

PRE2023- Mecanismos de comunicación entre cultivos iniciadores de fermentación (FERMENTALK) (PID2022-136815OB-I00)

Área Científica: Vida. Ciencia y Tecnología de Alimentos

DESCRIPCION (Max 1500 caracteres)

El grupo MicroWine comenzó hace más de 5 años con el estudio de las interacciones entre levaduras durante la fermentación vínica. La principal hipótesis de la propuesta actual es que las vesículas extracelulares (VEs) juegan un papel en la comunicación entre las diferentes especies microbianas.

Los objetivos particulares de la propuesta son: ampliar nuestro conocimiento sobre las interacciones mediadas por VEs entre especies de interés enológico; estudiar la implicación de VEs en las comunicaciones bacteria-levadura; estudiar el impacto de las VEs en la interacción entre *B. bruxellensis* y levaduras de biocontrol; analizar la evolución temporal de la respuesta transcriptómica a VEs; evaluar el impacto de las VEs en una interacción continuada entre cultivos iniciadores; y estudiar el impacto de interacciones a largo plazo sobre la respuesta a VEs.

La participación en este proyecto requerirá del uso de técnicas de microbiología clásica, utilización de biorreactores, fraccionamiento de muestras biológicas (ultracentrifugación, ultrafiltración, cromatografía), técnicas analíticas instrumentales (HPLC y GCMS), extracción de RNA, y análisis transcriptómico.

El grupo ofrece un entorno formativo completo, con la participación en reuniones científicas a todos los niveles (grupo, centro, congresos nacionales e internacionales). La participación en diversas redes internacionales proporciona oportunidades adicionales para el aprendizaje a través del intercambio de personal investigador.

Palabras clave: vesículas extracelulares, vino, levaduras, interacciones

Línea de trabajo en la que se centra la propuesta.

Estudio de las interacciones entre microorganismos durante la fermentación alcohólica

El trabajo realizado en la línea de reducción de grado alcohólico con levaduras no-*Saccharomyces* nos condujo a interesarnos por las interacciones que tienen lugar entre distintas especies de levadura durante la fermentación alcohólica. Y nos centramos en las respuestas a la detección de competidores. Para ello, comenzamos estudiando la respuesta transcriptómica de una especie de levadura a la presencia de otra u otras especies tras un tiempo corto de contacto, para evitar que la respuesta fuese debida a la depleción de nutrientes o a la producción de metabolitos tóxicos. Hemos sido pioneros en este tipo de estudio, y el número de citas de la primera publicación avala el interés y la novedad del estudio. Mostramos que *S. cerevisiae* responde a la presencia de otras levaduras activando la

captación de azúcares, la glucólisis, y la fermentación de manera general a todas las especies ensayadas, mientras que también mostraba respuestas que eran específicas para cada una de las otras especies. También mostramos que los cambios transcripcionales de *T. delbrueckii* en respuesta a la presencia de *S. cerevisiae* consisten en un incremento del catabolismo del carbono, pero que no se activa tan tempranamente como en *S. cerevisiae*, lo que justificaría que sea esta última la que se impone en dicho cultivo.

En el siguiente proyecto de esta línea de trabajo nos hemos interesado en el papel de las vesículas extracelulares como vehículos de comunicación celular durante la fermentación alcohólica. Hemos demostrado la producción de vesículas extracelulares en un mosto sintético por parte de las levaduras, y hemos realizado un análisis de su composición proteica. Basándonos en los resultados de los estudios de interacciones, seleccionamos la especie *M. pulcherrima*, para estudiar el efecto de las vesículas extracelulares de esta especie sobre *S. cerevisiae*. Muy recientemente hemos mostrado que la respuesta de *S. cerevisiae* a una fracción enriquecida en vesículas extracelulares de *M. pulcherrima* es extraordinariamente parecida a la respuesta a la presencia de células de esta misma especie. Este resultado apoya la hipótesis de que las vesículas extracelulares sirven de vehículo de comunicación, y abre un abanico de posibilidades para continuar profundizando en este tema. En el proyecto que respalda este contrato de formación trataremos de profundizar en el conocimiento de las interacciones entre levaduras, y en el papel de las vesículas extracelulares en dichas interacciones (ver la descripción de la propuesta).

#### Publicaciones del grupo en la línea de interacciones

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*. *Int J. Food Microbiol.* 241: 60-68. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017

Curiel, J.A.; Morales, P.; Gonzalez, R.; Tronchoni, J. (2017). Different non-*Saccharomyces* yeast species stimulate nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. *Front Microbiol*, 8, Article 2121. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02121

Gonzalez, R.; Tronchoni, J.; Mencher, A.; Curiel, J.A.; Rodrigues, A.J.; López-Berges, L.; Juez, C.; Patil, K.R.; Jouhten, P.; Gallego, N.; Omarini, A.; Fernández-Preisegger, M.; Morales, P. (2019). Low phenotypic penetrance and technological impact of yeast [GAR+] prion-like elements on winemaking. *Front Microbiol* 9 art 3311. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03311)

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. *Microb Biotechnol* 13: 1581-1596. DOI: 10.1111/1751-7915.13614

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 Microbiol* 94 (2021) 103670. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103670

Morales, P.; Mencher, A.; Tronchoni, J.; Gonzalez, R. (2021). Extracellular vesicles in food biotechnology. *Microb Biotechnol* 14: 8-11. DOI:10.1111/1751-7915.13657

Mencher, A.; Morales, P.; Tronchoni, J.; Gonzalez, R. (2021). Mechanisms involved in interspecific communication between wine yeasts. *Foods* 2021, 10, 1734. DOI:10.3390/foods10081734

Mencher, A., Mejias-Ortiz, M., Morales, P., Tronchoni, J., Gonzalez, R. (2022) Protein content of the *Oenococcus oeni* extracellular vesicles-enriched fraction. *Food Microbiol* 106 (2022) 104038. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104038>.

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. *Microb Biotechnol* 16: 1027–1040. DOI: 10.1111/1751-7915.14240

Resumen del proyecto financiado:

Mecanismos de comunicación entre cultivos iniciadores de fermentación (FERMENTALK)

Los alimentos fermentados son parte fundamental de la dieta humana en todas las culturas, y su popularidad está creciendo a medida que se conocen nuevos datos sobre su impacto positivo en nuestra salud. Incluso cuando se usan cultivos iniciadores, muchos de estos alimentos no son producidos por la acción de un único microorganismo, sino por la acción de consorcios microbianos. El vino es un buen ejemplo ya que se puede producir mediante fermentación espontánea, el uso de un único cultivo iniciador (que actúa en combinación con la microbiota naturalmente presente en el mosto), o incluso mediante el uso de múltiples cultivos iniciadores. Para los objetivos del proyecto, además de servir como modelo, el vino presenta el interés de su gran impacto económico para Europa y especialmente positivo para nuestro país (donde el sector es responsable de más de 400000 equivalentes a empleo a tiempo completo).

Con el fin de contribuir a mejorar el control de los procesos fermentativos multiespecíficos, en este proyecto pretendemos profundizar en nuestro conocimiento sobre los mecanismos de comunicación entre los microorganismos durante la producción de alimentos fermentados. Desde el punto de vista práctico, y concretamente para el sector enológico, identificamos al menos cuatro situaciones en las que este conocimiento podría ser de interés, el uso de levaduras no-*Saccharomyces* para diversificar sensorialmente los vinos, las estrategias de reducción del grado alcohólico basadas en levaduras alternativas a *Saccharomyces cerevisiae*, el uso de levaduras como agentes de biocontrol frente a microorganismos alterantes, y la co-inoculación de bacterias y levaduras para el desarrollo simultáneo de la fermentación alcohólica y la maloláctica.

La principal hipótesis científica de la propuesta es que las vesículas extracelulares (VEs) juegan un papel en la comunicación entre las diferentes especies microbianas, durante la fermentación de alimentos en general y en cada uno de estos contextos en particular. De

acuerdo con esto, los objetivos particulares de la propuesta están encaminados a: ampliar nuestro conocimiento sobre las interacciones mediadas por VEs entre diferentes especies de interés enológico; estudiar la implicación de VEs en las comunicaciones bacteria-levadura; estudiar el impacto de las VEs en la interacción entre *Brettanomyces bruxellensis* y levaduras de biocontrol; analizar la evolución temporal de la respuesta transcriptómica de *S. cerevisiae* tras una exposición puntual a VEs; evaluar el impacto de las VEs en una interacción continuada entre cultivos iniciadores; y estudiar el impacto de interacciones a largo plazo sobre la respuesta a VEs.

Respecto a la generación de conocimiento y su impacto científico, el grupo que presenta esta propuesta está siendo pionero en la demostración de los efectos de las VEs en un contexto biotecnológico y esperamos seguir ampliando la repercusión de nuestros resultados a través de este segundo proyecto en esta línea. Desde el punto de vista práctico, esperamos que la mejora del conocimiento de las interacciones entre microorganismos durante la fermentación enológica (o de otros alimentos) sirva, a medio o largo plazo, para diseñar nuevos cultivos iniciadores mixtos, y constituya un conocimiento de base para el manejo de estos procesos, tanto a escala artesanal como industrial.