diacilglicérol (DAG) y el ácido fosfatídico (PA) (Gaspar et al., 2008).

Otros cambios generales en la composición lipídica como consecuencia de la temperatura, muchos de ellos ya observados en el capítulo I, eran un aumento de los MCFA, un aumento de la ratio UFA/SFA (en algunas cepas) y una disminución de la ratio PC/PE, generalmente como consecuencia de un aumento de PE a baja temperatura, aunque el descenso de dicha ratio solamente era significativo para la cepa híbrida. Por último, se pudo observar que las células precultivadas a bajas temperaturas disminuían su contenido en PA. En el análisis de componentes principales, el PA es la variable que explica en un mayor porcentaje el factor 2, el cual separa las diferentes cepas principalmente por el efecto de la temperatura de precultivo.

La elección de la cepa de levadura a inocular y el control eficaz de las interacciones entre la levadura, el mosto y las condiciones de fermentación son factores importantes que determinan la duración de la fermentación, la composición química y las propiedades organolépticas de un vino (Pretorius et al., 2000). Para las fermentaciones a bajas temperaturas es crucial la elección de una cepa del género *Saccharomyces* que tenga un amplio rango de temperatura de crecimiento y por tanto esté bien adaptada a esta condición (Castellari et al., 1994; Giudici et al., 1998; Massoutier et al., 1998). La producción de híbridos intra- e inter-específicos del género *Saccharomyces* permite la generación de cepas que aporten aromas diferenciadores en determinados vinos o puedan adaptarse mejor a determinadas condiciones de estrés como podrían ser las fermentaciones a bajas temperaturas (González et al., 2006; Belloch et al., 2008).

Una vez analizados los mecanismos de adaptación a la baja temperatura mediante la modificación de la composición lipídica en los capítulos I y II, nos propusimos modificar esta composición por dos estrategias. La primera consistió en incubar las células en presencia de diferentes moléculas lipídicas y así enriquecer las membranas en las mismas. La segunda implicaba la utilización de mutantes que produjesen carencia y acumulación de determinados compuestos de la ruta de síntesis. Los resultados de ambas estrategias han quedado reflejados en los capítulos III y IV.

En el capítulo III, se incubó la levadura vínica QA23 en presencia de diferentes ácidos grasos y ergosterol. Mediante el enriquecimiento en el contenido lipídico celular de alguna de estas moléculas pretendíamos mejorar la cinética de las fermentaciones a bajas temperaturas, tratando de reducir el tiempo de duración de la fase de latencia. Es importante tener en cuenta que las levaduras sufren un fuerte choque térmico, junto con el choque osmótico, cuando son inoculadas desde el agua de rehidratación (a 37 °C) al mosto refrigerado. En algunos trabajos de nuestro grupo se ha propuesto un período de adaptación al nuevo medio (mosto) que mejore la capacidad fermentativa a bajas temperaturas (Novo et al., 2003), o, como veíamos en el capítulo I, una preadaptación en medio de cultivo óptimo (YEPA), el cual reducía también la duración de la fase de latencia.

La incorporación de ácidos grasos exógenos ya se había comprobado en otros trabajos anteriores (Avery et al., 1996; Beltran et al., 2006) pero nunca se había estudiado el efecto de la incorporación de estos lípidos sobre la síntesis de otros constituyentes lipídicos. El primer

efecto remarcable fue el descenso en la concentración total de ácidos grasos en las células incubadas en presencia de diferentes ácidos grasos. La explicación de esto podría atribuirse a una represión transcripcional (Chirala et al., 1992; Gabardino et al., 2005). Del mismo modo ocurría con la incubación con ergosterol.

De entre los diferentes compuestos lipídicos utilizados para la adición se observó una reducción significativa del tiempo de fermentación para las células suplementadas con ácido palmitoleico (C16:1) y también una mayor viabilidad. De acuerdo con estos resultados, Mannazzu et al., (2008) también habían observado una mayor viabilidad y mejor cinética fermentativa en las cepas de levadura con un mayor porcentaje en C16 (palmitico + palmitoleico). Las células cultivadas con ácido palmitoleico, además de la incorporación del propio ácido graso, mostraban modificaciones en otros componentes lipídicos. Algunos de estos cambios corroboraban los resultados obtenidos en anteriores capítulos. Así, las células incubadas en presencia de C16:1 presentaban una disminución de la longitud de cadena de los ácidos grasos, un mayor contenido en esteroides y una mayor ratio entre esteroides/fosfolípidos (PL). En otros trabajos también se ha comprobado que el ácido palmitoleico, inducido por el estrés en fermentaciones de alta densidad celular, tiene una función protectora frente al daño y mejora el mantenimiento de la viabilidad (Ding et al., 2009). Sin embargo, por el contrario de lo esperado teóricamente, las células incubadas con ácido palmitoleico presentaban mayor rigidez de membrana que las células control. Por tanto, la mejor actividad fermentativa de estas células enriquecidas en C16:1 no puede ser relacionado con la disponibilidad de membranas más flexibles. En otros trabajos se ha descrito una relación directa entre el alto contenido en esteroides y una ratio alta esteroides/PL con menor fluidez de membrana (Arora et al., 2004; Sharma et al., 2006).

Así como el ácido palmitoleico producía una reducción importante del tiempo total de fermentación, el crecimiento en presencia de ácido esteárico (C18) producía células con menor actividad fermentativa y menor viabilidad. Curiosamente, los cambios que se producían en estas células si que, en líneas generales, van en la dirección contraria a los cambios adaptativos observados en los capítulos I y II. Estas células se caracterizaban por presentar una menor concentración celular de fosfolípidos, triglicéridos y esteroides. En cuanto a fosfolípidos individuales, en el capítulo I y II observábamos un aumento de la PE y disminución de PC (o disminución de la ratio PC/PE). En las células incubadas con C18 se producía un aumento significativo de PC. Estos cambios eran similares a los de las células

preincubadas con ergosterol pero con la diferencia de que estas células presentaban una ratio UFA/SFA mucho mayor.

Recientemente se ha descrito que la adición de algunos compuestos lipídicos como el ácido oleico y el ergosterol mitigan el estrés y daño oxidativo en cepas vínicas de *S. cerevisiae* durante su crecimiento bajo condiciones desfavorables, la disponibilidad de nutrientes lipídicos causa una reducción significativa del contenido intracelular de especies reactivas al oxígeno (ROS) y del daño oxidativo a las membrana y proteínas. Otra consecuencia descrita fue un descenso del contenido en trehalosa, puesto que ya no se requería para la protección de las membranas celulares en presencia de ácido oleico y ergosterol (Landolfo et al 2010)

Además de estas moléculas, hubiese sido interesante haber incubado las células en presencia de algunos fosfolípidos que se había comprobado que aumentaban en las células incubadas a baja temperatura y parecen ser interesantes en la adaptación de la membrana. Este es el caso de la fosfatidiletanolamina. En un trabajo futuro sería interesante analizar el efecto sobre el crecimiento y la velocidad fermentativa de células incubadas en presencia de este fosfolípido o de algún compuesto que estimule su síntesis (p.e. etanolamina).

Como se mencionó anteriormente, una estrategia alternativa para modificar el contenido lipídico celular es la utilización de mutantes de las rutas de síntesis de estos lípidos, de manera que, dependiendo del gen mutado, se producirá la acumulación de unos determinados intermediarios o compuestos, así como la disminución o desaparición de otros. En el cuarto capítulo de esta tesis utilizamos una serie de cepas mutantes de genes del metabolismo de los fosfolípidos de la cepa de laboratorio *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Debido a la importancia de los fosfolípidos en el mantenimiento de una fluidez óptima de membrana, observada en resultados obtenidos en los capítulos anteriores, quisimos comprobar qué genes pueden ser claves en la adaptación a la baja temperatura. Para esto se analizó qué cepas mutantes presentaban un fenotipo diferente respecto a la cepa parental a baja temperatura. La importancia del metabolismo lipídico en la adaptación a la baja temperatura es firmemente corroborada con los resultados de crecimiento de los mutantes a baja temperatura. Ninguno de estos mutantes presentaba un mejor crecimiento a baja temperatura respecto a la cepa salvaje BY4742. Sin embargo, algunos de ellos si mostraban un mejor crecimiento a la temperatura óptima para la levadura. Es cierto que algunos de estos mutantes si que presentaban una mayor producción de CO₂ en las primeras horas a baja temperatura. Este es el caso del mutante para el gen de síntesis de cardiolipina *CDRI*. La explicación de que la ausencia de

este gen mejorara la vitalidad a bajas temperaturas podría encontrarse en un bloqueo más rápido del metabolismo respiratorio en favor del fermentativo (Postma et al., 1989; Van Urk et al., 1990). Además, la mayor parte de las funciones desempeñadas por este compuesto pueden ser sustituidas por su precursor fosfatidilglicerol (PG) (Chang et al., 1998). *CRDI* se trata de un gen esencial para la viabilidad de las levaduras a 37 °C, pero no parece importante, incluso perjudicial, a 13 °C (Jiang et al., 1999). Esta producción de CO₂ es independiente del crecimiento, puesto que en el tiempo del análisis no se produce ninguna duplicación celular, y solo indica la tendencia de la célula a fermentar azúcares (vitalidad).

Entre los genes cuyos mutantes presentaban un fenotipo más afectado por la baja temperatura, tanto a nivel de crecimiento como de vitalidad, están los implicados en la síntesis de PE y PC por la ruta *de novo* (*PSD1*, *CHO2* y *OPI3*). Ya hemos visto en los anteriores capítulos que estos dos fosfolípidos son los que presentaban mayores modificaciones en la adaptación a la baja temperatura, y se vuelve a confirmar la importancia de ambos con este trabajo. En los resultados de anteriores capítulos se concluía que tanto el aumento de PE como la disminución de la ratio PC/PE mejoraban el crecimiento y/o la velocidad fermentativa a baja temperatura. Desde un punto de vista teórico, el mutante $\Delta cho2$, que acumulaba PE y disminuía la síntesis de PC (la ratio PC/PE disminuía de 2.2 en la cepa salvaje a 0.5 en este mutante), debería mejorar su crecimiento y fermentación a baja temperatura. Sin embargo, no era así. Como tampoco mejoraba el mutante $\Delta psd1$ que presentaba una ratio PC/PE superior a la cepa BY4742 (2.8). Por tanto, en base a los resultados de los capítulos anteriores, es posible que pequeños reajustes en las concentraciones de determinados fosfolípidos puedan mejorar la adaptación de la levadura a la baja temperatura. Sin embargo, grandes cambios en las concentraciones de los dos principales fosfolípidos PE y PC, como consecuencia de una ruta de síntesis mutada produce cepas con defectos muy pronunciados en su capacidad de crecer y fermentar.

Bien es cierto que estos mutantes han sido construidos en la levadura de laboratorio BY4742, que, como se ha visto en el capítulo II, es muy diferente de las levaduras industriales. Por tanto, en la actualidad, dentro de nuestro grupo, se están construyendo tanto cepas mutantes como sobre-expresantes en estos genes que presentaban un fenotipo afectado por la baja temperatura. Los sobre-expresantes pueden contribuir a pequeños reajustes en la proporción de algunos fosfolípidos frente a los grandes desequilibrios observados para algunos mutantes de esta ruta. Además de los diferentes métodos utilizados para mejorar la vitalidad y la

capacidad fermentativa de especies y cepas del género *Saccharomyces* a bajas temperaturas, como la suplementación de ácidos grasos u otros compuestos lipídicos, precultivos con medio óptimo de crecimiento (YEPD) a 13 °C como mecanismo de adaptación, selección de cepas adecuadas o híbridos; también cabe la posibilidad de mejorar muchas cepas de levadura vínicas industriales mediante manipulación genética. Este trabajo pretende conocer las modificaciones que se pueden llevar a cabo para conseguir esta mejora genética.

Para tratar de globalizar todos los datos obtenidos en los cuatro trabajos, en los cuales se han utilizado las mismas metodologías, se ha recurrido a un tratamiento estadístico mediante el software SPSS a través del cual se ha realizado un análisis de correlación de las variables estudiadas.

Tabla 1. Correlación global entre las variables más relevantes analizadas.

	IMP13 °C	T5.13 °C	UFA	SFA	PI	PC	PE	PA	SQ	LAN	EE	TG
IMP13 °C	1											
T5.13 °C	0.793**	1										
UFA	-0.583**	-0.735**	1									
SFA	0.637**	0.763**	-0.967**	1								
PI				-0.400**	1							
PC		0.448**				1						
PE		-0.461**		-0.489**	0.768**	0.431**	1					
PA	-0.425**					-0.446**	0.659**	1				
SQ								0.473**	1			
LAN	-0.639**	-0.461**			0.554**		0.654**	0.491**		1		
EE	-0.593**		0.530**	-0.596**	0.619**		0.633**			0.547**	1	
TG	-0.666**				0.454**		0.553**	0.414**	0.607**			1

No se muestran correlaciones $< \pm 0.400$

** La correlación es significativa al nivel de 0.01 (bilateral)

* La correlación es significativa al nivel de 0.05 (bilateral).

IMP 13 °C (Impedancia a 13 °C), T5. 13 °C (Tiempo necesario para la fermentación del 5% de azúcares totales del mosto), UFA (Ácidos grasos insaturados), SFA (Ácidos grasos saturados), PI (Fosfatidilinositol), PC (Fosfatidilcolina), PE (Ácido fosfatídico), SQ (Escualeno), LAN Lanosterol, EE (Ésteres de esteroides), TG (Triacilgliceroides)

Nuestro objetivo era tratar de mejorar el inicio de las fermentaciones a bajas temperaturas correlacionándolo con la composición lipídica. La membrana plasmática, constituida principalmente por fosfolípidos y esteroides se trata de uno de los primeros sensores frente al estrés térmico (Daum et al., 1998). Parece muy lógica la buena correlación observada entre la

medida de la impedancia a 13° C (tiempo que necesitan las levaduras para que la disminución de la impedancia alcance el umbral establecido mediante el método indirecto) con la T5.13 °C (tiempo en el que se ha consumido el 5% de los azúcares en la fermentación con mosto sintético a 13 °C). Esto pone de manifiesto la utilidad de la medida de la vitalidad como método de medida del inicio de la fermentación y decidir qué cultivo iniciador comenzaría antes a fermentar. También se puede ver una buena correlación negativa entre los ácidos grasos insaturados con la impedancia a 13 °C. Es decir, un mayor contenido en ácidos grasos insaturados favorecería un inicio más temprano de la fermentación a bajas temperaturas. En vinificación de vino blanco o rosado podemos encontrarnos en condiciones de hipoxia por lo que las levaduras no dispondrán del oxígeno necesario para la síntesis de ácidos grasos insaturados. De modo que el mecanismo que disponen las levaduras para compensar la rigidificación de la membrana debido a las bajas temperaturas podría no ser eficiente. Lo contrario ocurriría con los ácidos grasos saturados que presentan una correlación de signo contrario. De tal manera que un tratamiento preventivo de las células con ácidos grasos insaturados podría ser eficaz para enriquecer los fosfolípidos de la membrana con UFA y así resistir el estrés térmico por bajas temperaturas.

De fosfolípidos, la fosfatidiletanolamina podría utilizarse para hacer una suplementación de las levaduras en un precultivo ya que presentaba una correlación significativa y favorable con las dos variables utilizadas para el análisis de la duración de la fase de latencia. A partir de los resultados obtenidos en este análisis de correlación sería el siguiente compuesto lipídico a probar, ya que además también presenta una buena relación positiva con los ácidos grasos insaturados, de los que se han podido comprobar los efectos beneficiosos de un ácido graso monoinsaturado: el ácido palmitoleico. En otros estudios ya fue descrito que los fosfolípidos como fosfatidilinositol (PI) o fosfatidiletanolamina (PE) tenían funciones importantes durante la adaptación de *S. cerevisiae* a condiciones ambientales desfavorables. Los cambios en los fosfolípidos afectaban a la estabilidad de la bicapa y a la fluidez de la membrana (Mannazzu et al., 2008; Xia & Yuan, 2009).

En cambio la fosfatidilcolina mantiene una correlación de signo contrario a la fosfatidiletanolamina, por lo que no sería utilizada para suplementar el medio de precultivo para intentar reducir la duración de la fase de latencia. Dowd et al., (2001) y Kiewietdejonge et al. (2006) ya habían mostrado resultados en los que habían relacionado el reciclaje de PC y la producción de glicerofosfocolina (GPC) como respuesta al estrés hipersalino y térmico

causado por calor en las levaduras. La síntesis de PC estaría ligada a un aumento de su reciclaje para prevenir el exceso de este fosfolípido y la producción de GPC como osmoprotector (Kiewietdejonge et al 2006). Sin embargo, suplementaciones de colina aumentaban la síntesis de GPC y a la vez mejoraban el crecimiento de las levaduras en estas condiciones de estrés. Así que la colina podría adicionarse en el precultivo para intentar mejorar el inicio de las fermentaciones a bajas temperaturas.

Por otra parte, tanto los ésteres de esteroides como el lanosterol podrían también utilizarse para realizar adiciones ya que ambos presentan buena correlación con la impedancia y la T5 a 13°C y también con los UFA. Los ésteres de esteroides se tratan de lípidos de reserva que la levadura podrá hidrolizar en el caso que necesite esteroides libres.

El escualeno presenta una correlación contraria a la adecuada para favorecer un rápido inicio de las fermentaciones a bajas temperaturas ya que se ha observado que las levaduras que presentan acumulación de escualeno en las membranas exhiben una sensibilidad alterada a pH bajos y a altas concentraciones salinas. El escualeno puede tratarse de un ejemplo no convencional de lípidos neutros de reserva en las membranas (Spanova et al., 2009).

Bibliografía

1. Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloekera apiculata* FEMS Microbiol Lett 124: 17-22
2. Arora A, Raghuraman H, Chattopadhyay A (2004). Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. Biochem Biophys Res Commun 318:920–926
3. Avery SV, Howlett NG, Radice S (1996). Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. Appl Environ Microbiol 62:3960-3966
4. Belloch C, Orlic S, Barrio E, Querol A (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Int J Food Microbiol 122:188–195
5. Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamón JM, Mas A François J, Rozès N (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. FEMS Yeast Res 6:1167-83
6. Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón JM, Rozes N, Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. Syst Appl Microbiol 2:287-293
7. Bisson LF (1999) Stuck and sluggish fermentations. Am J Enol Vitic 501:07-119

8. Boyaval P, Schuck P (1994) Le séchage des microorganismes par atomisation. Industries Alimentaires Agricoles 111:807-818
9. Carratù L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B (1996) Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. Proc Natl. Acad Sci USA 93:3870-3875
10. Castellari L, Pacchioli G, Zambonelli C, Tini V, Grazia L (1992). Isolation and initial characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. Ital J Food Sci 3:179-186
11. Chang SC, Heacock PN, Mileykovskaya E, Voelker DR, Dowhan W (1998) Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 273:14933-41
12. Chirala SS (1992) Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 21:10232-6
13. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:1471-1510
14. Del Carratore R, Della CC, Simili M, Taccini E, Scavuzzo M, Sbrana S (2002) Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. Mutat Res 513:83-191
15. Dickson RC, Nagiec EE, Skrzypek M, Tillman P, Wells G.B, Lester RL (1997) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. J Biol Chem 272:30196-200
16. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K (2009) Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 85:253-63
17. Dowd SR, Bier ME, Patton-Vogt JL (2001) Turnover of phosphatidylcholine in *Saccharomyces cerevisiae*. The role of the CDP-choline pathway. J Biol Chem 276:3756-3763
18. Fleet GH & Heard GM (1993) Yeast growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
19. Frezier V. y Dubourdiou D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. Am. J. Enol. Vitic. 43, 375-380
20. Gaspar ML, Jesch SA, Viswanatha R, Antosh AL, Brown WJ, Kohlwein SD, Henry SA (2008). A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. J Biol Chem 283:25735-51
21. Giudici P, Caggia C, Pulvirenti A, Zambonelli C, Rainieri (1998) Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. S Lett Appl Microbiol 27:31-4
22. Giudici P & Zambonelli C (1992) Criteri di selezioni dei lieviti per enologia. Vignevini 9:29-34
23. González SS, Barrio E, Gafner J, Querol A (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. FEMS Yeast Res 6:1221-1234
24. Herker EH, Jungwirth KA, Lehmann C, Maldener C, Frohlich KU, Wising S, Howlett NG, Avery SV (1997) Relationship between cadmium sensitivity and degree of plasma membrane fatty acid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 48:539-545
25. Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L, Hannun Y (1997) Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 272:32566-72
26. Kiewietdejonge A, Pitts M, Cabuhat L, Sherman C, Kladwang W, Miramontes G, Floresvillar J, Chan J, Ramirez RM (2006). Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 6:205-17

27. Kunkee RE & Amerine M (1970) Yeasts in winemaking. In: The Yeasts, vol 3: Yeast Technology. (Eds.A.H. Rose y J.S. Harrison) pp. 5-72. Academic Press, London.
28. Lafon-Lafourcade S (1983) Wine and brandy. In: Biotechnology, vol 5: Food and Feed Production with Microorganisms. (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim.
29. Landolfo S, Zara G, Zara S, Budroni M, Ciani M, Mannazzu I (2010) Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Food Microbiol 141:229-35
30. Laroche C, Gervais P (2003) Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. Appl Environ Microbiol 69:3015-3019
31. Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kolhwein S, Dawes I, Fröhlich KU, Breitenbach M (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. Mol Microbiol 39:1166-73
32. Llauradó J, Rozès N, Bobet R, Mas A & Constantí M (2002) Low temperature alcoholic fermentation in high sugar concentration grape musts. J Food Sci 67:268–273
33. Longo E, Velázquez JB, Sieiro C, Cansado J, Calo P, Villa TG (1992) Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). World J Microbiol Biotechnol 8:539-541
34. Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, Lodi T, Marzona M, Bardi L (2008) Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. Int J Food Microbiol 121:84-91
35. Massoutier C, Alexandre H, Feulliat M & Charpentier C (1998) Isolation and characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. Vitis 37:55–59
36. Müllner H, Daum G (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast. Acta Biochim Pol 51:323-47
37. Novo M, Beltrán G, Torija MJ, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation rehydration and low temperature. Int J Food Microbiol 9:51-55
38. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP (1989) Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microb 55: 468–477.
39. Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16:675–729
40. Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Ribéreau-Gayon P & Sudraud P (1975) Sciences et Techniques du Vin, vol. 2. Dunod, Paris.
41. Ribéreau-Gayon P (1985) New developments in wine microbiology. Am J Enol Vitic 36:1-10
42. Sharma SC (2006) Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res 6:1047-51
43. Shobayashi M, Mitsueda S, Ago M, Fujii T, Iwashita K, Iefuji H (2005) Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotech Biochem 69:2381–2388
44. Soubeyrand V, Luparia V, Willians P, Doco T, Vernhet A, Ortiz-Julien A (2005) Formation of micells containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity. J Agric Food Chem 53:8025-8032
45. Spanova M, Czabany T, Zellnig G, Leitner E, Hapala I, Daum G (2010) Effect of Lipid Particle biogenesis on the subcellular distribution of squalene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* J Biol Chem 285:6127-6133

46. Suomalainen H & Lehtonen M (1979) The production of aroma compounds by yeast. *J Ins Brew* 85: 149-156
47. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces species* on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 85:127-136
48. Van Urk H, Voll WS, Scheffers WA, van Dijken JP (1990) Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtreepositive and Crabtree-negative yeasts. *Appl Environ Microb* 56:281–287
49. Versavaud A, Dulau L, Hallet JN (1993) Étude écologique de la microflore levurienne spontanée de vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité intraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Fr Oenologie* 142:20-28
50. Vezinhet F & Pineau J (1990) La levurage. *Progrés Agricole et Viticole* 107:219-221
51. Vezinhet F, Hallet J, Valade M, Poulard A (1992) Ecological survey of wine yeast strains by methods of identification. *Am J Enol Vitic* 43:83-86
52. Xia JM & Yuan YJ (2009) Comparative lipidomics of four strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals different responses to furfural, phenol, and acetic acid. *J Agric Food Chem* 57:99-108
53. Zambonelli C (1988) *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*. Edagricole, Bologna.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

CONCLUSIONES GENERALES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

- El almacenamiento de la levadura seca activa y su recuperación en un medio óptimo de crecimiento puede ser un buen modelo para el análisis de los cambios que un proceso comercial (secado, rehidratación o almacenamiento) puede producir sobre la vitalidad y viabilidad de las levaduras.
- Un mecanismo para recuperar la viabilidad, vitalidad y capacidad fermentativa de levaduras de lotes de campañas anteriores almacenados en condiciones inadecuadas es el cultivo en medio de crecimiento óptimo.
- Una composición lipídica de membrana adecuada, tanto en ácidos grasos insaturados (UFA) como en fosfolípidos (PL) y esteroides (ST), es fundamental para asegurar una alta viabilidad de las levaduras.
- Hacer coincidir la temperatura de crecimiento de un precultivo en medio de crecimiento óptimo con la temperatura de fermentación mejora notablemente el inicio del proceso y su actividad fermentativa, excepto en aquellas cepas que ya presenten una buena cinética fermentativa sin necesidad de una aclimatación previa a esta temperatura.
- En nuestro trabajo la cepa híbrida (*S. cerevisiae* x *S. bayanus*) se mostró como la cepa mejor adaptada a fermentar a bajas temperaturas, y, por tanto, podría ser útil como cultivo iniciador de fermentaciones a bajas temperaturas sin necesidad de realizar preadaptaciones.
- Un precultivo en medio de cultivo óptimo a bajas temperaturas puede ayudar a la adaptación de cepas vínicas a fermentar un mosto a bajas temperaturas. Esta preadaptación puede venir marcada, en cierta manera, por la modificación de la composición lipídica.
- Algunos de los mecanismos comunes que han utilizado las levaduras para adaptarse a las condiciones de estrés por bajas temperaturas es el incremento del porcentaje en ácidos grasos de cadena media (MCFA), descenso de ácido fosfatídico (PA), aumento

Conclusiones generales

de triacilgliceroles (TAG), y una tendencia a la disminución de la ratio fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (PC/PE).

- Además de estos cambios más o menos generales, hemos observado otros cambios cepa-específicos, tales como el descenso de fosfatidilserina (PS) en la cepa híbrida y el incremento de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC) en *S. uvarum*.
- La adición de ácidos grasos exógenos y ergosterol produce una disminución del contenido total de los mismos y puede modificar el resto de la composición lipídica de las membranas.
- La composición lipídica de las levaduras incubadas en presencia de diferentes lípidos se ve modificada tanto por incorporación como por regulación de la biosíntesis.
- Un alto contenido en ácido palmitoleico, una menor longitud de cadena de los ácidos grasos, un alto contenido en esteroides, una alta ratio de esteroides/PL y de UFA/SFA podrían ser factores importantes a tener en cuenta en la mejora de la capacidad fermentativa a bajas temperaturas
- La adición de otros compuestos lipídicos que presentan una correlación significativa tanto con la vitalidad como con el tiempo de consumo del 5% de los azúcares podrían ser buenos candidatos para mejorar la capacidad fermentativa de las levaduras a bajas temperaturas
- Mutantes por delección de genes de la síntesis de PL que producen pequeños reajustes en las concentraciones de determinados fosfolípidos pueden mejorar la adaptación de la levadura a la baja temperatura.
- Grandes cambios en las concentraciones de los dos principales fosfolípidos PE y PC, como consecuencia de una ruta de síntesis mutada, produce cepas con defectos muy pronunciados en su capacidad de crecer y fermentar.

- El hecho de que la ausencia del gen *CRD1* mejorara la vitalidad a bajas temperaturas podría encontrarse en un bloqueo más rápido del metabolismo respiratorio en favor del fermentativo..
- La construcción tanto de cepas mutantes por deleción como sobre-expresantes en los genes que presentan un fenotipo afectado por la baja temperatura puede ser útil para la mejora de la cinética fermentativa a bajas temperaturas y, en un futuro, para su aplicación industrial
- La detección y cuantificación de los metabolitos intermediarios de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y de su reciclaje nos ayudarían a mejorar la interpretación de los mecanismos de regulación metabólica de los fosfolípidos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

ANEXOS

Material y métodos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO GLOBAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE SACCHAROMYCES SPP. EN FERMENTACIONES A BAJAS TEMPERATURAS

Maria Antonia Redón Miralles

ISBN:9788469432365/ T. 1045-2011

1. MEDIOS DE CULTIVO

1.1. Medio YEPD.....	194
1.2. Medio mínimo.....	194
1.3. Mosto sintético.....	194
1.4. Medio de rehidratación de las levaduras secas activas (LSA)	196

2. SEGUIMIENTO DE LAS FERMENTACIONES Y DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

2.1. Recuento de células totales	197
2.2. Determinación de la viabilidad	199
2.2.1. Recuentos de viables por siembra en placa	199
2.2.2. Por recuento en el microscopio.....	199
2.3. Determinación de la producción de biomasa.....	199
2.4. Determinación de la vitalidad: Bac-trac	200
2.5. Fluidez de membrana: anisotropía.....	200

3. ANALISIS DE LÍPIDOS

3.1. Peso seco.....	202
3.2. Rotura de las células	202
3.3. Extracción de la fase orgánica	202
3.4. Limpieza con KCl	204
3.5. Cuantificación de fosfolípidos mediante el ensayo del fósforo.....	204
3.7. Análisis de lípidos neutros y fosfolípidos por cromatografía en capa fina (TLC)	206
3.8. Análisis de ácidos grasos por Cromatografía de Gases (CG)	209

4. BIBLIOGRAFÍA

211

1. MEDIOS DE CULTIVO

1.1. Medio YEPD

Glucosa.....	20 g
Peptona.....	20 g
Extracto de levadura.....	10 g
*Agar.....	20 g
H ₂ O mq.....	1000 mL

Se homogeniza toda la mezcla, se autoclava a 120 °C durante 15 minutos.

* En el caso de preparar YEPD sólido se añaden 20g/L de agar y se vierte el medio en placas de Petri a una temperatura de 50 °C.

1.2. Medio mínimo

Synthetic complete drop out (SC drop out) Medium

Difco Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids).....	4 g
Glucosa.....	12 g
Complementación de auxotrofías (histidina 2 g, leucina 2 g, lisina 2 g, uracilo 1.2 g.)	5 g
H ₂ O destilada.....	600 mL

Para preparar el medio sólido se añaden todos los productos, se mezclan y se ajusta el pH a 5.6 con NaOH 10N, se añade el agar (10 g) y se autoclava a 121 °C durante 15 minutos.

1.3. Mosto sintético

El mosto sintético reproduce la composición de un mosto natural estándar. Este mosto resulta muy útil para realizar microfermentaciones en laboratorio de una manera reproducible. La composición del mismo se basa en el propuesto por (Bely et al., 1990) con algunas modificaciones. Los diferentes compuestos para un volumen final de 1 litro se detallan a continuación.

Azúcares:

Glucosa.....	100 g
Fructosa.....	100 g

Ácidos orgánicos:

Málico.....	5 g
Cítrico.....	0.5 g
Tartárico.....	3 g

Minerales:

KH ₂ PO ₄	0.75 g
K ₂ SO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.25 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0.155 g
NaCl.....	0.2 g
NH ₄ Cl.....	0.46 g

Se pesan los diferentes productos y se afora a 1 litro con agua destilada. A continuación se autoclava a 121 °C durante 15 minutos. Una vez autoclavado se adicionan soluciones madre preparadas previamente de :

- aminoácidos (13.09 mL)
- oligoelementos (1 mL)
- vitaminas (20 mL)

Estas soluciones termolábiles se adicionan a la parte esterilizada. Se ajusta el pH a 3.3 con perlas de NaOH y se filtra todo el volumen del mosto sintético preparado..

Solución madre de aminoácidos (1 L)

Tirosina (Tyr).....	1.5 g
Triptófano (Trp).....	13.4 g
Isoleucina (Ile).....	2.5 g
Ácido Aspártico (Asp).....	3.4 g
Ácido Glutámico (Glu).....	9.2 g
Arginina (Arg).....	28.3 g
Leucina (Leu).....	3.7 g
Treonina (Thr).....	5.8 g
Glicina (Gly).....	1.4 g
Glutamina (Gln).....	38.4 g
Alanina (Ala).....	11.2 g
Valina (Val).....	3.4 g
Metionina (Met).....	2.4 g
Fenilalanina (Phe).....	2.9 g
Serina (Ser).....	6 g
Histidina (His).....	2.6 g
Lisina (Lys).....	1.3 g

Anexos: material y métodos

Cisteína (Cys)..... 1.5 g
Prolina (Pro).....46.1 g
Esta solución se guarda en alícuotas de 50 mL a -20 °C....

Solución madre de vitaminas (1 L)

Myo-inositol 2 g
Pantotenato de calcio..... 15 g
Hidrocloruro de tiamina0.025 g
Ácido nicotínico 0.2 g
Piridoxina 0.025 g
*Biotina 3 mL
*(solución madre biotina 100 mg/L)

La solución de vitaminas se conserva a -20 °C.

Solución madre de oligoelementos (1 L)

MnSO₄, H₂O..... 4 g
Zn SO₄, 7H₂O..... 4 g
CuSO₄, 5H₂O..... 1 g
KI..... 1 g
CoCl₂, 6H₂O 0.4 g
H₃BO₃..... 1 g
(NH₄)₆Mo₇O₂₄..... 1 g

Esta solución de almacena a 4 °C.

1.4. Medio de rehidratación de las levaduras secas activas (LSA)

Las levaduras secas activas se rehidratan con H₂O destilada estéril tibia y se mantienen durante 30 minutos a 37 °C en un baño. La suspensión se agita en un vórtex para resuspenderla en el agua. Las levaduras se rehidratan en 10 volúmenes de agua (g/mL). Un gramo de LSA contiene aproximadamente 10¹⁰ células. Una vez rehidratadas las levaduras se inoculan en los mostos a 2 x 10⁶ células/mL.

2. SEGUIMIENTO DE LAS FERMENTACIONES Y DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

- Precultivo en YEPD a 25-28 °C con una agitación de 150-200 rpm. durante una noche (aprox. 12 h).
- Inóculo para los mini-fermentadores de 2×10^6 células/mL y al mismo tiempo siembra del inóculo en placas para conocer la viabilidad del cultivo.
- Fermentaciones: botellas de 250 mL) conteniendo 200 mL de mosto sintético con tapones de algodón, incubados a 13 °C o 25 °C con agitación a 125 rpm.
- En todo el trabajo se ha utilizado la levadura comercial QA23 (Lallemand Inc., Canada) como cepa de referencia. Consideramos la fermentación como finalizada cuando la concentración de azúcares reductores sea inferior a 2 g /L.
- El seguimiento del **consumo de azúcares** se realiza por pesada de los mini-fermentadores o mediante el uso del densímetro automático.

Se evalúa la pérdida de peso de los fermentadores debido al consumo de azúcares y su transformación en etanol. Desde el primer día que se inoculan las microfermentaciones se pesan los fermentadores y después se toma medida del peso todos los días para seguir el proceso de la fermentación. Para transformar la pérdida de peso en consumo de azúcares se aplica la siguiente fórmula:

La disminución de un 1% volumen equivale aproximadamente a 17 gramos glucosa.

$$[\text{glucosa} + \text{fructosa}] = (\Delta \text{ peso} \times 100)/46 \times (1000/\text{volumen fermentador})$$

$$\Delta \text{ peso} = \text{peso}(\text{día } (n + 1)) - \text{peso}(\text{día}(n))$$

- Una vez las fermentaciones presentan una densidad entre 998-995 g/L, se lleva a cabo un análisis de los azúcares residuales, por medio del **Kit enzimático Glucosa/Fructosa** (Boeringher Mannheim).

-

2.1. Recuento de células totales

Se toman aproximadamente unos 10 μ L de la muestra y se depositan bajo un cubreobjetos en una cámara de Neubauer. Se cuentan al microscopio con el objetivo de 40x las células que aparecen en las dos diagonales de los cuadros pequeños justo en el centro del dibujo (Fig. 1) (20 cuadros en cada diagonal y se hace la media). Como sabemos el volumen comprendido en cada uno de los cuadros contados, podemos calcular el número de células por volumen (normalmente expresado en células/mL).

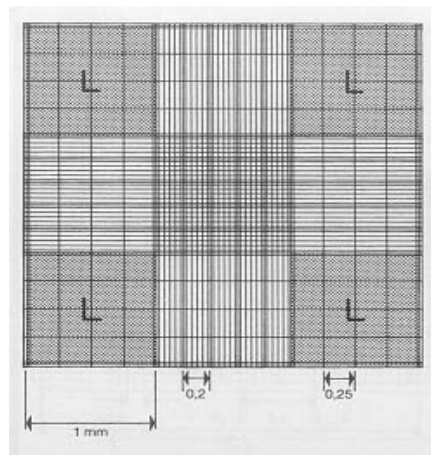


Fig. 1 Cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento de células adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la **figura 1**. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.

Cálculo del número de microorganismos:

Cada cuadrado pequeño de la cámara posee un área de $1/400 \text{ mm}^2$ x 0.1 mm de altura ente la superficie de la cámara y el cubre objetos $=0.00025 = 2.5^{E-04} \text{ mm}^3 = 1/4000 \text{ m}^3$. Luego 1 mm^3 contiene 4000 veces el número de microorganismos contados.

Número de microorganismos por $\text{mm}^3 = 4000 \text{ N D/F}$

Como habitualmente los recuentos se expresan como células por mL (cm^3), la fórmula anterior se modifica a la siguiente: células/mL = $4 \times 10^6 \text{ N D/F}$

N = número total de microorganismos contados

D = inverso de la dilución realizada a partir del cultivo original

F = número de cuadros contados en el centro de la cámara

2.2. Determinación de la viabilidad

2.2.1. Recuentos de viables por siembra en placa:

Para el recuento de células totales (ufc/mL) se disponía de un sembrador automático en espiral (AED Laboratoire, Combourg, France). Este aparato deposita de forma continua un volumen decreciente de líquido en la superficie de la placa de agar que gira mientras el dispensador se mueve desde el centro hacia la periferia. Este método elimina o disminuye el número de diluciones seriadas, además realiza la siembra por duplicado y ahorra material. Se incuban las placas en estufa a 28 °C durante 48 horas y se procede al recuento. Las unidades formadoras de colonias (CFU) se contaron mediante la versión 1.27 del software ProtoCOL SR/HR (Synbiosis, Cambridge, UK).

2.2.2. Por recuento en el microscopio:

Azul de metileno: las células se tratan con azul de metileno (0.01% (w/v) azul metileno, 2% (w/v) PBS: NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7.4) y se observan al microscopio. Las células vivas presentan activo el enzima que reduce el azul de metileno en su derivado incoloro. Por tanto, únicamente las células muertas se tiñen de azul porque el colorante permanece inalterado. La viabilidad se calcula a partir del cociente entre el número de células viables y el número total de células.

El KIT LIVE/DEAD Bac-Light (Molecular Probes, USA) se basa en la utilización de dos fluorocromos, el SYTO 9 y el yoduro de propicio (PI). Mientras el SYTO 9 es permeable a la membrana plasmática, el PI solo penetra en aquellas células de membrana comprometida y, por tanto, supuestamente no viables. Cuando la preparación se observa bajo un microscopio de fluorescencia, con un espectro de excitación/emisión de 488-540/617 nm (Haugland, 1996), las células vivas se observan de un color verde (aportado por el SYTO 9) y las muertas de color rojo o anaranjado (mezcla de los dos fluorocromos) (Zhang & Fang, 2004).

La muestra se prepara mezclando 0.5 µL de células (1×10^7 células/mL) con 1.5 µL de SYTO 9 y 0.7 µL de PI. Se homogeniza y la población total se cuenta en campo claro. Después se observa en el microscopio de fluorescencia.

2.3. Determinación de la producción de biomasa

La densidad óptica a 600 nm es directamente proporcional a la producción de biomasa de la levadura. Se determina la DO 600 nm al espectrofotómetro tomando como blanco el mosto o medio inicial sin inocular.

2.4. Determinación de la vitalidad: Bac-trac

La vitalidad se determina por medida indirecta del cambio de impedancia causado por la reacción entre el CO₂ producido por las levaduras con el KOH presente en las celdas del aparato Bac-Trac 4300, SY-LAB. Se puede expresar como las horas necesarias para producir una determinada disminución de la impedancia. En nuestro caso, de manera arbitraria, utilizamos como umbral de disminución de la impedancia el 10% de la impedancia inicial (M10%).

Para poder comparar la vitalidad entre cepas generalmente hemos normalizado con respecto a la cepa control, a la que se le daba el valor 1. Por tanto, valores inferiores a 1 suponen una mayor velocidad de producción de CO₂, es decir, mayor vitalidad y valores superiores a 1 una menor velocidad. De manera que las cepas con valores inferiores a 1 serían las que empezarían la fermentación primero presentando una fase de latencia más corta.

El protocolo que se sigue en el laboratorio es el siguiente:

- Se realizan cultivos de las diferentes especies o cepas hasta llegar a la fase estacionaria. En ese estadio, se inoculan 1×10^7 cel/mL.
- Se inoculan viales de cristal de 5 mL estériles con el medio de cultivo (generalmente en YEPD), los cuales se introducen dentro de unas celdas de plástico más grandes que es donde se añade el KOH al 0.2% (w/v).
- El KOH debe prepararse en último lugar cuando ya se tenga todo el resto del proceso listo.
- Las celdas de plástico grandes se introducen dentro de los detectores de impedancia que posee el aparato comercial Bac-trac. Se pueden realizar medidas a dos temperaturas diferentes a la vez, acoplado un sistema de refrigeración.
- Es aconsejable añadir un control negativo con KOH y medio de cultivo sin inocular y otro sólo con KOH.

2.5. Anisotropía (Ansari et al., 2003)

La anisotropía de fluorescencia se ha utilizado ampliamente para la obtención de información sobre la forma, el tamaño, la rigidez o la flexibilidad de moléculas biológicas. La técnica constituye asimismo una herramienta de gran utilidad para el estudio de interacciones moleculares proteína - proteína, proteína – ligando o proteína – ácidos nucleicos. Las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Uno de los parámetros más importantes relacionados con la estructura y funcionalidad celular es su fluidez de membrana. La determinación de la misma se realizó mediante anisotropía de fluorescencia utilizando como sonda fluorescente el

DPH (1,6-difenil-1, 3, 5-hexatrieno (DPH, Sigma). La anisotropía la utilizamos como medida de determinación de la fluidez de membrana puesto que la relación entre el valor de polarización de la sonda y la fluidez de membrana es inversa.

El protocolo utilizado aparece descrito a continuación:

- Las células se centrifugan, se lavan dos veces con tampón PBS y se resuspenden en 10 mL de PBS para obtener una población de 1×10^7 cél/mL
- Las células se incuban después de añadir 50 μ L de una solución stock de DPH (5×10^4 mol /L diluido en tetrahidrofurano, Sigma) a 25 °C sin luz.
- Después de 45 minutos de incubación en agitación se realiza la medida en un espectrofluorímetro (Varian). La temperatura de medida puede ser a 13 °C porque se refrigera con la ayuda de un baño termostatzado a temperatura controlada. Las longitudes de ondas de excitación y emisión son 355 y 425 nm, respectivamente.

El grado de polarización de la fluorescencia (p) se calcula, de acuerdo a Ansari et al., (1993), al aplicar la siguiente ecuación: $p = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}$ con $G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$, donde I es la intensidad de fluorescencia corregida y "v" y "h" indican la orientación (vertical o horizontal) de excitación de los polarizadores.

Para cada medida, las intensidades de fluorescencia se corrigen restando la intensidad de luz medida con células no marcadas en tampón PBS y con DPH en tampón PBS sin células.

3. ANÁLISIS DE LÍPIDOS

3.1. Peso seco

Previamente a la extracción se procede a calcular el peso seco de las muestras de levaduras que se van a analizar:

1. Mantener en la estufa a 100 °C los eppendorfs durante 2 días.
2. Sacarlos e introducirlos a un desecador hasta que estén a temperatura ambiente.
3. Se hace la pesada del eppendorf (P0).
4. La muestra a analizar se introduce en estos eppendorfs previamente tarados y se centrifuga, se elimina el sobrenadante, se lava con agua destilada y se vuelve a centrifugar.
5. Los eppendorfs con sus correspondientes pellets se mantienen en la estufa durante dos días.
6. Se sacan y se conservan en el desecador hasta que estén a temperatura ambiente y entonces se procede a la pesada (P1).

PESO SECO = P1-P0.

3.2. Rotura de las células

A cada uno de los eppendorfs se les añade:

- 20µL de EDTA a 4 °C.
- 100µl de Metanol a 4° C.
- perlas de vidrio hasta el menisco que forma el líquido.

Se agita en el vórtex y se homogeniza 5 veces en el MINIBEAD-BEATER durante un periodo de tiempo de 1 minuto.

3.3. Extracción de la fase orgánica:

Extracción 1

Tras realizar la rotura de células a cada uno de los eppendorfs con sus respectivos pellets se les añade:

- 200µL metanol.

Mezclar con el vórtex y adicionar:

- 600µl cloroformo.

Se mantiene en agitación durante **una hora** en un agitador orbital (ORBIT M60).

Se centrifuga a 5000 rpm durante 1 minuto.

Se lleva a cabo la recuperación de la fase orgánica y se deposita en un tubo de vidrio de 15 mL.

Extracción 2

A los diferentes eppendorfs con sus correspondientes células se les añade:

- 300µL metanol.

Se mezcla con el vórtex y se agregan:

- 600µl cloroformo.

Se mantiene en agitación durante **una hora** en un agitador orbital (ORBIT M60).

Se centrifuga a 5000 rpm durante 1 minuto

Recuperación de la fase orgánica que se deposita en el mismo tubo de vidrio.

Extracción 3 y 4

Se repiten dos extracciones más con las respectivas recuperaciones de las fases orgánicas.

Overnight C/M (1/2)

En esta extracción invertimos la proporción de cloroformo/metanol(C/M) adicionada de (2/1) a (1/2):

- 600µl metanol

Se mezcla con el vórtex y se agregan:

- 300µl cloroformo.

Se mantiene en agitación durante **toda la noche** en un agitador orbital (ORBIT M60).

Se centrifuga a 5000 rpm durante 1 minuto .

Recuperación de la fase orgánica que se deposita en el mismo tubo de vidrio.

Última extracción

Esta última extracción tiene como objetivo asegurarnos que se ha extraído la mayor parte de la fracción lipídica de las células, observando en el análisis lipídico de estas muestras una concentración muy baja de los tipos lipídicos analizados.

Se añade a los pellets:

- 300µl metanol.

Se mezcla con el vórtex y se agregan:

- 600µl cloroformo.

Se mantiene en agitación durante **una hora** en un agitador orbital (ORBIT M60).

Se centrifuga a 5000 rpm durant 1 minuto .

Recuperación de la fase orgánica en **un tubo de vidrio nuevo**.

3.4. Limpieza con KCl (0.88%, w/v)

El volumen adecuado será el correspondiente al 25% del volumen que se obtiene en la extracción. En este caso tenemos 5 extracciones por 900µl cada una= 4500µl, y el 25% es 1125µl de KCl. Para la última extracción tenemos 900µl y el 25% son 225µl ya que la fase orgánica de ésta la recuperamos en un tubo de vidrio diferente que las extracciones previas correspondientes a la misma muestra.

- Se agita en el vórtex y se mantiene a la temperatura de 4 °C durante 10 minutos.
- Se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Recuperación de la fase orgánica (inferior) en otro **tubo de vidrio**.
- Limpiar con KCl (0.88%) (25% del volumen recuperado)
- Agitar en el vórtex, mantener 10 minutos en la nevera y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Tomar la fase orgánica (inferior), con cuidado para evitar arrastrar agua de la fase superior, y transferirla en **un nuevo tubo de vidrio** que previamente se pesa.
- Evaporación del CHCl₃/MeOH por N₂ en el evaporador de extracción en fase sólida (SUPELCO)
- Volver a pesar el tubo.
- Resuspendrer con 50µl de cloroformo y 25 µl de metanol y se deposita en un vial ámbar que contiene un inserto de vidrio transparente..
- Congelar a -80 °C.

3.5. Cuantificación de fosfolípidos mediante el ensayo del fósforo (Rouser et al., 1970)

Se aconseja realizar esta determiación antes de la separación por cromatografía para prevenir cualquier pérdida de moléculas de fosfolípidos.

Los fosfolípidos presentes en la extracción de lípidos se estiman por la determinación de fósforo mediante una digestión ácida. El fosfato inorgánico liberado reacciona con el amonio molibdato y el complejo produce un color azul intenso.

Este ensayo es válido para cantidades de fósforo mayores de 1-2 µg (25-50 µg de fosfolípidos)

Materiales:

Aparatos:

- Bloque de calor seco que alcance una temperatura de 180 °C.
- Tubos de vidrio limpiados previamente con agua acidificada (ácido nítrico 1%) y secados en la estufa a 100 °C.

Soluciones:

- Ácido perclórico al 70%.
- Amonio molibdato (2.5 g en 100 mL de H₂O)
- Ácido ascórbico (10 g en 100 mL de H₂O). Es preferible no guardarla más de una semana a 4 °C.
- Solución PATRÓN de KH₂PO₄:

Se prepara una solución stock de 100 µg P/mL que corresponden a 219.5 mg de KH₂PO₄ en 500 mL de agua.

Se hace una dilución 1/10 de ésta y así tenemos 10 µg P/mL, obtendremos siete patrones de diferentes concentraciones tomando diferente volumen:

50 µL-----	0.5 µg
100 µL-----	1 µg
200 µL-----	2 µg
300 µL-----	3 µg
400 µL-----	4 µg
500 µL-----	5 µg
600 µL-----	6 µg

Método:

Muestras:

- Las muestras de lípidos (10 µL) son transferidas a los tubos de vidrio evaporando totalmente los solventes con nitrógeno gas.
- Se añaden 650 µL de ácido perclórico y se depositan los tubos en el bloque seco durante 30 minutos o hasta que el color amarillento haya desaparecido.
- Cuando estén fríos se añaden a los tubos 3.3 mL de agua, 500 µL de la solución de molibdato y 500 µL de la solución de ácido ascórbico. Se agita en el vórtex después de cada adición.
- Mantener los tubos en un baño a 100 °C durante 5 minutos.

- Se lee la absorbancia de las muestras a temperatura ambiente a 800nm.

Patrones:

Los patrones no necesitan la digestión a 180 °C para liberar el P, entonces se procede de la siguiente manera:

Se añaden las mismas soluciones que antes :

- 3.3 mL de agua destilada
- 650 µL de ácido perclórico.
- 500 µL de la solución de molibdato
- 500µL de ácido ascórbico.

Se agita en el vórtex después de cada adición.

- Mantener los tubos en un baño a 100 °C durante 5 minutos.
- Se lee la absorbancia de las muestras a temperatura ambiente a **800 nm**.

A partir de los patrones de los cuales se conoce la concentración y se ha determinado la densidad óptica se hace una recta con su correspondiente ecuación. Se interpolan los resultados de las densidades ópticas de las muestras y se obtienen las concentraciones de P de cada muestra. El resultado directo después de interpolar son µg de P al tubo, multiplicando por el volumen total del extracto (75µL) y dividiendo por el volumen de la muestra (10µL) obtenemos la cantidad de P en el extracto. Para obtener fosfolípidos del extracto se multiplica por un factor de 25 y a continuación se divide por el peso seco, las unidades finales serán µg fosfolípidos/mg de peso seco. Por último, a partir de la diferencia de peso después de haber evaporado los lípidos con nitrógeno sabremos el peso seco de los lípidos totales de la extracción, se puede llegar a saber la proporción de fosfolípidos respecto al total de lípidos.

3.6. Anàlisis de lípidos neutros y fosfolípidos por cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizan dos tipos diferentes de cromatografía variando el grosor de las placas, los solventes de elución, el número de migraciones, según se trate de separación de lípidos neutros o fosfolípidos.

Material:

- Placas de sílice (250 µm, TLC) o (200 µm, HPTLC).
- Aplicador semiautomático de las muestras lipídicas (Camag Linomat 5).

- Cubeta de migración semiautomática (Camag).
- Revelador: Sulfato de cobre (10% (w/v) CuSO_4 en H_3PO_4 al 8% (v/v)).

Lípidos neutros:

Se utilizan tres solventes diferentes:

	Solvente A	Solvente B	Solvente C
- Hexano	5 mL	8 mL	10 mL
- Éter metil tert-butílico	5mL	2 mL	
- Amoniaco	0.2mL	0.2 mL	

Se programan tres métodos diferentes en la cubeta CAMAG para poder separar de una forma reproducible y bien definida los diferentes tipos de lípidos neutros. El primer método permite una migración hasta una distancia de 35 mm, el segundo de 60 mm y el tercero de 85 mm. En primer lugar se deposita la placa verticalmente con la ayuda de un soporte imantado, se cierra la cámara y se procede al desarrollo del primer método, se introduce el solvente adecuado para cada método y después del secado automático se limpia la cubeta con agua destilada y se programa para el siguiente método.

Fosfolípidos:

- Cloroformo	13 mL
- Acetona	3 mL
- Metanol	2 mL
- Ácido acético glacial	2 mL
- H_2O destilada	1 mL

Se programa un método. Se deja migrar hasta el final de la placa (85 mm) y se desarrolla la migración en la cubeta CAMAG al igual que en los lípidos neutros.

Aplicación de las muestras

Previamente al desarrollo de la migración de las cromatoplasmas con los solventes correspondientes en cada caso, se procede a la aplicación con la ayuda del "Linomat" (aplicador semiautomático) de los patrones y muestras de los extractos lipídicos a analizar. Este aparato nos permite programar diferentes métodos donde podemos establecer el volumen de las muestras y los patrones, la distancia entre las muestras y el número total de muestras a aplicar en la placa. Cada vez que se aplique una muestra si se repite en más posiciones de la

placa el mismo aplicador las depositará en las posiciones que estén programadas y el volumen deseado.

Se deposita la placa horizontalmente en el soporte del “Linomat” y se determina la distancia del borde inferior a la aplicación. Normalmente se aplican los patrones al principio de la placa. Los patrones necesitan una preparación previa a partir de soluciones comerciales:

Soluciones concentradas de lípidos neutros (conservación a -80 °C)

Reactivo	Referencia/marca	Concentración
Lanosterol	L-1504 Sigma	12 mg/mL
Ergosterol	E-6510 Sigma	10 mg/mL
Squalene	S-3626 Sigma	11 mg/mL
Cholesteryl oleate	C-9253 Sigma	11 mg/mL
Ethyl oleate	O-8880 Sigma	18 mg/mL
Diolein	D-8894 Sigma	10 mg/mL
Triolein	T- 7140 Sigma	10 mg/mL

Soluciones concentradas de fosfolípidos (conservación a -80 °C)

Se	Reactivo	Referencia/marca	Concentración
	Phosphatidic acid (PA)	P-2767 Sigma	10 mg/mL
	Phosphatidylethanolamine (PE)	P-1223 Sigma	25 mg/mL
	Phosphatidylglycerol (PG)	P-6956 Sigma	25 mg/mL
	Phosphatidylcholine (PC)	P-6354 Sigma	25 mg/mL
	Phosphatidylserine (PS)	P-6641 Sigma	10 mg/mL
	Phosphatidylinositol (PI)	P-5766 Sigma	10 mg/mL

toman los microlitros que indica el programa, el volumen requerido es superior al teórico aplicado para disponer de suficiente volumen de muestra. Los patrones tanto en el caso de lípidos neutros o fosfolípidos son una mezcla de los diferentes lípidos que esperamos analizar de una concentración conocida, en nuestro caso se utilizó 1 µg/µL.

Si la solución patrón tiene una concentración de 1 µg/µL se pueden aplicar 4 diferentes concentraciones de patrón: 1 µL, 2 µL, 3 µL y 4 µL. A continuación las muestras. En la placa se pueden aplicar de 12 a 15 muestras.

Cuando la placa ya está seca se procede a su revelación con una solución de sulfato de cobre, se deja secar en la campana de extracción de gases y cuando ya esté seca se quema sobre una placa de vitrocerámica a 160 °C durante 2 o 3 minutos, hasta que se observa una intensidad de las bandas suficiente para poder cuantificar.

Una vez reveladas las placas se escanean para tenerlas en soporte informático y cuantificarlas utilizando un programa de análisis de imagen como el Quantity one o el Image J.

Observaciones a tener en cuenta:

- Entre muestra y muestra se debe lavar la jeringa con cloroformo para evitar contaminaciones de las muestras o patrones.
- También se tiene que evitar tocar la placa con los dedos, y por tanto es conveniente llevar guantes.
- Al succionar los volúmenes, tirar del émbolo de la jeringa lentamente para evitar la presencia de burbujas.

Image J

Para cuantificar las bandas correspondientes a los diferentes tipos de lípidos, se selecciona una línea de bandas donde se incluyen los patrones de concentración conocida y los extractos lipídicos. A continuación se realiza el siguiente análisis:

- Analyse/ Gels/Select First Lane
- Analyse / Gels /Plot

Se selecciona el área de cada uno de los picos del cromatograma y se pulsa Analyse mesure, de manera que se obtiene el área de cada una de las bandas. Conociendo la concentración de los patrones y también su área se puede obtener una recta de regresión para cada uno de los lípidos y así poder cuantificar los diferentes familias de lípidos de los extractos de células de levaduras.

3.7. Análisis de ácidos grasos por Cromatografía de Gases (Rozès et al., 1992)

Previo al análisis de las muestras problema se pasarán por el cromatógrafo por los ácidos grasos que esperamos encontrar en las células y de concentraciones conocidas

- **Patrón de ácidos grasos (Conservación: - 80 °C)**

Reactivo	Referencia/marca	Concentración
MCFA (C6, C8, C10, C12, C14)	C-2250, C2076, C1875, L-4250, M-3128 Sigma	1 mg/mL
Palmitic, stearic acids (C16, C18)	P-6641, S-4751 Sigma	4 mg/mL
Palmitoleic acid (C16:1)	P- 9417 Sigma	5 mg/mL
Oleic acid (C18:1)	27728 Sigma	4 mg/mL
Linolenic, linoleic acids (C18:3, C18:2)	L2376, L1376 Sigma	10mg/mL
Arachic, behenic acids (C20, C22)	A-3631, B-7644 Sigma	2 mg/mL
Myristoleic acid (C14:1)	M-3525 Sigma	1 mg/mL

• **Patrón interno_(Conservación: - 80 °C)**

Reactivo	Referencia/marca	Concentración
Heptanoic (C7)	H-9378	10 mg/mL
Heptadecanoic acid (C17)	H-3500 Sigma	40 mg/mL

Método.

Se inyectarán antes que las muestras 20 µL de la mezcla de patrones de ácidos grasos con 10 µL de patrón interno de dos ácidos grasos que sabemos que no están presentes en las muestras para obtener la constante k. Esta mezcla de ácidos grasos se somete al mismo tratamiento que las muestras.

- **SAPONIFICACIÓN :** NaOH al 5% en 50% MeOH:/H₂O: 1 mL
5 minutos a 100 °C, mezclar con el vórtex.
25 minutos más a 100 °C.
- **ACIDIFICACIÓN:** HCl (6M): 2 mL
- **EXTRACCIÓN:** Hexano/éter metil tert-butílico (1:1): 500 µL
- Se mezcla con el vórtex cada muestra durante 30 segundos
- Se recupera la fase orgánica centrifugando a 3000 rpm y se introducen 200 µL en un inserto que irá dentro del vial de cromatografía.
- A partir de un pellet de 5 x 10⁸ células/mL se procede a realizar el protocolo previamente descrito y se obtiene un cromatograma en el que podremos identificar

cada uno de los picos con un ácido graso determinado y su correspondiente tiempo de retención. Estos picos se integran y hallaremos sus correspondientes áreas. Sabiendo las áreas de los picos obtenidos en las muestras y conociendo áreas y concentraciones de los patrones se puede conocer la concentración de los diferentes ácidos grasos presentes en las células.

- El equipo utilizado para realizar estos análisis es un Hewlett-Packard 5890 conectado a un ordenador HP Vectra con el software ChemStation (Agilent). La muestra (1 μ L) es inyectada por un inyector automático HP 7673 (Agilent). El programa de temperatura es 140 °C x 4 minutos hasta 240 °C (13 minutos). La temperatura del inyector y detector son de 250 °C y 280 °C respectivamente. El gas vector utilizado es Helio a un flujo de 1.2 mL/min.

Los cálculos realizados son:

$$K_{\text{ref}} = [\text{AG}]_{\text{ref}} \times (\text{área patrón interno}_{\text{ref}} / \text{área AG}_{\text{ref}})$$

$$\text{Ácido graso (AG) muestra} = K_{\text{ref}} \times (\text{área AG muestra} / \text{área patrón interno muestra}).$$

BIBLIOGRAFÍA.

Ansari S, Gupta P, Mahanty SK and Prasad R (1993) Uptake of amino acids by *erg* mutants of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 31: 377-386.

Bely M, Sablayrolles JM and Barre P (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J Ferment Bioeng 70: 246-252.

Haughland RP (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6th edn. Eugene, OR: Molecular Probes Inc.

Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids 5:494-6.

Rozès N, Garcia Jares, C, Larue F, Lonvaud-Funel A (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. J Sci Food Agric 59: 351-359.

Zhang T and Fang H (2004) Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight Biotechnol Lett 26: 989-992.