

PROYECTOS ESTRATÉGICOS DE CONSORCIOS DE INVESTIGACIÓN EMPRESARIAL NACIONAL - PROYECTO CIEN

ESTUDIO DE NUEVOS FACTORES RELACIONADOS CON EL SUELO, LA PLANTA Y LA MICROBIOTA
ENOLÓGICA QUE INFLUYEN EN EL EQUILIBRIO DE LA ACIDEZ DE LOS VINOS Y EN SU GARANTÍA DE
CALIDAD Y ESTABILIDAD EN CLIMAS CÁLIDOS

LOWpHWINE

Eva Navascués
Dirección I+D+i

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA



Necesidad del Proyecto

Búsqueda de soluciones a la problemática derivada del aumento del pH de los vinos en zonas cálidas.



- El viñedo es, sin duda, uno de los cultivos más vulnerables a las nuevas condiciones impuestas por el cambio climático al tratarse de una práctica agrícola limitada a un rango latitudinal muy concreto y principalmente asociados a regiones cálidas.
- En el aspecto productivo, el cambio climático está ejerciendo una influencia cada vez mayor sobre la fenología de la vid y la composición de la uva. **Se evidencia menos acidez debida pH más elevado en uva.**
- **Este incremento de pH, afecta a un buen número de propiedades enológicas:** extracción de antocianos, Insolubilización de tartratos, Oxidación, Necesidad de sulfuros, Percepción sensorial, estabilidad colorante, química y microbiológica del vino y por tanto **a su evolución.**

Objetivos

- **OBJETIVO GENERAL:** el estudio y validación de soluciones científico-tecnológicas para regular y/o **controlar el aumento del pH de los vinos españoles en las condiciones actuales de cambio climático**, actuando sobre el ecosistema formado por suelo-planta-vino, de tal forma que no se espera una solución única e individual, sino que será fruto de la combinación de una o varias de ellas para lograrlo.
- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:** están relacionados con la identificación, en cada caso, de la **problemática asociada a cada pilar del ecosistema, es decir, al SUELO, al MATERIAL VEGETAL y al VINO**, la generación del conocimiento necesario para comprender la raíz del mismo y la propuesta de posibles soluciones y alternativas científico-tecnológicas y evaluar y validar éstas a nivel laboratorio y/o piloto para verificar su efecto individual y conjunto en cada caso y, particularmente, para cada una de las bodegas participantes en el consorcio





LOWpH WINE

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA



Oficial



socios empresariales

FERTILIZACIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE K* EN UVA

CUBIERTAS MANEJO

ESTRUCTURA DEL SUELO: MICORRIZAS

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS
VIÑA



RECURSOS VITICOLAS:
NUEVOS PORTAINJERTOS
VARIEDADES



Nuevas soluciones científico-tecnológicas frente a la falta de acidez en los vinos de nuestras regiones vitivinícolas

MIL SETENTAY SEIS

4 Bodegas
4 Industria Auxiliar

2 Niveles:
Investigación + Desarrollo



RECURSOS TECNOLOGICOS
ELIMINACION DE K*
INCREMENTO DE ACIDEZ

MODULACIÓN DE LA ACIDEZ MEDIANTE MICRROORGANISMOS

ESTRATEGIAS COMBATIVAS:
VINO

Estudio de los mecanismos moleculares y procesos metabólicos en levaduras de origen enológico para el control de la acidez en vinos

LINEA TRONCAL



LOWpH WINE

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA

Organismos de Investigación



IRTA

FERTILIZACIÓN PARA LA REDUCCIÓN DE K* EN UVA
CUBIERTAS
MANEJO

ESTRUCTURA DEL SUELO:
MICORRIZAS

**ESTRATEGIAS PREVENTIVAS
VIÑA**

RECURSOS VITICOLAS:
NUEVOS PORTAINJERTOS
VARIEDADES



Nuevas soluciones científico-tecnológicas frente a la falta de acidez en los vinos de nuestras regiones vitivinícolas

**2 Niveles:
Investigación + Desarrollo**

Estudio de los mecanismos moleculares y procesos metabólicos en levaduras de origen enológico para el control de la acidez en vinos

RECURSOS TECNOLOGICOS
ELIMINACION DE K*
INCREMENTO DE ACIDEZ



**ESTRATEGIAS COMBATIVAS:
VINO**

MODULACIÓN DE LA ACIDEZ MEDIANTE MICRROORGANISMOS



LÍNEA TRONCAL
UCM (Línea Troncal)

LOWpHWINE

Plan de trabajo

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA

1

1 Proyecto LowpHWine, ejecutado en un periodo de **48 meses**
(1 de septiembre 2020 - 31 agosto 2024)

2

2 Actividades Técnicas, calificadas como **Investigación** la primera y **Desarrollo experimental** la segunda, participando, en mayor o menor medida, todos los socios empresariales.

3

3 Hitos técnico-económicos de 16 meses de duración

4

4 Vendimias

- Hito 1: 01/09/2020 A 31/12/2021. 16 meses
- Hito 2: 01/01/2022 A 30/04/2023. 16 meses
- Hito 3: 01/05/2023 A 31/08/2024. 16 meses



LOWpH WINE

HITO 1 LÍNEA TRONCAL

Estudio de los mecanismos moleculares y procesos metabólicos en levaduras de origen enológico para el control de la acidez en vinos



Dr. Domingo Marquina
Dr. Antonio Santos
Javier Vicente

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA



MIL SETENTAY SEIS



HITO 1 LÍNEA TRONCAL

OBJETIVO PRINCIPAL

Control de la acidez del vino a través del uso de levaduras y la determinación de los diferentes procesos metabólicos involucrados en la síntesis y degradación de los ácidos orgánicos presentes en mosto y vino.

De este objetivo principal se derivan otros **objetivos secundarios**,

2.1. Establecimiento de una colección de cepas de *Lachancea thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.

2.2. Caracterización genotípica de los aislamientos de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos

2.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos.

2.4. Edición génica mediante CRISPR-Cas9 de enzimas de la síntesis de ácido láctico, transportadores de ácido láctico y ATPasas de membranas.

2.5. Genómica y fenómica comparativa en *L. thermotolerans* y otras levaduras involucradas en el metabolismo de ácidos orgánicos.

2.6. Determinación de propiedades de las cepas aisladas y aprovechamiento industrial otras cepas de levaduras de la CYC (Complutense Yeast Collection).

Levaduras acidificantes: *Lachancea thermotolerans*

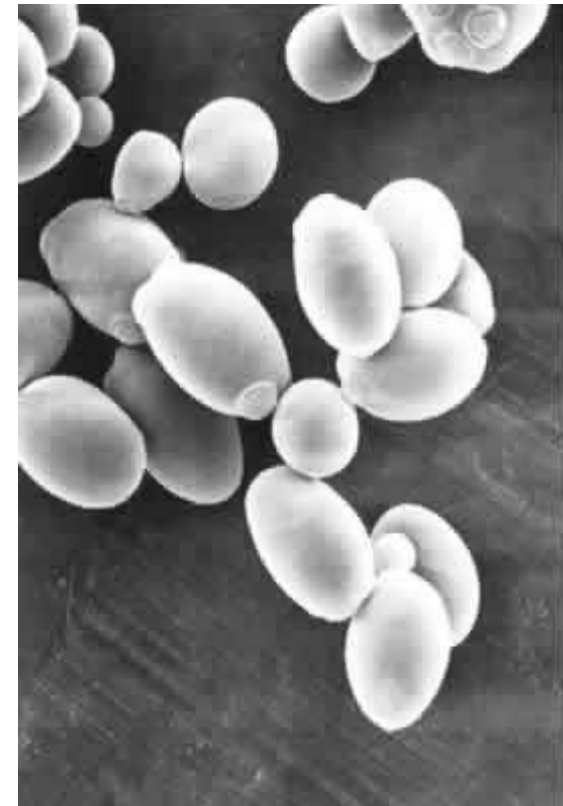
¿Que sabemos?

- ✓ Incremento de ácido láctico de 1-3 g/L
- ✓ Percepción sensorial positiva

¿Qué desconocemos?

Escasos representantes estudiados de la especie

- ¿Cuan presente está en nuestras fermentaciones? Es capaz de completar un proceso de fermentación completo? ¿Cuánto resiste al etanol?
- ¿Es resistente al SO₂?
- ¿Cual es la diversidad genética de la especie?
- ¿Y la diversidad fenotipica? ¿Rangos de producción de ácido láctico? ¿Que mecanismos genéticos y metabólicos de regulan su producción?
- ¿Cómo pueden contribuir su presencia en elaboración de vino??

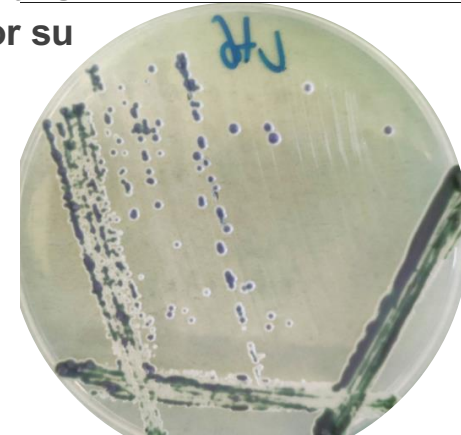


HITO 1 LÍNEA TRONCAL

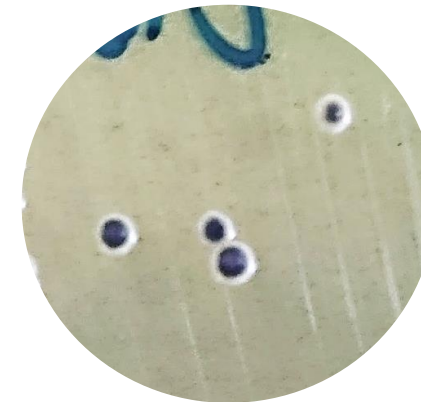
- Establecimiento de una colección de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.

Desarrollo de un medio de cultivo diferencial para el aislamiento de *L. thermotolerans*

- Medio diseñado en función de las necesidades nutricionales de *L. thermotolerans* que incorpora un colorante que sirve como indicador de pH y agente diferencial
- Testeo en diferentes especies de levaduras de interés enológico
- **El empleo de este medio ha permitido el aislamiento diferencial de *L. thermotolerans* con un porcentaje de fiabilidad próximo al 85%**

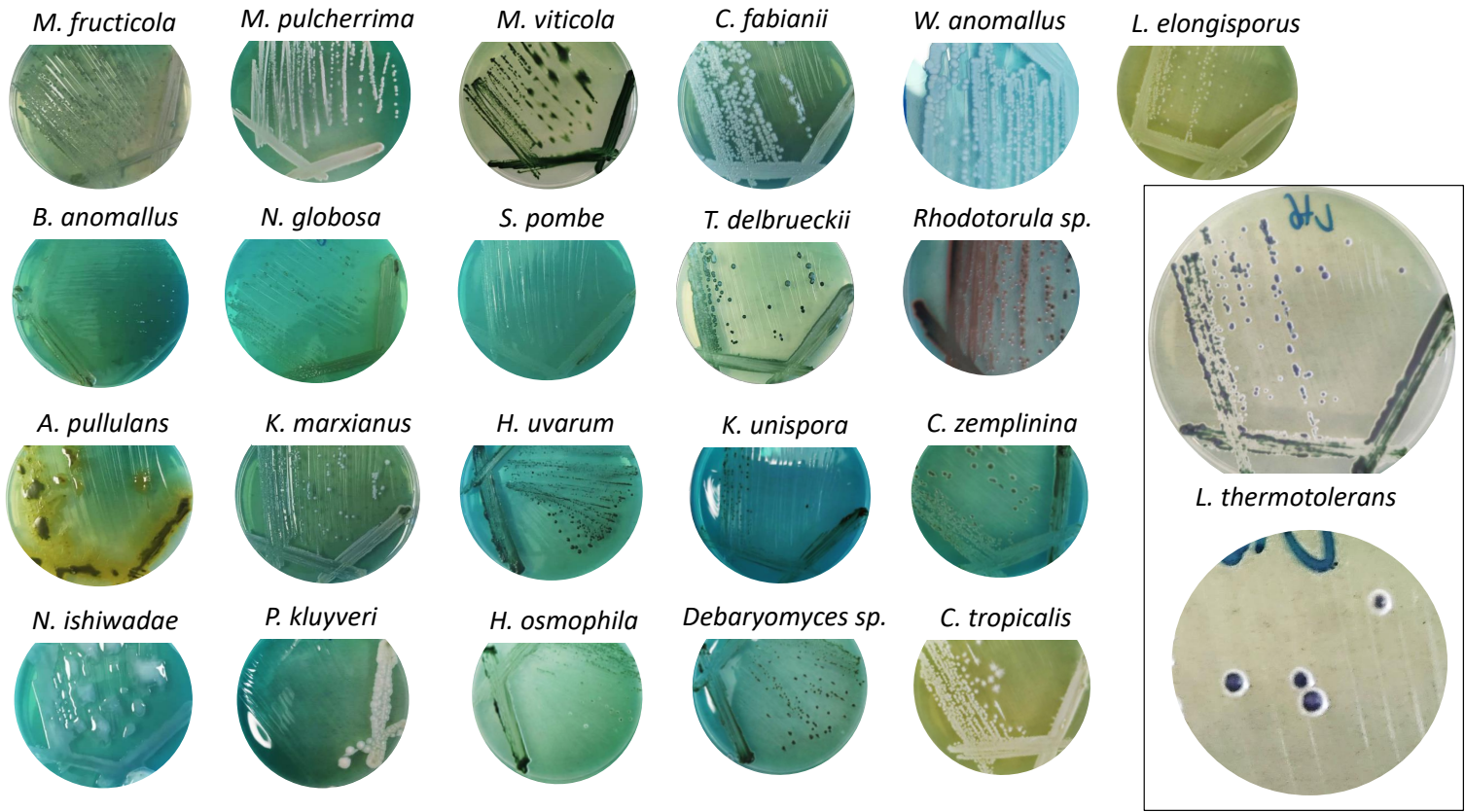


L. thermotolerans



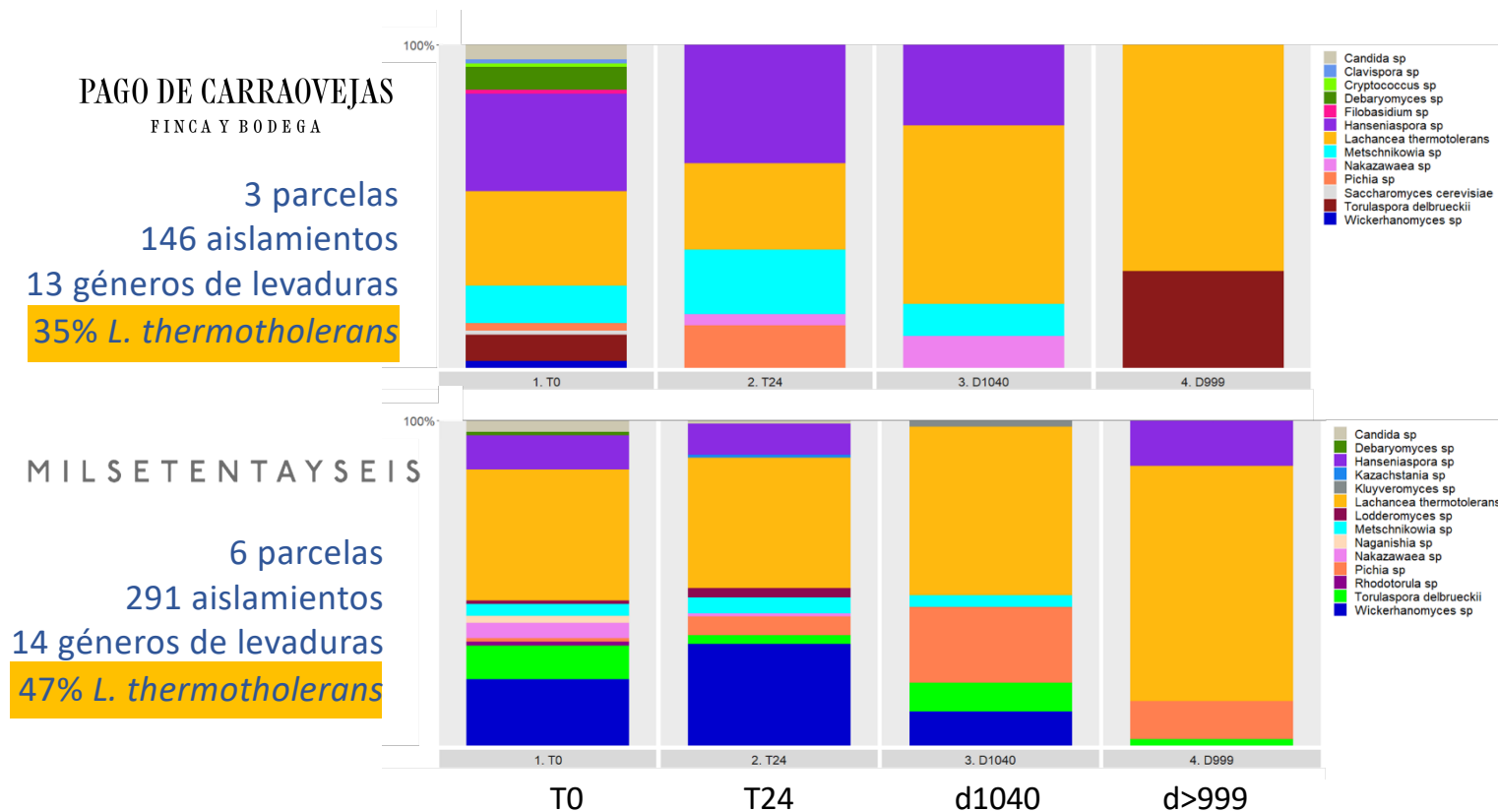
 HITO 1 LÍNEA TRONCAL

OBJETIVO 1



HITO 1 LÍNEA TRONCAL

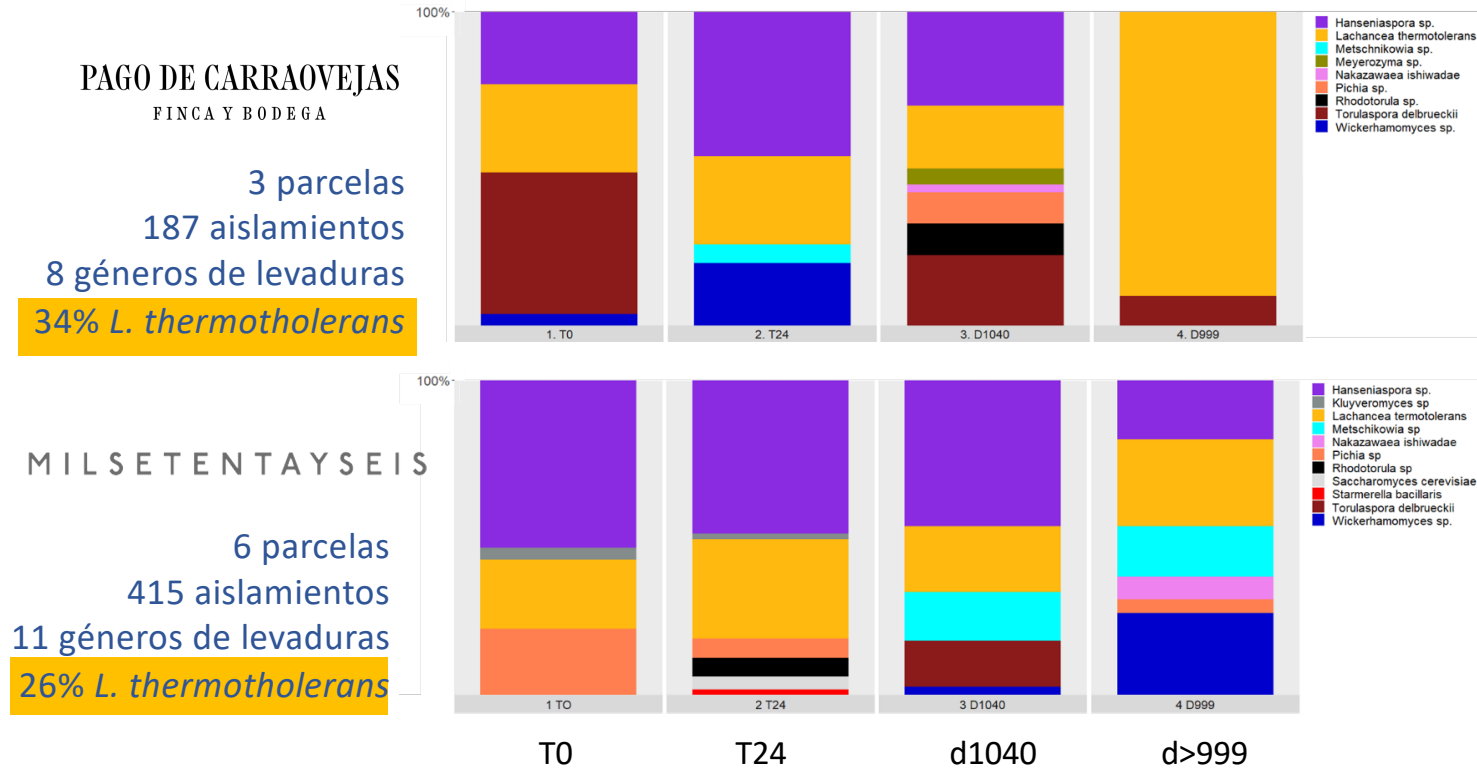
- Establecimiento de una colección de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.



Distribución de los aislamientos obtenidos durante la **vendimia 2020** según la etapa de fermentación.

HITO 1 LÍNEA TRONCAL

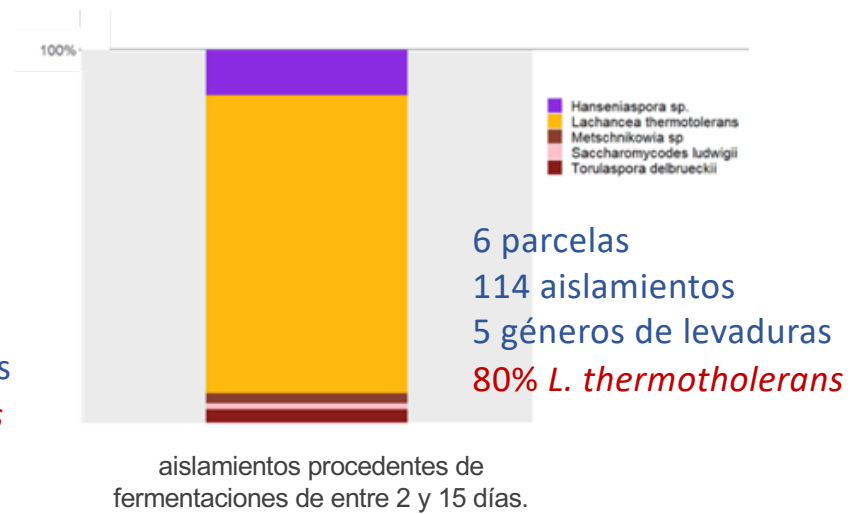
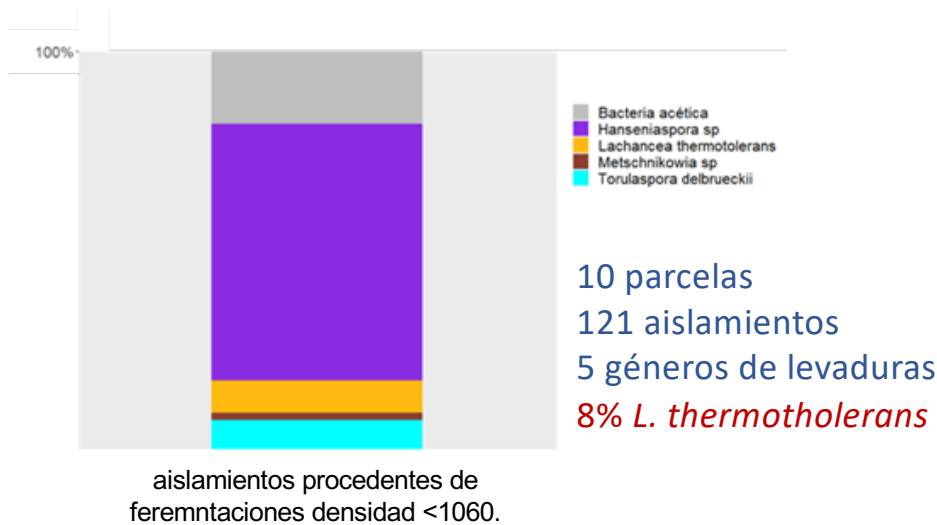
Establecimiento de una colección de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.



Distribución de los aislamientos obtenidos durante la **vendimia 2021** según la etapa de fermentación.

HITO 1 LÍNEA TRONCAL

- Establecimiento de una colección de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras *no-Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.



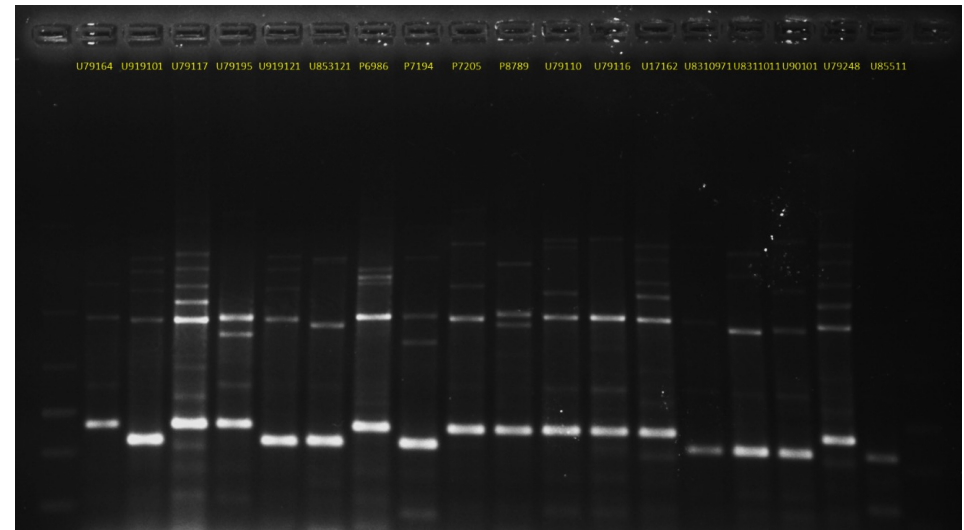
Distribución de los aislamientos obtenidos durante la **vendimia 2021** según la etapa de fermentación.

HITO 1 LÍNEA TRONCAL

- **Caracterización genotípica de los aislamientos de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras no-*Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.**

Genotipado de cepas de *Lachancea thermotolerans*

- Se ha implementado una técnica de tipado de las cepas basada en el empleo de 6 minisatélites diferentes dispersos en el genoma de *L. thermotolerans*.
- La amplificación de estos minisatélites se realiza mediante el empleo de la técnica de PCR multiplex y la posterior resolución de los amplicones obtenidos en geles de agarosa
- Especificidad a nivel de la especie *L. thermotolerans* y tiene un poder de resolución del 100%



Gel de electroforesis de ADN donde se muestran cepas de *L. thermotolerans* con diferente genotipo.

 HITO 1 LÍNEA TRONCAL 

- Caracterización genotípica de los aislamientos de cepas de *L. thermotolerans* y otras levaduras no-*Saccharomyces* de potencial interés por su papel en el metabolismo de los ácidos orgánicos.

Genotipado de *L. thermotolerans*

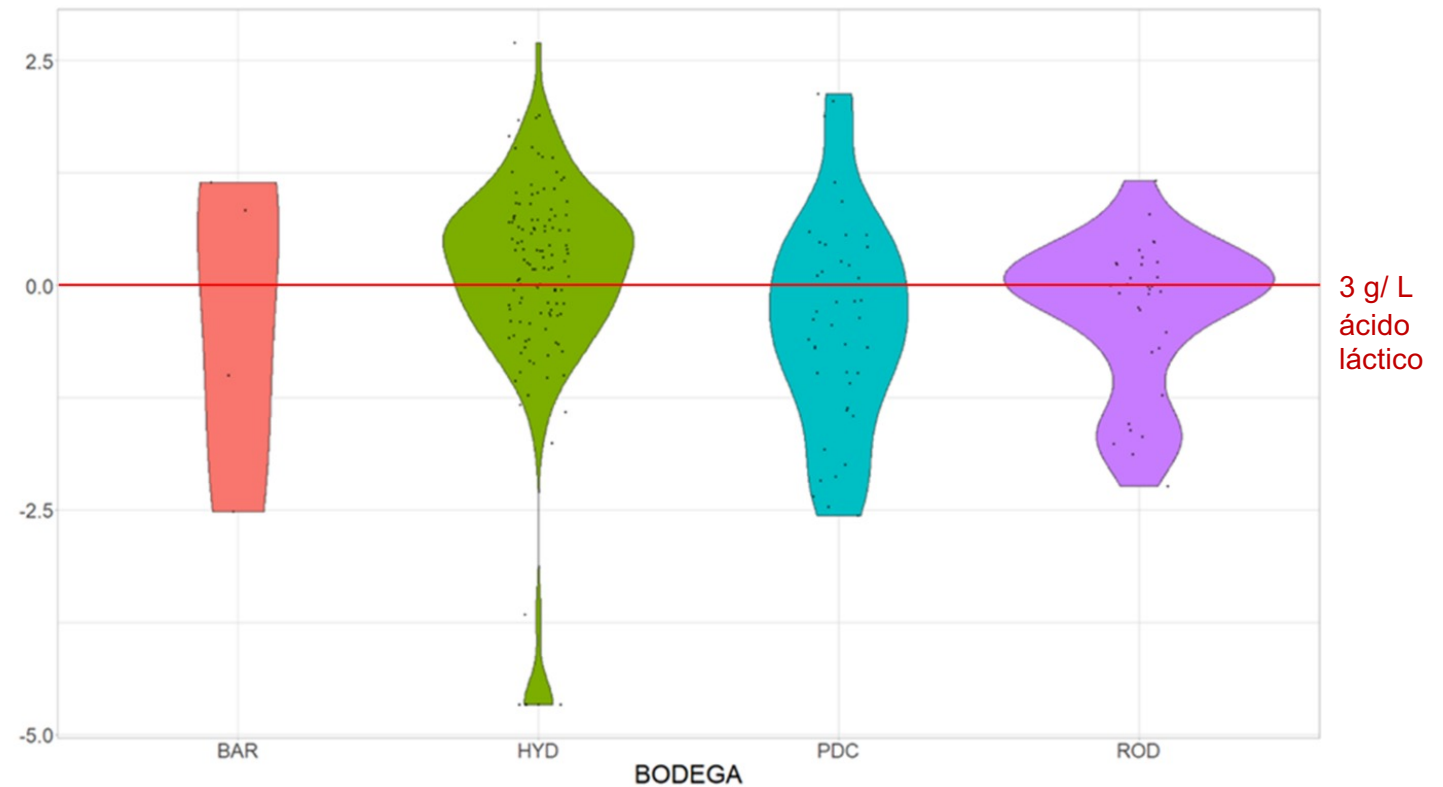
Bodega	Número de aislamientos de <i>L. thermotolerans</i>	Genotipos diferentes entre los aislamientos de <i>L. thermotolerans</i>
Pago de Carraovejas	63	41
Hoyada de los Lobos	194	106
Barbadillo	10	4
Roda	75	32



■ **Caracterización fenotípica de los aislamientos: producción de ácido láctico**

Se ha determinado la posición de cada cepa dentro del conjunto de las cepas estudiadas frente a la producción de ácido láctico y respecto al ratio de conversión de azúcares en ácido láctico

El mayor número de las cepas de *L. thermotolerans* aisladas se encuentran en torno a la producción de ácido láctico de 3 g/ L.



Distribución del valor normalizado de la producción de ácido láctico por las diferentes cepas de *L. thermotolerans* según bodega (BAR: Barbadillo; HYD: Hoyada de los Lobos; PDC: Pago de Carraovejas; ROD: Roda). La línea roja indica la media del conjunto.

 HITO 1 LÍNEA TRONCAL

CONCLUSIONES

1. Las características de pigmentación y crecimiento de *L. thermotolerans* permiten el aislamiento diferencial de esta especie empleando el medio de cultivo específico diseñado a tal fin por el grupo de investigación de la UCM.
2. La incidencia de *L. thermotolerans* en uva y en mosto es baja (0,5-10 %) siendo más elevada cuanto más avanzada se encuentra la fermentación (hasta el 75 %). Esta elevada incidencia se relaciona con una gran resistencia al etanol, superior a la estimada en otros estudios realizados previamente.
3. No se observa una pérdida significativa de diversidad de cepas conforme avanza el proceso de fermentación. Los genotipos encontrados se mantienen presentes, en general, a lo largo de todo el proceso fermentativo.
4. La diversidad genotípica y fenotípica de cepas de *L. thermotolerans* en mostos ha sido elevada. Existiendo una gran diversidad dentro de la especie, tanto en viñedos de una misma bodega como entre distintas bodegas y Denominaciones de Origen.
5. La diversidad intraespecífica de las cepas de *L. thermotolerans* aisladas se correlaciona con la alta diversidad fenotípica encontrada, obteniéndose valores muy dispares en la producción de ácido láctico.
6. La producción de ácido láctico en las cepas de *L. thermotolerans* se ajusta a una distribución normal en todas las bodegas estudiadas. No se aprecia una diferencia significativa en la producción de ácido láctico entre las cepas aisladas de las diferentes bodegas.



HITO 1 LÍNEA TRONCAL

DIFUSIÓN, PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y ACADÉMICA Y CONTRATOS LABORALES EN EL MARCO DEL PROYECTO

- **TESIS DOCTORALES**
 - Javier Vicente Sánchez. Caracterización molecular y funcional de levaduras no-*Saccharomyces* como herramientas para el control biológico de la acidez en vinos. Universidad Complutense de Madrid. 2021-actualidad
- **PRÁCTICAS CURRICULARES DE GRADO**
 - Lydia Rodrigo Burgos. Estudio de las poblaciones de levadura presentes en uva procedentes de diferentes regiones vitivinícolas de España. Grado en Biología. Universidad Complutense de Madrid. 2021-2022.
 - Paul Petrut Manea. Estudio funcional de cepas de colección de *Lachancea thermotolerans*. Grado en Biología. Universidad Complutense de Madrid. 2021-actualidad.
- **TRABAJOS FIN DE GRADO**
 - Lydia Rodrigo Burgos. Estudio de la diversidad y caracterización enológica de aislados de *Lachancea thermotolerans* para el manejo biológico de la acidez. Grado en Biología. Universidad Complutense de Madrid. 2021-actualidad.
- **COMUNICACIONES A CONGRESOS**
 - Javier Vicente, Santiago Benito, Javier Ruiz, Miguel de Celis, Sandra Tomasi, Eva Navascués, Ignacio Belda, Antonio Santos, Domingo Marquina. Caracterización genotípica y fenotípica de cepas de *Lachancea thermotolerans* para la evaluación de su potencial enológico. Poster. XXVIII Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología. Online. 28 de junio a 2 de julio de 2021.
- **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**
 - Vicente, J., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Benito, S (2021). An Integrative View of the Role of *Lachancea thermotolerans* in Wine Technology. *Foods*. 2021. 10, 2878. JCR Impact Factor (2020): Q2 (4.350; 37/143).
 - Vicente, J., Navascués, E., Benito, S., Marquina, D., Santos, A. (2022). *Lachancea thermotolerans* typing using Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for wine fermentations monitoring. En preparación.
 - Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Rauhut, D., Benito, S (2022). Biological management of acidity in wine technology: A review. En preparación.
- **CONTRATOS LABORALES EN EL MARCO DEL PROYECTO**
 - Javier Vicente Sánchez. Contrato de Personal de Apoyo a la Investigación -Investigador (PAI-I) en la convocatoria PAI154/21 de 15 de noviembre de 2021 de la Universidad Complutense de Madrid. En vigor a partir del 1 de febrero 2022.

LOWpH WINE

Muchas gracias

evanavascues@almacarraovejas.com

PAGO DE CARRAOVEJAS
FINCA Y BODEGA

BODEGAS  RODA

 **Atens**
nuestro fuerza está en la raíz.

 **AGROVIN**

 **BARBADILLO**
DESDE 1821

 **VITIS NAVARRA**
GENÉTICA Y PLANTAS DE VID

 **FERTINAGRO**
BIOTECH

MIL SETENTAY SEIS

 **CDTI**
MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN
@CDTIoficial