

# Improvement of fermentative yeasts *S. cerevisiae* by Non-GMO strategies for the reduction of urethanes in Sherry wines

Jesús Manuel Cantoral<sup>1</sup>, Marina Ruiz-Muñoz<sup>1</sup>, Sergio Martínez-Verdugo<sup>2</sup>, Fernando Pérez<sup>3</sup>, María Hernández Fernández<sup>1</sup> y Gustavo Cordero-Bueso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz, España

<sup>2</sup>Emilio Lustau S.A., Jerez de la Frontera, Cádiz, España

<sup>3</sup>Luis Caballero S.A., El Puerto de Santa María, Cádiz, España

**Abstract.** During alcoholic fermentation, the yeasts responsible for the process produce various metabolites, including urea. The reaction of urea with ethanol spontaneously generates ethyl carbamate in wine, a carcinogenic metabolite whose concentration needs to be regulated. Yeasts produce urea during the arginine metabolic pathway. For this purpose, adaptive evolution has been used by using a toxic analogue of l-arginine, l-canavanine, for selective pressure, once increasing the genetic variability of the population by sporulation and subsequent conjugation. Using this strategy, five putative variants of the parental yeast have been obtained and seem to have reduced urea production, thus being able to achieve a lower concentration of ethyl carbamate.

## 1 Introducción

Los carbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH<sub>2</sub>COOH). Más concretamente, el carbamato de etilo (etil carbamato o uretano, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OCONH<sub>2</sub>) se trata de un agente genotóxico probable carcinogénico en humanos (grupo 2A) según la Agencia Internacional del Cáncer (IARC) y se encuentra en concentraciones variables en comidas y bebidas fermentadas [1].

Hasta ahora se conocen cinco precursores del carbamato de etilo (urea, citrulina, carbamil fosfato, cianogeno y dietil pirocarbonato), siendo la urea el más importante [2]. La urea se acumula durante el catabolismo de la arginina, y es exportada al medio extracelular, donde se transforma en carbamato de etilo debido a una reacción entre el etanol presente en el vino y el grupo carbamil del ácido carbámico generado durante la fermentación alcohólica y su posterior almacenamiento o crianza [3]. Esta transformación se ve fuertemente favorecida con el aumento de la temperatura [4].

En el vino, el carbamato de etilo se suele encontrar en concentraciones significativas (0,01–0,025 mg/l), especialmente en aquellos que han estado sometidos a crianza biológica o a un largo periodo de almacenamiento. Debido al riesgo que supone para la salud de los consumidores, algunos países como Canadá, Estados Unidos o Brasil ya han establecido límites de concentraciones de carbamato de etilo en bebidas fermentadas, llegando a no poder superar una concentración de 0,015 mg/l [2]. De hecho, se prevé una próxima regulación por parte de la Unión Europea de los límites máximos de carbamato de etilo permitido en bebidas fermentadas.

La producción de vinos Sherry en el Marco de Jerez (Cádiz, España) comienza con la fermentación de mosto de la variedad de uva *Vitis vinifera* L. var. Palomino Fino, obteniendo lo que se conoce como “vino base”. Este se

alcoholiza hasta alcanzar un grado alcohólico de 15-15.5% (v/v) en el caso de que se vaya a someter a crianza biológica, o de 18% en caso de que se vaya a seguir crianza oxidativa [5]. En cualquier caso, es deseable que el vino base sea homogéneo y con una baja concentración de azúcar residual. Por ello, cada vez es más usual llevar a cabo fermentaciones industriales dirigidas, empleando para ello levaduras secas activas que aseguren el éxito del proceso.

Hay diversos estudios que han tratado de minimizar la producción de urea durante la fermentación alcohólica, y así, la formación de carbamato de etilo. Para ello, se han seguido distintas estrategias, incluyendo la deleición del gen *CARI*, que codifica para una arginasa [6,7] y la sobreexpresión de *DURI,2*, que codifica para la enzima amidoliasa encargada de degradar la urea [8,9]. Sin embargo, la mayoría de estas estrategias conllevan modificaciones genéticas en la levadura, con los problemas legislativos y legales que suponen [10].

Una alternativa que no implica modificaciones genéticas es el empleo de una presión selectiva sobre la población de levaduras, pudiendo así obtener y seleccionar variantes con el fenotipo deseado [11]. En el presente trabajo, se ha empleado como presión selectiva l-canavanina, un análogo tóxico de la l-arginina, para tratar de obtener variantes de la levadura parental con una menor producción de urea. Como paso previo a la aplicación de dicha presión selectiva, se aumentó la variabilidad genética de la población mediante la esporulación y posterior conjugación al azar de las esporas de la propia cepa parental.

## 2 Material y métodos

La levadura parental empleada en este trabajo fue la cepa comercial PDM (*Pasteur Prise de Mousse*, Vinifer), perteneciente a la especie *Saccharomyces bayanus*. Se trata de la levadura que se emplea a nivel industrial en el

Marco de Jerez para obtener el vino base a partir de mosto de la variedad de uva Palomino Fino.

En primer lugar, fue necesario establecer la concentración inhibitoria de l-canavanina para la cepa parental, determinando así la concentración necesaria para emplearla como presión selectiva. Dicho ensayo se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos de poliestireno con medio YNBA (YNB sin aminoácidos y sin sulfato de amonio 0,67%, Difco™, glucosa 2%) suplementado con diferentes concentraciones de l-canavanina (0, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120 y 150 mg/l). Los pocillos se inocularon con un pre-cultivo de la cepa parental a una densidad óptica a 600 nm de 0,1. La placa se introdujo en un lector de placas (Multiskan Go, Thermo Fischer Scientific™) a 28°C con agitación, realizando una medida de absorbancia cada hora durante 72 horas a 610 nm.

Para lograr la esporulación de la cepa parental, en primer lugar, se inoculó en medio de cultivo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) durante 48 horas a 28°C. Posteriormente, el cultivo en fase exponencial se sembró en césped en medio de esporulación (acetato potásico 1%, agar 2%), incubándose a 25°C en oscuridad durante 8 días. La estrategia de evolución adaptativa se llevó a cabo siguiendo el método previamente establecido [11] con modificaciones. Una vez comprobada la formación de ascosporas, estas se recogieron y se disgregaron empleando un protocolo estándar con enzima lítica. Posteriormente, las esporas se resuspendieron en 2 mL de medio YPD y se incubaron a temperatura ambiente hasta que se observó la conjugación de la mayoría de las esporas con un microscopio invertido (AE2000, MoticEurope S.L.U.). Una vez tuvo lugar la conjugación, se inocularon 50 µL de suspensión en tubos que contenían 5 mL de medio YNBA suplementado con la concentración de l-canavanina previamente determinada como inhibitoria y se incubaron a 28°C durante 5 días. De cada tubo en el que se observó crecimiento, se sembraron 100 µL en placas de YNBA suplementadas con la misma concentración de l-canavanina, incubándose a 28°C durante 5 días. De cada placa en la que se observó crecimiento, se aislaron las colonias puras y se conservaron a -20°C con glicerol al 40%.

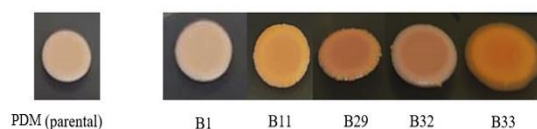
Para comprobar la producción de urea, las colonias aisladas, así como la cepa parental, se inocularon en medio YNBA suplementado con l-arginina al 1% y se incubaron a 28°C durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se tomó el sobrenadante y se cuantificó tanto la arginina como la urea presente empleando el kit de l-arginina/urea/amoniaco (Megazyme) y siguiendo las indicaciones del fabricante, empleando de nuevo el lector de placas y microplacas de 96 pocillos. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado, teniendo así réplicas tanto biológicas como técnicas. Los resultados se normalizaron con respecto a los valores de l-arginina y urea presente en el sobrenadante de la cepa parental.

### 3 Resultados y Discusión

De los 63 tubos de YNBA suplementado con l-canavanina que fueron inoculados con las esporas recién conjugadas, únicamente 19 presentaron crecimiento. Se sembraron en placas Petri con medio de cultivo YNBA sólido suplementado con 0,2 mg/ml de l-canavanina y, tras ser

incubadas durante 4 días a 28°C, sólo se observó crecimiento en nueve de ellas, de las que se aislaron un total de 160 colonias. Las colonias aisladas fueron posteriormente inoculadas en medio YPD líquido durante varias generaciones, con el fin de evitar fenotipos aberrantes que impidieran alcanzar el objetivo del trabajo (obtener variantes con una capacidad fermentativa al menos similar al de la levadura parental).

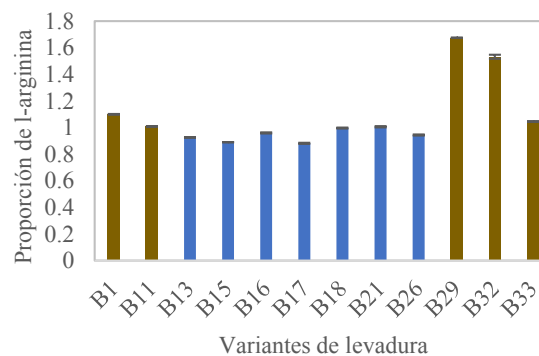
Curiosamente, las colonias aisladas presentaron fenotipos distintos en cultivo sólido (Fig. 1), encontrando colonias con coloración rosada y otras con coloración blanca, similar al de la levadura parental. Esta diferencia fenotípica podría indicar que se ha modificado alguna otra ruta más además de la de la arginina. También podría darse el caso de que las levaduras empleasen la excreción de pigmentos como mecanismo de defensa ante la presencia del tóxico y que, por ese motivo, se apreciase la tonalidad rosada. Algo similar ocurre con *Botrytis cinerea*, que sobreexpresa melanina como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés, como la irradiación con luz ultravioleta o la presencia de agentes oxidantes [12].



**Figura 1.** Colonias de las levaduras (tanto las variantes como la levadura parental, PDM) sembradas en medio YNBA.

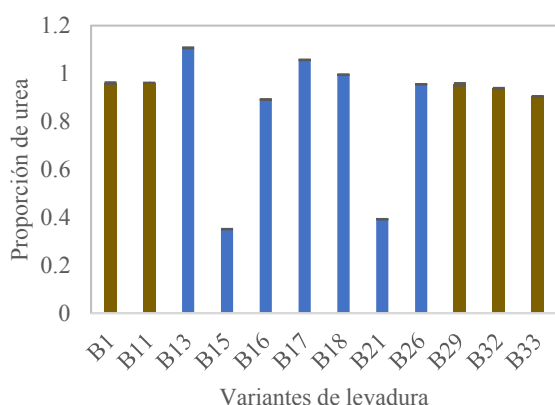
Finalmente, se aislaron un total de 56 colonias de levadura que fueron capaces de desarrollarse correctamente, las cuales fueron seleccionadas para llevar a cabo los ensayos posteriores.

La concentración de l-arginina encontrada en el sobrenadante indican que, de las variantes seleccionadas (Fig. 2), las denominadas como B1, B11, B29, B32 y B33 presentaron una concentración de l-arginina superior a la levadura parental. Si se ha logrado inactivar alguna de las permeasas de l-arginina de las levaduras, la concentración de urea debe ser menor respecto al control, debido a que incorpora menor cantidad de l-arginina al interior celular y, por tanto, la transformación de l-arginina en urea durante la ruta de la arginina mediante la acción de la arginasa será menor con respecto a la levadura parental.



**Figura 2.** Gráfico de barras en el que se representa la concentración de l-arginina de las variantes obtenidas normalizada respecto a la concentración presente en la levadura parental.

Además, las variantes de la levadura parental con una mayor concentración de l-arginina en el sobrenadante también mostraron una menor concentración de urea con respecto a la levadura parental (Fig. 2). Como se puede observar, las variantes B15 y B21 presentaron en su sobrenadante una concentración de urea menor con respecto a la de la levadura parental, a pesar de que la concentración de l-arginina era muy similar a la de la levadura parental. Esto puede ser debido a que, aunque no tengan inactiva ninguna de las permeasas de l-arginina, se haya producido alguna modificación en la ruta, específicamente en la reacción catalizada por la arginasa. Este hecho podría provocar que la l-arginina, en lugar de haberse convertido en urea y posteriormente haberse degradado en NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>, se hubiera transformado directamente en amoníaco y dióxido de carbono.



**Figura 3.** Gráfico de barras en el que se representa la concentración de urea producida por las variantes obtenidas normalizada respecto a la concentración presente en la levadura parental.

Teniendo todo esto en cuenta, se puede decir que, de las 160 colonias aisladas inicialmente, se han conseguido obtener cinco variantes de la levadura parental (concretamente, las denominadas como B1, B11, B29, B32 y B33) susceptibles de presentar alguna de las tres permeasas selectivas de l-arginina (o incluso las tres) inactivas.

Estos resultados preliminares son prometedores, por lo que actualmente se están llevando a cabo fermentaciones a escala de laboratorio tanto en mosto natural como sintético con las cinco variantes putativas para comprobar que su capacidad fermentativa es similar a la de la parental. Además, se están realizando ensayos de transcripción mediante PCR cuantitativa para poder determinar el nivel de expresión de dichas permeasas.

## Referencias

1. J. V. Weber, V.I. Sharypoy. *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*, 429-452 (2009)
2. P. Wu, X. Pan, L. Wang, X. Shen, D. Yang. *Food Control* **23**, 1 (2012)
3. K. G. Lee. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 5 (2013)
4. J. Xue, F. Fu, M. Liang, C. Zhao, D. Wang, Y. Wu. *South African J. Enol. Vitic.* **36**, 2 (2015)
5. G. Cordero-bueso, M. Ruiz-Muñoz, M. González-Moreno, S. Chirino, M. C. Bernal-Grande, J. M. Cantoral, *Fermentation* **4**, 1 (2018)
6. Y. W. Chin, W. K. Kang, H. W. Jang, T. L. Turner, H. J. Kim. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **43**, 11 (2016)
7. Vigentini, M. Gebbia, A. Belotti, R. Foschino, F. P. Roth. *Front. Microbiol.* **8** (2017)
8. J. Coulon, J. I. Husnik, D. L. Inglis, G. K. van der Merwe, A. Lonvaud, D.J. Erasmus, H. J. van Vuuren. **57**, 2 (2006)
9. D. Wu, X. Li, J. Lu, J. Chen, G. Xie, L. Zhang. *J. Inst. Brew.* **122**, 3 (2016)
10. E. Pursey, D. Sünderhauf, W. H. Gaze, E. R. Westra, S. van Houte. *PLoS Pathog.* **14** (2018)
11. L. De Vero, L. Solieri, P. Giudici. *Lett. Appl. Microbiol.* **53**, 5 (2011)
12. Q. Yang, Y. Chen, Z. Ma. *Fungal Genet. Biol.* **50** (2013)