

ORIGINAL

Incremento de la ploidía como estrategia para mejorar la eficacia fermentativa de *Torulaspota delbrueckii*

Alberto Martínez^{1*}, Felipe Molina², María Luz Álvarez³, Luis Miguel Hernández¹ y Manuel Ramírez¹

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s/n, 06006 Badajoz, España.

² Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética (Área de Genética), Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s/n., 06006 Badajoz, España.

³ Estación Enológica, Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, Junta de Extremadura, 06200 Almendralejo, España.

Recibido 16 de octubre de 2025 / Aceptado 21 de enero de 2026 / Publicado 1 de mayo de 2026

Resumen

El ciclo de vida de la mayoría de las levaduras no-conventionales, como *Torulaspota delbrueckii* (*Td*), no está tan bien caracterizado como el de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Generalmente se asume que *Td* es principalmente haploide, lo que se ha postulado como un factor que reduce su eficacia fermentativa en comparación con las estirpes diploides de *Sc*. El análisis del ciclo de vida de varias estirpes vínicas *Td* indica que son predominantemente diploides durante la fase de crecimiento exponencial en medio rico. Sin embargo, la mayoría de las células se vuelven haploides al dejar de crecer y entrar en la fase estacionaria. Cuando se transfieren a medios deficientes en nutrientes, estas células haploides se vuelven pleomórficas, aumentan de tamaño y pasan a estados diploides o poliploides. Este aumento de ploidía, que se deriva primariamente de mitosis supernumerarias sin la posterior citocinesis, es seguido por la esporulación.

Se observó una respuesta similar en levaduras que se mantienen viables durante la segunda fermentación del vino base para la elaboración de cava, así como durante el crecimiento en mosto sintético suplementado con etanol. Es crucial destacar que esta respuesta no se observó en levaduras *Sc* en ninguna de las condiciones experimentales mencionadas, lo que sugiere que se trata de una adaptación específica de *Td* a las condiciones estresantes de fermentación.

Esta adaptabilidad podría ser el mecanismo que permite a las levaduras *Td* permanecer viables y metabólicamente activas durante períodos más largos en la fermentación vínica. En consecuencia, hemos diseñado y evaluado procedimientos destinados a inducir el aumento del tamaño celular y la ploidía de estirpes haploides *Td*. Los inóculos *Td* con ploidía aumentada mostraron una mejo-

ra significativa en la eficacia fermentativa en comparación con los inóculos haploides de las mismas estirpes.

Palabras clave

Torulaspota delbrueckii, ciclo de vida, ploidía, eficacia fermentativa, vinificación.

Abstract

The life cycle of most non-conventional yeasts, such as *Torulaspota delbrueckii* (*Td*), is not as well characterized as that of *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). It is generally assumed that *Td* is primarily haploid, which has been postulated as a factor that reduces its fermentative efficiency compared to diploid *Sc* strains. Analysis of the life cycle of several *Td* wine strains indicates that they are predominantly diploid during exponential growth phase in rich medium. However, most cells become haploid upon cessation of growth and entry the stationary phase. When transferred to nutrient-deficient media, these haploid cells become pleomorphic, increase in size, and transition to diploid or polyploid states. This increase in ploidy, that mainly results from supernumerary mitosis without subsequent cytokinesis, is followed by sporulation.

A similar response was observed in yeasts that remained alive during the second fermentation of base wine for cava production, or during growth in ethanol-supplemented synthetic must. It is crucial to note that this response was not observed in the *Sc* yeast populations under any of the experimental conditions mentioned, suggesting that it represents a specific adaptation of *Td* to the stressful conditions of fermentation.

This adaptability could be the mechanism that allows *Td* yeasts to remain viable and metabolically active for lon-

ger periods during wine fermentation. Consequently, we have designed and evaluated procedures aimed at inducing increased cell size and ploidy of haploid *Td* strains. *Td* inocula with increased ploidy exhibited a significant improvement in fermentative efficiency compared to the haploid inocula of the same strains.

Keywords

Torulaspota delbrueckii, life cycle, ploidy, fermentation efficiency, wine making.

Introducción

La levadura *Torulaspota delbrueckii* (*Td*) está despertando un creciente interés como cultivo iniciador en la elaboración de vinos, debido a su demostrada capacidad para mejorar la complejidad del perfil aromático del vino y reducir la acidez volátil. Sin embargo, su menor rendimiento fermentativo y tamaño celular en comparación con *Sc* condicionan su uso a escala industrial. Para superar estas restricciones, se han implementado diversos enfoques de mejora genética, que incluyen la selección de mutantes espontáneos resistentes a condiciones de estrés y la obtención de estirpes panaderas diploides. Así se ha logrado incrementar tanto su eficacia fermentativa como su viabilidad. Asimismo, se han explorado estrategias de hibridación interespecífica entre *Td* y *Sc*, obteniéndose clones con propiedades enológicas mejoradas y suficiente estabilidad genética para aplicaciones comerciales. La investigación reciente sobre la ploidía y el ciclo de vida de *Td* revela comportamientos reproductivos complejos y dinámicos en respuesta a condiciones de estrés, como las encontradas durante la fermentación.

Estos mecanismos biológicos pueden ser aprovechados estratégicamente para optimizar las aplicaciones enológicas de la levadura. Todos estos avances amplían significativamente las posibilidades de uso de *Td* en la industria vitivinícola, ofreciendo un potencial diferenciador para el desarrollo de vinos con características sensoriales únicas y controladas.

Materiales y métodos

Se emplearon diversas estirpes de *Td* y *Sc*, incluyendo estirpes comerciales de referencia, mutantes espontáneos seleccionados y clones hibridados interespecíficos. Las estirpes *Td*, caracterizadas por su baja capacidad para fermentar maltosa, fueron analizadas para su resistencia a estrés (SO_2 , etanol, alta presión de CO_2), actividad *killer*, producción de H_2S y capacidad de esporulación.

Para el cultivo y la propagación, se emplearon medios estándares como YEPD y Extracto de Malta. Para inducir la esporulación se utilizó medio específico SPO. Los ensayos de fermentación se realizaron en mosto sintético (220 g/L azúcares reductores totales, 200 mg/L de nitrógeno asimilable) y en vino base sintético con 8–9 % (v/v) de etanol, ajustado a pH 3.1.

La cinética de fermentación se monitorizó midiendo periódicamente los grados Brix. Asimismo, se determinaron la viabilidad celular (método azul de metileno) y la proporción de las levaduras inoculadas mediante marcadores genéticos, como resistencia a cicloheximida (cyh^R) y el análisis de restricción de ADN mitocondrial.

El análisis de la distribución de los distintos tipos de células durante el ciclo celular y el nivel de ploidía se realizó mediante citometría de flujo y microscopía confocal, previa

Análisis - Innovación - Tradición

Desde 1933, al servicio de la excelencia enológica

Acreditados por ENAC desde 1999. La acreditación garantiza la competencia técnica, el cumplimiento de normas internacionales y reconocimiento de los resultados a nivel nacional e internacional.

Con más de 90 años de experiencia somos referencia en análisis de vinos, bebidas espirituosas y vinagres.

- ✓ Análisis físico-químico y microbiológico.
- ✓ Control de calidad y asesoramiento técnico.
- ✓ Estudios de estabilidad y envejecimiento.
- ✓ Especialistas en extractos naturales y aromas.



M.REAL
LABORATORIO ENOLÓGICO DESDE 1933



C/ Armas de Santiago, 17. Jerez de la Fra.
956 185 171 | contacto@laboratoriomreal.com
@laboratoriomreal | laboratoriomreal.com

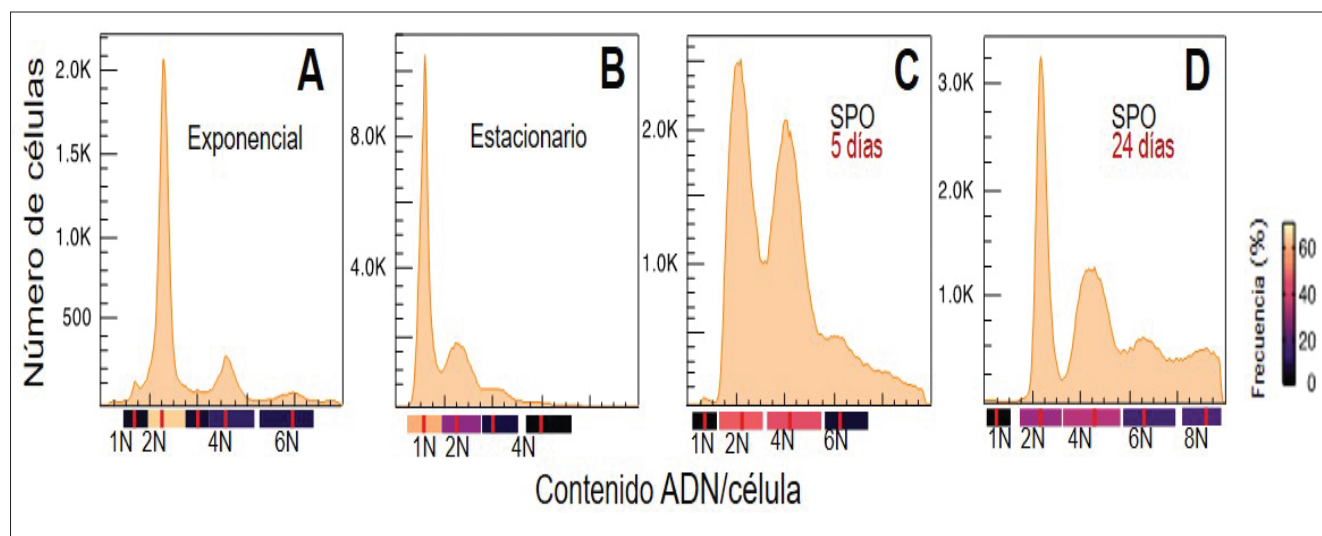


Figura 1. Histogramas de ADN por célula para *Td* EX1180. La ploidía se determinó mediante citometría de flujo, midiendo el contenido de ADN por célula (N corresponde a células haploides). El eje Y representa el número de células (recuento). **A)** Fase Exponencial: Células de un cultivo exponencial en medio YEPD (caldo) a 30° C durante la noche. Predominio de células diploides. **B)** Fase Estacionaria: Células cosechadas tras alcanzar la fase estacionaria en medio YEPD. Se observa una transición y predominio de células (haploides). **C)** Esporulación (5 días): Células de la fase estacionaria transferidas a medio de esporulación (SPO) e incubadas durante 5 días. Se aprecia un incremento en la ploidía, con aparición de poblaciones principalmente diploides y tetraploides. **D)** Esporulación (24 días): Células de la fase estacionaria transferidas a medio de esporulación (SPO) e incubadas durante 24 días. Se observa una mayor poliploidía, con picos evidentes de hasta 8N. El contenido de ADN (ploidía) se determina utilizando la moda (pico principal) de las poblaciones (líneas rojas), y la frecuencia relativa de las regiones de interés (porcentaje de células) se indica mediante las barras de colores en el eje horizontal inferior.

tinción nuclear. Para confirmar la identidad genética de las distintas estirpes se secuenciaron las regiones ITS del ADN ribosomal. La combinación de estas herramientas moleculares con la caracterización fenotípica y fermentativa permitió la evaluación integral del potencial enológico y biotecnológico de las estirpes de *Td* estudiadas.

Resultados y discusión

1. Ploidía de *Td* durante el crecimiento vegetativo y la esporulación

El análisis de citometría de flujo reveló una dinámica de la ploidía dependiente de la fase de crecimiento en (*Td*). Durante la fase de crecimiento exponencial en medio YEPD, la mayoría de las células de la estirpe de referencia *Td* EX1180 presentaron un estado diploide (2N), con una fracción menor de células tetraploides (4N) y hexaploides (6N), mientras que las poblaciones haploides (1N) fueron prácticamente indetectables. Al alcanzar la fase estacionaria, la mayoría de las células transitaron al estado haploide (1N), aunque se mantuvieron algunas células diploides (2N) y triploides (3N) residuales. Este comportamiento de transición (2N a 1N) se repitió en las 19 estirpes analizadas, siendo el estado haploide final comparable al observado en estirpes haploides de *Sc* (Figuras 1A y B).

Al transferir las células de *Td* a medio de esporulación, las estirpes silvestres mostraron un incremento progresivo en la ploidía, con desaparición casi total de células haploides y aparición de células hexaploides (6N) y octaploides (8N) (Figuras 1C y D). Paralelamente, se identificaron células de gran tamaño con morfologías inusuales tales como tubos de conjugación y estructuras en forma de coronas de yemas (“Kronenbildung”) (Figuras 2B, C y G), ausentes en estirpes diploides de *Sc*. La estrecha relación entre la ploidía aumentada y el ciclo reproductivo se confirmó con la estirpe deficiente en esporulación, *Td* SpoDef9, la cual no mostró aumento en la ploidía. Este resultado sugiere una relación directa entre el potencial de esporulación y la capacidad de transición a estados de ploidía aumentada como respuesta al estrés nutricional. Los resultados descritos demuestran que ciertas condiciones de estrés (como la limitación de nutrientes, el etanol o el frío) inducen transiciones estables a estados diploides o poliploides, revelando una flexibilidad de ploidía clave para su adaptación.

2. Efecto del estrés fermentativo y de las condiciones de almacenamiento sobre la ploidía de ‘*Td*’

Durante la segunda fermentación de vino base sintético (simulando la elaboración de cava y espumosos), las pobla-

Alberto Martínez, Felipe Molina, María Luz Álvarez, Luis Miguel Hernández, Manuel Ramírez

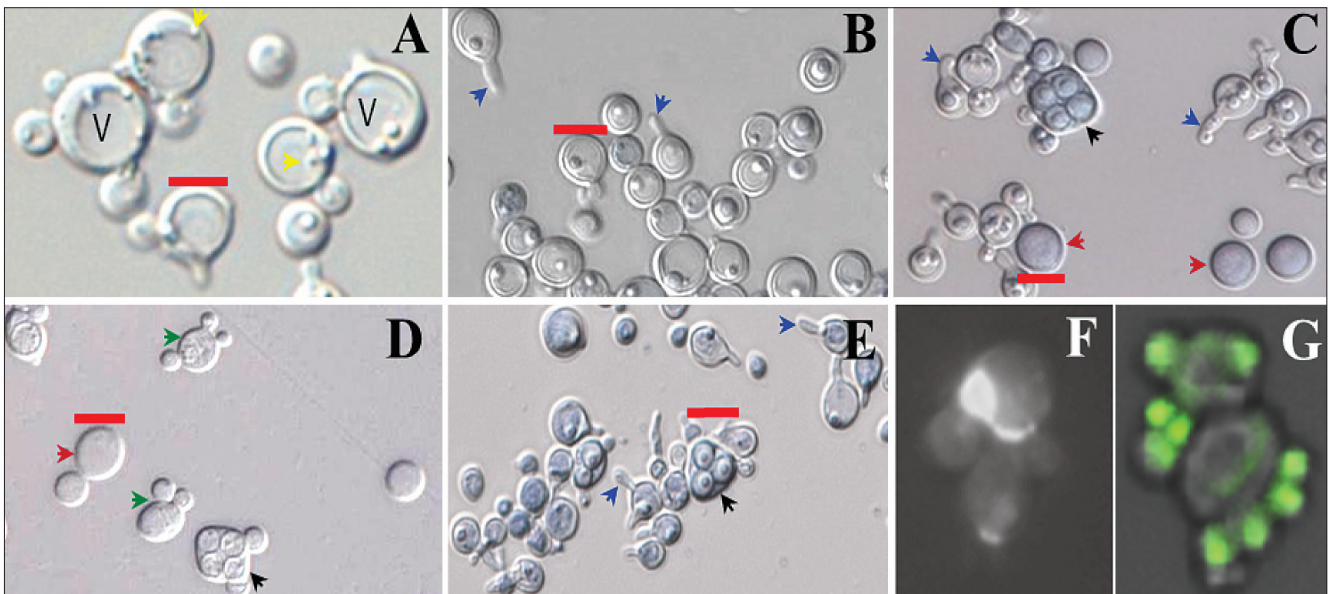


Figura 2. Microfotografías de levaduras *Td* cultivadas y/o almacenadas en diferentes condiciones ambientales: Después de 6 días de crecimiento en caldo YEPD a 30° C (A) 15 días de crecimiento en placa de agar Extracto de Malta a 15° C (B) 4 días de crecimiento en caldo YEPD a 30 °C seguido de 5 días de incubación en placa de agar SPO a 20° C (C) 4 días de crecimiento en caldo YEPD a 30° C seguido de 7 días de incubación en caldo SPO a 20° C (D) y 30 días de crecimiento en placa de agar YEPD a temperatura ambiente (E) Las flechas negras indican ascas que contienen esporas, las flechas rojas son células grandes y opacas, las flechas verdes son células con corona de yemas, las flechas azules son posibles tubos de conjugación, y las flechas amarillas son autofagosomas. V, vacuola (F) (tinción con DAPI) (G) (tinción con SYBR Green) son detalles de levaduras con mitosis supernumerarias. Las barras de escala rojas corresponden a 5 µm.

ciones de *Td* mostraron un aumento notable en la frecuencia de células pleomórficas de gran tamaño. Este patrón morfológico se reprodujo en condiciones simuladas de estrés fermentativo (mosto sintético con etanol al 5 %). El contenido de ADN de estas células se confirmó cuantitativamente mediante citometría de flujo, estableciendo una correlación entre el estrés alcohólico y la poliploidía inducida. Se evaluaron diversas condiciones de cultivo y almacenamiento con el fin de generar inóculos de *Td* con mayor tama-

ño celular y ploidía estable buscando un protocolo industrialmente viable. Entre las respuestas celulares se incluyen: autofagia, evidenciada por la presencia de autofagosomas y vacuolas de gran tamaño (Figura 2A); acumulación de lípidos, formación de proyecciones de apareamiento y esporulación incipiente (Figura 2B), observación de aparentes tubos conjugativos y esporulación final (Figuras 2C, D y E), y ploidía inducida con la presencia de células con mitosis supernumerarias sin citocinesis (Figuras 2F y G).



Fotografía: Dirk Wohlrabe (Pixabay).

Incremento de la ploidía como estrategia para mejorar la eficacia fermentativa de 'Torulaspora delbrueckii'

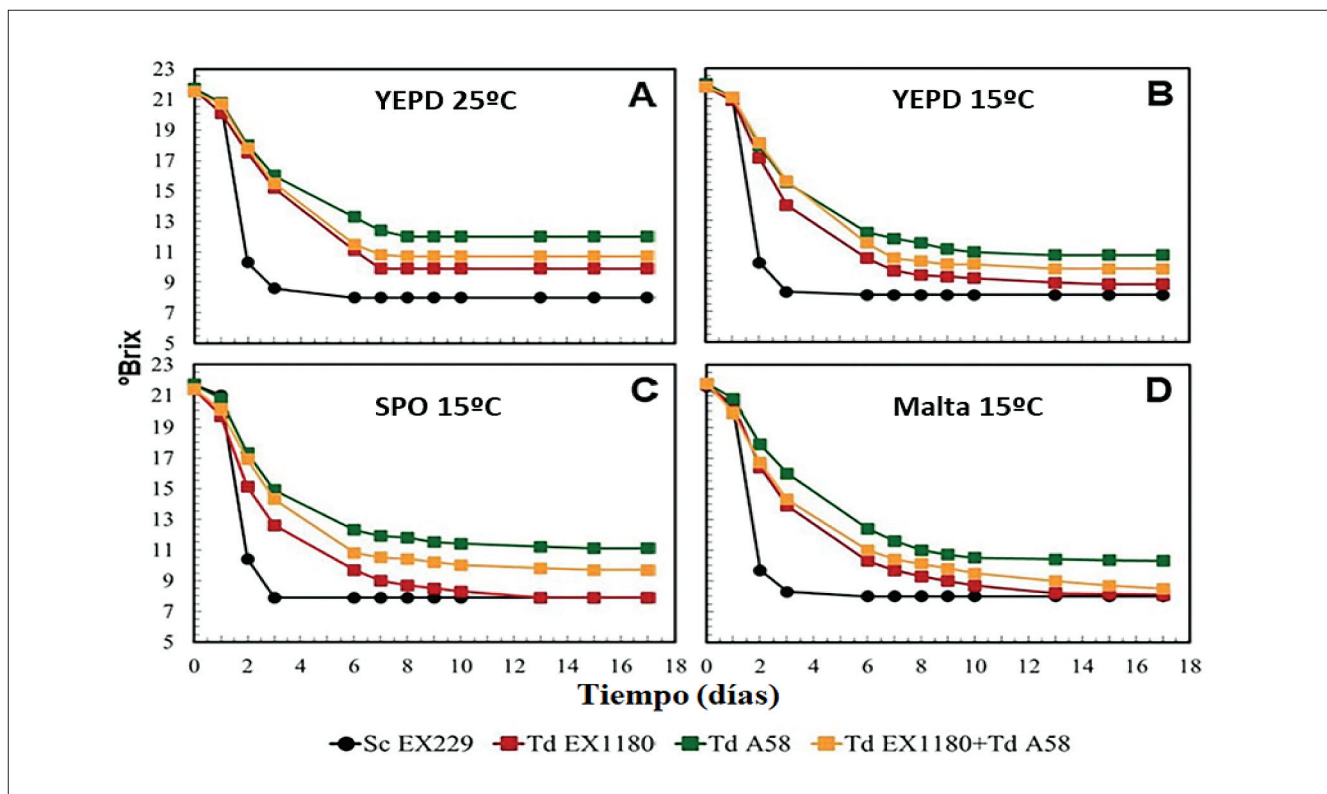


Figura 3. Cinéticas de fermentación de mosto sintético inoculado con cultivos de levadura crecidos con agitación durante 4 días en YEPD a 30°C seguido de almacenamiento sin agitación durante 4 días a 25°C (A) o 15°C (B), transferido a caldo SPO y almacenado sin agitación durante 4 días a 15°C (C), o transferido a caldo de extracto de malta y almacenado sin agitación durante 4 días a 15°C (D).

Las condiciones que resultaron más efectivas para inducir células con ploidía aumentada fueron: inóculos de *Td* cultivados durante 4 días en caldo YEPD a 30°C, seguidos de transferencia a caldo SPO o extracto de malta al 1,7% y almacenamiento a 15°C (*Td*-SPO o *Td*-Malta respectivamente).

3. Efecto de los inóculos de *Td* con ploidía aumentada sobre la fermentación de mosto y vino base sintético

En mosto sintético las poblaciones de *Td*-SPO y *Td*-Malta dominaron todas las fermentaciones y mejoraron significativamente la cinética fermentativa en comparación con los controles (cultivos almacenados en YEPD) (Figuras 3A y B). La eficacia fermentativa en mosto sintético de las levaduras *Td* fue notablemente superior cuando el tratamiento del inóculo fue de cuatro días a 15°C (Figura 3B) comparado con el tratamiento a 25°C (Figura 3A). En la estirpe de referencia *Td* EX1180, el rendimiento fermentativo de los inóculos *Td*-SPO (Figura 3C) y *Td*-Malta (Figura 3D) fue capaz de igualar al de la estirpe control *Sc*. Este resultado destaca la capacidad de la poliploidía inducida para superar una de las principales limitaciones de *Td*, fermentación deficiente respecto a *Sc*.

En las condiciones más exigentes del vino base sintético (8-9% etanol), ningún inóculo de *Td* fue tan eficiente como la levadura control *Sc*, y no hubo mejora de la eficacia fermentativa de *Td* con los inóculos *Td*-YEPD a 15°C (Figura 4B) frente a 25°C (Figura 4A). Sin embargo, en comparación con sus propios controles, los inóculos *Td*-SPO (Figura 4C) y *Td*-Malta (Figura 4D) superaron consistentemente la eficacia fermentativa de los inóculos del control *Td*-YEPD.

La viabilidad celular se identificó como un factor clave, ya que el porcentaje de células muertas fue significativamente menor en los inóculos *Td*-SPO y *Td*-Malta en comparación con los inóculos del control *Td*-YEPD. Esta correlación directa entre viabilidad y eficiencia fermentativa es crítica, demostrando que los inóculos de ploidía aumentada mantienen una mejor integridad celular bajo estrés y tendieron a completar la fermentación en plazos aceptables.

La implementación de este protocolo podría optimizar procesos como la segunda fermentación de vinos espumosos o la fermentación de mostos de alto grado, reduciendo la necesidad de etapas de adaptación previa o coinoculación con *Sc*.

Alberto Martínez, Felipe Molina, María Luz Álvarez, Luis Miguel Hernández, Manuel Ramírez

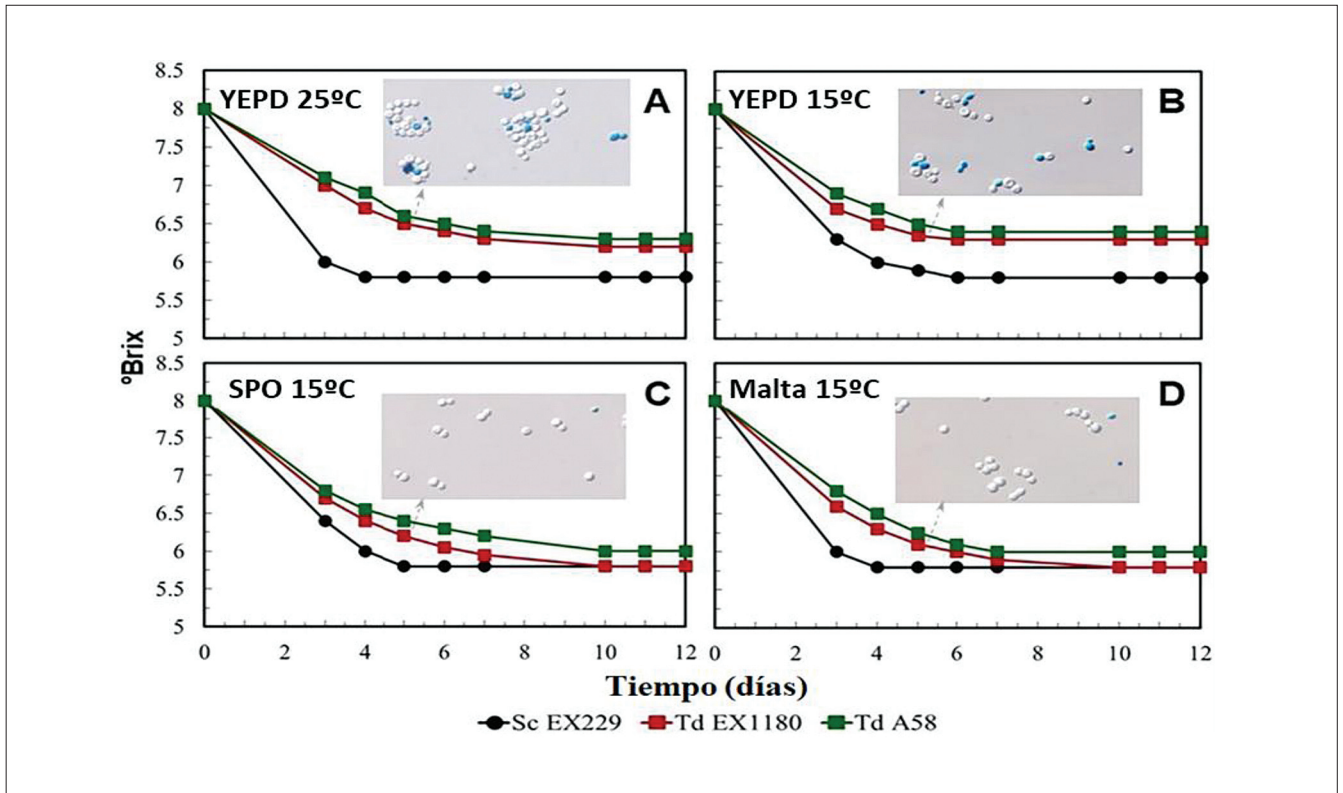


Figura 4. Cinética de fermentación de vino base sintético (8 % etanol) inoculado con cultivos de levadura cultivados con agitación durante 4 días en YEPD a 30 °C seguidos de almacenamiento sin agitación durante 4 días a 25 °C (A) o 15 °C (B), transferido a caldo SPO y almacenado sin agitación durante 4 días a 15 °C (C), o transferido a caldo de extracto de malta y almacenado sin agitación durante 4 días a 15 °C (D). Las fotografías adjuntas corresponden a la tinción con azul de metileno de las levaduras del día 5 de las fermentaciones inoculadas con Td EX1180.

INNOTEC
LABORATORIOS



2014-2024

Si lo analizas bien, una década se pasa rápido.



- ✓ Laboratorio enológico oficial para tus liquidaciones y certificados de exportación.
- ✓ Análisis de control en uvas, mostos y vinos.
- ✓ Servicio de recogida de muestras

PRECIO | CALIDAD | EFICACIA



www.innotec-laboratorios.es C/ De la Paz, nº1. Bajo. 02200 Casas Ibáñez. Albacete. Tlf.: 967 46 20 87

*Incremento de la ploidía como estrategia para mejorar la eficacia fermentativa de 'Torulaspora delbrueckii'***Conclusiones**

Las poblaciones de *T. delbrueckii* exhiben una notable flexibilidad de ploidía. Si bien predominan las células haploides (1N) en fase estacionaria, el estrés fermentativo induce la formación de células pleomórficas con un aumento significativo en tamaño y ploidía. Este mecanismo se confirma como una estrategia adaptativa biológica clave para mejorar la resistencia y la supervivencia de *Td* en el entorno enológico.

El uso de inóculos de *Td* con ploidía aumentada, generados bajo condiciones controladas (*Td*-SPO y *Td*-Malta), mejoró significativamente la cinética fermentativa tanto en mosto sintético como en vino base sintético. En mosto, esta mejora permitió a la estirpe *Td* EX1180 igualar el rendimiento de las estirpes de referencia de *Sc*. Estos hallazgos demuestran que la inducción transitoria de poliploidía en *Td* es una estrategia biotecnológica robusta para la mejora de inóculos de estirpes vínicas. No solo favorece la dominancia y eficiencia de *Td* en fermentaciones de vinos tranquilos y espumosos, sino que el aumento del tamaño celular asociado, podría ofrecer beneficios adicionales, como la optimización de los procesos de filtrado y deshidratación del inóculo a escala industrial.

Agradecimientos

Trabajo financiado por las subvenciones GR21062, IB16132 e IB20069 de la Junta de Extremadura, AGL2017-87635-R de MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (cofinanciada por FEDER Una forma de hacer Europa) y GR24105 de la Junta de Extremadura (85 % de la Unión Europea, Fondo de Desarrollo Regional y Junta de Extremadura. Ministerio de Hacienda).

Bibliografía

1. Brimacombe, C.A., Sierocinski, T., Dahabieh, M.S. A white-to-opaque-like phenotypic switch in the yeast *Torulaspora microellipsoides*. *Commun. Biol.* 2020. 3 (1), 86.
2. Comaj, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 2005. 6 (11), 836–846.

3. Crandall, J.G., Fisher, K.J., Sato, T.K., Hittinger, C.T. An adaptive interaction between cell type and metabolism drives ploidy evolution in a wild yeast. *bioRxiv.* 2022. 11.

4. Fortuna, M., Sousa, M.J., Côrte-Real, M., Leão, C., Salvador, A., Sansonetty, F. Cell cycle analysis of yeasts. *Curr. Protoc. Cytom.* 2001. 13(1), 11-13.

5. Hernández-López, M.J., Pallotti, C., Andreu, P., Aguilera, J., Prieto, J.A., Rande-Gil, F. Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. 116 (1), 103–110.

6. Martínez, A., Zamora, E., Álvarez, M.L., Bautista-Gallego, J., Ramírez, M. Genetic improvement of non-conventional *Torulaspora delbrueckii* for traditional sparkling winemaking by mixing for eventual hybridization with *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2022. 13, 1006978.

7. Martínez, A., Molina, F., Hernández, L. M., Ramírez, M. Improving wine fermentation efficiency of *Torulaspora delbrueckii* by increasing the ploidy of yeast inocula. *International Journal of Food Microbiology.* 2024. 425, 110894.

8. Ramírez, M., Pérez, F., Regodón, J.A. A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. 64, 5039–5041.

9. Ramírez, M., Vinagre, A., Ambrona, J., Molina, F., Maqueda, M., Rebollo, J.E. Genetic instability of heterozygous, hybrid, natural wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. 70 (8), 4686–4691.

10. Velázquez, R., Martínez, A., Zamora, E., Álvarez, M.L., Bautista-Gallego, J., Hernández, L.M., Ramírez, M. Genetic improvement of *Torulaspora delbrueckii* for wine fermentation: eliminating recessive growth-retarding alleles and obtaining new mutants resistant to SO₂, ethanol, and high CO₂ pressure. *Microorganisms.* 2020. 8 (9), 1372.



Fotografía: (Pixabay).