

Grupo MicroWineLab. Interacción y comunicación entre levaduras enológicas

PILAR MORALES, MIGUEL MEJÍAS, ANA PEREA, ANA MARTÍN, VIRGILE ROSE, CRISTINA JUEZ, LAURA LÓPEZ-BERGES, RAMÓN GONZÁLEZ

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC – Universidad de La Rioja – Gobierno de La Rioja)

✉ rgonzalez@icvv.es



Personal del grupo MicroWineLab.

El grupo MicroWineLab: “Metabolismo, genética, y biotecnología de levaduras enológicas” trabaja desde hace años en dos líneas de trabajo interrelacionadas. La primera es la reducción del grado alcohólico de los vinos mediante la optimización de condiciones de fermentación –especialmente el aporte de oxígeno, y la selección y mejora de cepas de levaduras, tanto *Saccharomyces cerevisiae* como otras especies-. La segunda línea, en la que se centra este artículo, es el estudio de las interacciones entre microorganismos –fundamentalmente levaduras- durante la fermentación alcohólica.

Tenemos tres razones principales para interesarnos por estas interacciones. La

primera es que, de una manera creciente, a lo largo del siglo XXI se están introduciendo en el mercado enológico cultivos iniciadores distintos a *S. cerevisiae*. Esta práctica deriva del conocimiento sobre la ecología microbiana de la vinificación y sobre la fisiología de las especies llamadas no-*Saccharomyces* (o no-*cerevisiae* en algunos casos, ya que pueden pertenecer a otras especies del género *Saccharomyces*). Muchas de estas levaduras han sido tradicionalmente consideradas como alterantes, y por lo tanto indeseables (o inocuas en el mejor de los casos). Sin embargo, actualmente se considera que muchas de ellas realizan interesantes contribuciones al proceso de vinificación y a la calidad del vino. El aspecto más estudiado ha sido su contribución a la

complejidad aromática, y por ese motivo, la mayor parte de los cultivos iniciadores no-*Saccharomyces* presentes en el mercado se promocionan con esa aplicación. Otras ventajas propuestas para el uso de levaduras no-*Saccharomyces* están relacionadas, entre otros aspectos, con su impacto sobre el color, la acidez, el contenido en glicerol o manoproteínas, o con su potencial como agentes de biocontrol. Lo habitual es utilizar estos cultivos iniciadores alternativos en combinación con *S. cerevisiae*, ya que normalmente no son capaces de llevar a término la fermentación, al menos con una cinética aceptable.

Precisamente, el potencial interés de algunas especies de levaduras no-*Saccharomy-*

ces para la reducción del grado alcohólico es el punto de conexión entre nuestras dos principales líneas de trabajo actuales. Nuestro trabajo en esta línea ha explorado el uso de cultivos mixtos y secuenciales, en condiciones semiaeróbicas —al menos durante una parte del proceso— (Gonzalez *et al.*, 2021). La principal especie con la que hemos trabajado en esta línea, aparte de *S. cerevisiae* es *Metschnikowia pulcherrima*.

El tercer motivo de interés es más académico que práctico, ya que consideramos que la fermentación alcohólica constituye un buen modelo de estudio para descubrir conceptos relevantes en ecología microbiana. Por un lado, se trata de un sistema relativamente natural o espontáneo, que ha evolucionado durante milenios (si bien la intervención humana ha sido imprescindible para generar esas condiciones), y ha sido estudiado intensamente durante las últimas décadas. Por otro lado, los consorcios microbianos que encontramos en este entorno son más simples que en otros ambientes naturales, como el tracto gastrointestinal o los suelos, y por tanto es más abordable experimentalmente (Conacher *et al.*, 2021).

Comunicación entre levaduras enológicas. Hipótesis y primeras evidencias

Las interacciones entre microorganismos enológicos pueden implicar diversos mecanismos, como la competición por algunos nutrientes, el intercambio de metabolitos, la producción de etanol, o la producción de otras sustancias tóxicas como factores killer o pulquerimina. Sin embargo, la mayor parte de las interacciones conocidas parecen poco específicas —dejando aparte los factores killer— y negativas. Al abordar el estudio de las interacciones, nuestro grupo se planteó la posibilidad de que existan también mecanismos de comunicación entre las levaduras enológicas. En este contexto entendemos como comunicación un proceso en el que, alguna molécula (o estructura) producida por una levadura es capaz de desencadenar una respuesta fisiológica en otra levadura, más allá de la respuesta a sustancias tóxicas o la concentración de determinados nutrientes.

Para abordar esta cuestión comenzamos realizando análisis transcriptómicos

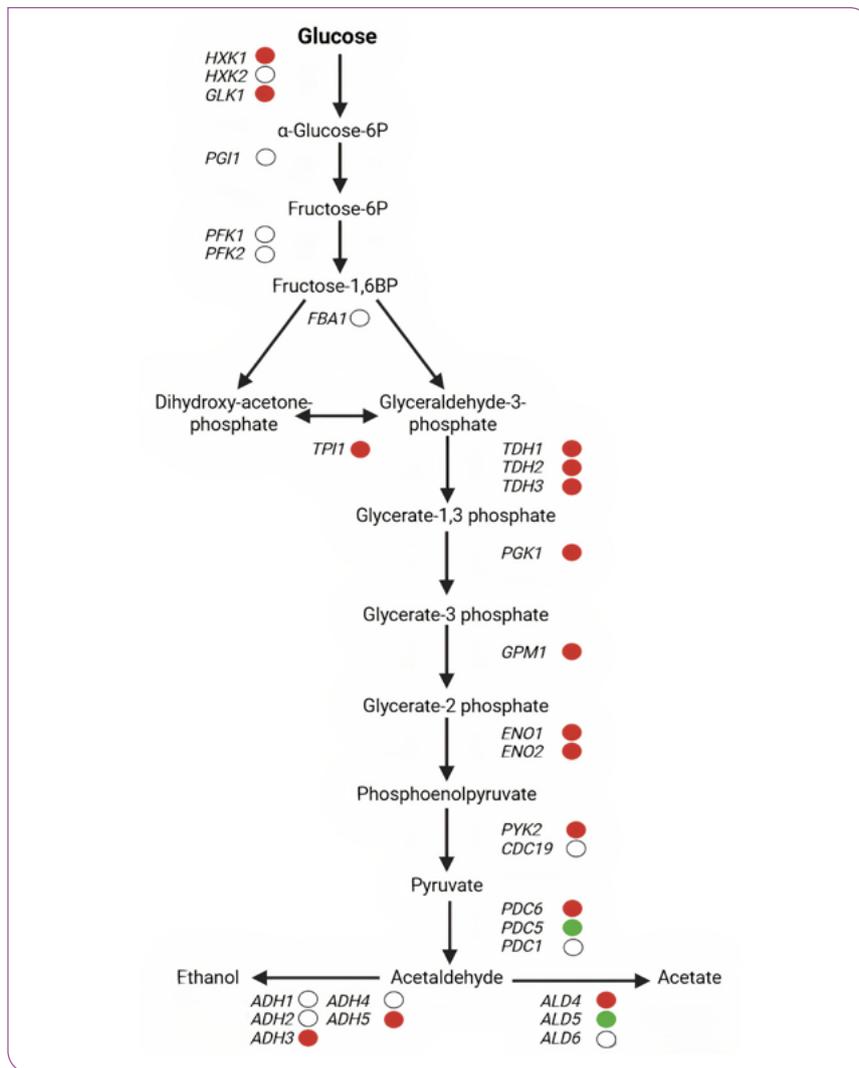


Figura 1. Esquema de la glicólisis, indicando los genes que codifican cada etapa en *S. cerevisiae*. Se etiquetan en color rojo los genes que se expresan más en co-cultivo que en cultivo simple a las dos horas de inoculación; y en verde los que se expresan menos.

de levaduras enológicas, comparando el transcriptoma de cultivos co-inoculados con el de cultivos puros. Realizamos estos análisis tras tiempos muy cortos de contacto (2-3 horas), con el fin de soslayar la ambigüedad que se puede generar en experimentos a más largo plazo, combinando factores bióticos y abióticos. Consideramos que, por ejemplo, el consumo de nutrientes o la producción de etanol serían insignificantes en tiempos tan cortos, y por lo tanto no tendrían impacto sobre el patrón de transcripción que observásemos.

Uno de nuestros primeros resultados en esta línea (Tronchoni *et al.*, 2017) mostró que, tras tan sólo dos horas de contacto con *Torulaspora delbrueckii* en mosto sin-

tético, las células de *S. cerevisiae* mostraban una activación transcripcional de casi todos los genes implicados en la glicólisis (Figura 1). *T. delbrueckii* mostraba una respuesta similar, pero retrasada en el tiempo. En experimentos posteriores fuimos encontrando resultados similares y complementarios que indican que, en respuesta a otras levaduras en el medio de cultivo, *S. cerevisiae* responde activando transcripcionalmente la glicólisis, así como la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Curiel *et al.*, 2017; Mejías-Ortiz *et al.*, 2023), pero con diferencias en función de la especie concreta de levadura. Por ejemplo, en el caso de la respuesta a *M. pulcherrima* pudimos también apreciar la represión de genes del ciclo de Krebs (Mencher *et al.*, 2021).

Las vesículas extracelulares como potenciales vectores de información

Las vesículas extracelulares (VEs) son partículas delimitadas por una bicapa lipídica que son secretadas por las células de todos los reinos y que no pueden autorreplicarse (Gill *et al.*, 2019). Las VEs de mamíferos se han estudiado extensivamente, ya que están implicadas en múltiples actividades biológicas como la presentación de antígenos, la sinapsis, la transmisión de virus, inmunomodulación, angiogénesis o metástasis (Park *et al.*, 2016). Aunque existen algunas descripciones preliminares de lo que probablemente eran VEs de hongos, su estudio en este reino es relativamente reciente, y comenzó fundamentalmente con hongos y levaduras de interés clínico (Gil-Bona *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016; Rodrigues y Nimrichter, 2022). *S. cerevisiae* se encuentra también entre las especies fúngicas más estudiadas en cuanto a la producción, composición y función de las VEs (Oliveira *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014; Winters *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2024).

Una de las principales funciones biológicas atribuida a las VEs es la comunicación intercelular, llegando a ser consideradas recientemente como un “paradigma de la comunicación biológica” (Stahl y Raposo, 2019; Raposo y Stahl, 2019). Atendiendo a los resultados previos, el grupo MicroWineLab decidió explorar el potencial rol de las VEs de levaduras enológicas en interacciones biológicas. La primera fase de esta línea de trabajo consistió en identificar VEs producidas por especies de interés enológico en condiciones de vinificación (por razones prácticas se utilizaba “mosto sintético”). Las cinco especies analizadas produjeron VEs de alrededor de 100-200 nm que se pudieron observar por microscopía electrónica, además se identificaron las proteínas presentes en las VEs producidas por *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, que estaban enriquecidas tanto en enzimas de la glicolisis como en proteínas relacionadas con la pared celular (Mencher *et al.*, 2020). Más adelante pudimos mostrar que las VEs producidas por *M. pulcherrima* inducían cambios transcriptómicos en *S. cerevisiae* similares a los que inducían las células enteras de la misma especie (Mejías-Ortiz *et al.*, 2023). Más recientemente hemos encontrado respuestas transcriptómicas de *S. cerevisiae* a VEs de otras especies de levaduras

enológicas (Mejías *et al.*, 2025). Todos estos ensayos se han realizado en tiempos cortos de contacto en mostos sintético.

Determinación genética de las interacciones entre levaduras enológicas

Con el fin de entender los mecanismos de comunicación entre levaduras enológicas, además de describir las respuestas fisiológicas y transcriptómicas frente a células o VEs de otras levaduras, consideramos que era interesante identificar los determinantes genéticos que influyen en el desarrollo de las levaduras en condiciones de competición. Para abordar esta cuestión hemos recurrido a dos aproximaciones “no dirigidas” y conceptualmente relacionadas entre sí. Por un lado, estamos realizando experimentos de evolución experimental de *S. cerevisiae* en presencia de levaduras de otras especies enológicas (*M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum* y *Candida zemplinina*).

Por otro lado, también en presencia de otras levaduras, hemos llevado a cabo experimentos de competición con una colección de mutantes de delección identificados por códigos de barras únicos, se trata de una adaptación de la técnica HOP, desarrollada hace unos años (Giaever *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 2007), conocida ahora como BARseq porque incorpora la secuenciación de los códigos de barras en lugar de su cuantificación por microarrays (Smith *et al.*, 2010). El grupo había aplicado previamente esta tecnología para el estudio de la adaptación de *S. cerevisiae* a factores de estrés abiótico durante la fermentación (Novo *et al.*, 2013; Gonzalez *et al.*, 2016, Valero *et al.*, 2020).

Mediante el uso de BARseq, los resultados provisionales indican que la asimilación del azufre puede ser determinante en la competitividad de *S. cerevisiae* en condiciones de co-cultivo. En cuanto a la evolución experimental, hemos observado que la aparición de mutantes con efectos sobre la morfología de colonia es más rápida en presencia de algunos competidores (aunque no todos) que en evoluciones de *S. cerevisiae* como cultivo puro. Estamos pendientes de la secuenciación genómica de las poblaciones evolucionadas para descifrar las causas de estos cambios y de la adaptación al co-cultivo en general.

Conclusiones

Las interacciones entre levaduras enológicas que dependen directamente del metabolismo primario, como la competición por nutrientes limitantes, el impacto de la producción de etanol, o el intercambio de intermediarios metabólicos son sin duda muy relevantes para el desarrollo de las fermentaciones industriales e influyen en la calidad del vino. Sin embargo, durante los últimos años hemos acumulado evidencias de que existen además interacciones a corto plazo entre las levaduras, no debidas a cambios en la composición del medio, que podrían considerarse como mecanismos de comunicación. Probablemente estas señales químicas son complejas, e implican moléculas volátiles y no volátiles. Además, nuestros resultados indican que las vesículas extracelulares de las levaduras pueden contribuir a esas señales de comunicación.

En interacciones a más largo plazo, que no dependen necesariamente de estas señales de comunicación, y gracias al uso de tecnologías de alto rendimiento (secuenciación genómica, BARseq) estamos comenzando a identificar rutas metabólicas no triviales que son relevantes para *S. cerevisiae* en el contexto de una competición con otras levaduras en condiciones enológicas. Hasta ahora, la mayor parte de nuestros estudios se han enfocado sobre *S. cerevisiae*; sin embargo, la adaptación a la competición en mosto de uva de otras especies de levaduras, sobre todo las más abundantes o las que se utilizan como cultivos iniciadores complementarios, puede ser igualmente relevante y su estudio forma parte de nuestros objetivos a medio plazo. También pretendemos avanzar en la identificación de los componentes de las VEs y de otras moléculas que son responsables de las respuestas observadas hasta ahora.

Referencias

- Conacher, C. G., Luyt, N. A., Naidoo-Blassoples, R. K., Rossouw, D., Setati, M. E., & Bauer, F. F. (2021). The ecology of wine fermentation: a model for the study of complex microbial ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 3027–3043. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11270-6>
- Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2017). Different non-*Saccharomyces* yeast species stimulate

- nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., ... Johnston, M.** (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature00935>
- Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., & Gil, C.** (2015). Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *Journal of Proteome Research*, 14, 142–153. <https://doi.org/10.1021/pr5007944>
- Gill, S., Catchpole, R., & Forterre, P.** (2019). Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 43, 273–303. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042>
- Gonzalez, R., Guindal, A. M., Tronchoni, J., & Morales, P.** (2021). Biotechnological approaches to lowering the ethanol yield during wine fermentation. *Biomolecules*, 11, 1569. <https://doi.org/10.3390/biom11111569>
- Gonzalez, R., Morales, P., Tronchoni, J., Cordero-Bueso, G., Vaudano, E., Quirós, M., & Valero, E.** (2016). New genes involved in osmotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1545. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01545>
- Mejias-Ortiz, M., Mencher, A., Morales, P., Tronchoni, J., & Gonzalez, R.** (2023). *Saccharomyces cerevisiae* responds similarly to co-culture or to a fraction enriched in *Metschnikowia pulcherrima* extracellular vesicles. *Microbial Biotechnology*, 16, 1027–1040. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14240>
- Mejias-Ortiz, M., Morales, Juárez, G., Gonzalez, R.** (2025). Protein biosynthesis and carbon catabolite repression are transcriptionally upregulated in *Saccharomyces cerevisiae* by extracellular fractions from several wine yeast species. *Microbial Biotechnology*, (en prensa).
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez, R., & Tronchoni, J.** (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, 94, 103670. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103670>
- Mencher, A., Morales, P., Valero, E., Tronchoni, J., Patil, K. R., & Gonzalez, R.** (2020). Proteomic characterization of extracellular vesicles produced by several wine yeast species. *Microbial Biotechnology*, 13, 1581–1596. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13614>
- Novo, M., Mangado, A., Quirós, M., Morales, P., Salvadó, Z., & Gonzalez, R.** (2013). Genome-wide study of the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the early stages of wine fermentation. *PLoS ONE*, 8, e74086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074086>
- Oliveira, D. L., Nakayasu, E. S., Joffe, L. S., Guimarães, A. J., Sobreira, T. J., Nosanchuk, J. D., Cordero, R. J., Frases, S., Casadevall, A., Almeida, I. C., Nimrichter, L., & Rodrigues, M. L.** (2010). Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE*, 5, e11113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011113>
- Park, Y. H., Shin, H. W., Jung, A. R., Kwon, O. S., Choi, Y. J., Park, J., & Lee, J. Y.** (2016). Prostate-specific extracellular vesicles as a novel biomarker in human prostate cancer. *Scientific Reports*, 6, 30386. <https://doi.org/10.1038/srep30386>
- Pierce, S. E., Davis, R. W., Nislow, C., & Giaever, G.** (2007). Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures. *Nature Protocols*, 2, 2958–2974. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.427>
- Raposo, G., & Stahl, P. D.** (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20, 509–510. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0158-7>
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., & Nimrichter, L.** (2014). The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *Journal of Proteomics*, 97, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.001>
- Rodrigues, M. L., & Nimrichter, L.** (2022). From fundamental biology to the search for innovation: The story of fungal extracellular vesicles. *European Journal of Cell Biology*, 101, 151205. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151205>
- Rodrigues, M. L., Oliveira, D. L., Vargas, G., Girard-Dias, W., Franzen, A. J., Frases, S., Miranda, K., & Nimrichter, L.** (2016). Analysis of yeast extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology*, 1459, 175–190. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_12
- Smith, A. M., Heisler, L. E., St Onge, R. P., Farias-Hesson, E., Wallace, I. M., Bodeau, J., Harris, A. N., Perry, K. M., Giaever, G., Pourmand, N., & Nislow, C.** (2010). Highly-multiplexed barcode sequencing: an efficient method for parallel analysis of pooled samples. *Nucleic Acids Research*, 38, e142. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq368>
- Stahl, P. D., & Raposo, G.** (2019). Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis. *Physiology*, 34, 169–177. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2018>
- Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., & Gonzalez, R.** (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017>
- Valero, E., Tronchoni, J., Morales, P., & Gonzalez, R.** (2020). Autophagy is required for sulfur dioxide tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 13, 599–604. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13495>
- Winters, C. M., Hong-Brown, L. Q., & Chiang, H. L.** (2020). Intracellular vesicle clusters are organelles that synthesize extracellular vesicle-associated cargo proteins in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 295, 2650–2663. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008612>
- Yuan, M., Ma, W., Liu, B., Zou, X., Huang, B., Tian, X., Jin, Y., Zheng, N., Wu, Z., & Wang, Y.** (2024). Delivery of therapeutic RNA by extracellular vesicles derived from *Saccharomyces cerevisiae* for medicine applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113, 3574–3585. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2024.10.035>