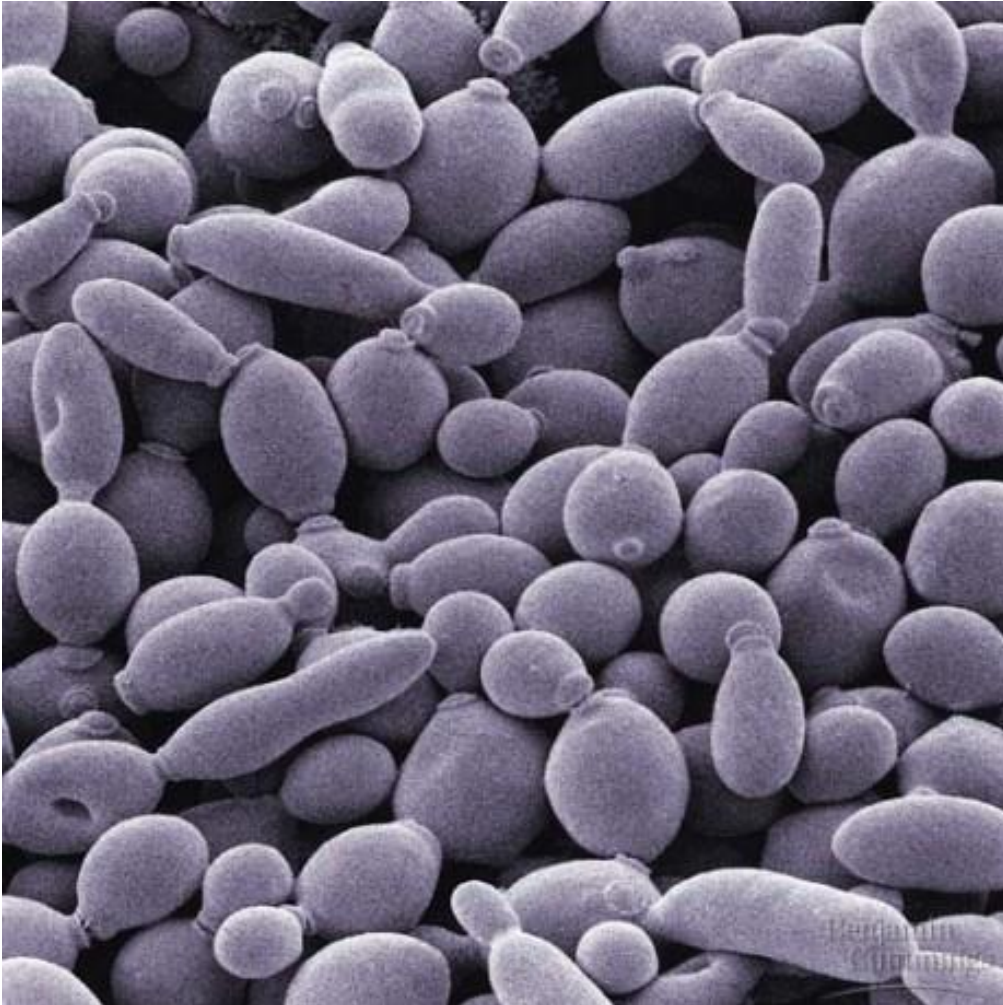


Biotecnología del vi:
Saccharomyces cerevisiae



Adrián Albesa Martín

Index

1. Introducció

2. *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 Fermentació alcohòlica

2.2 Genoma

2.3 Reproducció

3. Mètodes de modificació genètica

3.1 Millora genètica

3.2 Mutagènesis

3.3 Hibridació

3.4 Fusió de protoplasts

3.5 Enginyeria Genètica

4. Aplicacions en el vi

4.1 Millora del rendiment de la fermentació

4.2 Millora tecnològica

4.3 Millora del sabor del vi

4.4 Millora de la salubritat del vi

5. Normativa OGM

6. Conclusions

7. Bibliografia

1.Introducció

Es tenen notícies del descobriment del vi fet pels egipcis i fenicis fa uns 5000 anys a.C obtingut de la fermentació del suc extret del raïm. En el 1850 Louis Pasteur va descobrir que la fermentació alcohòlica del vi es produïda pel llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Actualment es sap que és molt important en la indústria alimentària perquè produeix molts tipus d'aliments fermentats com la cervesa i el pa. Les característiques organolèptiques finals són produïdes principalment per acció del llevat amb la formació de compostos a partir del most, per tant, és important fer una bona selecció del llevat que interessi a cada indústria. Des de fa uns anys s'ha introduït el terme d'enginyeria genètica en l'enologia per modificar certs gens del llevat per tal de millorar les propietats finals del vi com per obtenir millor manipulació i control de la fermentació gràcies a la propietats tecnològiques del llevat. En aquest treball explicaré la fisiologia, reproducció i genoma del llevat juntament amb les tècniques utilitzades per manipulació genètica i les aplicacions en la indústria del vi. Cada cop el mercat és més exigent per tant les empreses exigeixen més perfecció en el vi. Aquests llevats són modificats genèticament com la resta d'OMG, un tema molt parlat en la actualitat amb una mala visió d'aquests socialment i amb uns reglaments molt restrictius sobretot a la Unió Europea.

2. Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae és un llevat, unicel·lular i eucariota utilitzat en la fermentació alcohòlica del vi, cervesa i pa. Té una forma el·lipsoïdal.

Com a font de Carboni és capaç de metabolitzar tots els sucres excepte la lactosa. En el most del raïm hi ha una gran quantitat de sucres fermentables repartits entre la glucosa i fructosa.

Com a font de Nitrogen utilitzen els compostos nitrogenats fàcilment assimilables del most com el ió amoni, aminoàcid i pèptids de baix pes molecular.

Poden ser tant aeròbics com anaeròbics segons la presència d'oxigen . El llevat en presència d'oxigen utilitza la fermentació on produeix energia a partir d'un substrat ric en sucres i quan ja s'acaben els sucres aquest comença a fer la respiració. Aquest procés s'anomena efecte Crabtree i no és beneficiós energèticament ja que la fermentació produeix molt menys energia, però el llevat gràcies al sistema evolutiu de colonització fa aquest efecte perquè en la fermentació produeix etanol, un producte que inhibeix molts microorganismes, on el llevat es tolera a certa quantitat, així es fa el colonitzador del substrat i quan ja ha produït suficient etanol comença amb la respiració.

Quan mor el llevat hi ha una sèrie de reaccions que produeixen l'autòlisi de la cèl·lula : Enzims proteolítics degraden els components cel·lulars, la paret cel·lular es degrada i hi ha un augment de compostos volàtils.

2.1 Fermentació alcohòlica

En l'obtenció d'energia el llevat té dos opcions la respiració i la fermentació.

Ambdues comença amb el procés de la glicòlisi per obtenir àcid Pirúvic a partir de la glucosa. En la respiració seguidament aniria al cicle de Krebs. En la fermentació produeix etanol i anhídrid carbònic (CO₂).

Reacció completa de la fermentació:



Productes de fermentació del vi:

-Producció de 8 a 15% d'etanol: la síntesi d'un grau d'etanol representa un 17g/l de sucres reductors

-Producció de CO₂: El rendiment mig és de 0,4-0,5 g CO₂ / g de sucre degradats

Altres subproductes:

-Producció de Glicerol: La síntesi estaria entre 5-10 g/L. Aquest compost ve de la reducció dihidroxiacetona-fosfat en glicerol-fosfat i a la vegada a glicerol, una altre manera d'oxidar el NADH.

- Àcids orgànics com acetat, succinat i piruvat, alcohols superiors i esters.

2.2 Genoma

S.cerevisiae va ser el primer genoma de cèl·lules eucariotes seqüenciat completament (Dujon,1996)

Té un genoma petit, amb gran nombre de cromosomes, poc ADN repetitiu i pocs introns. Cèl·lules haploides contenen unes 12000 kpb i un grup de 6000 gens que es troben en 16 cromosomes lineals. Conté un genoma ric en Adenines i Timines. El seu ADN mitocondrial és un dels més grans de tots els organismes. Es sap que el 23% de les proteïnes del llevat son iguals que de l'ésser humà.

El llevat pot ser haploide o diploide, però, en la producció del vi normalment s'utilitza diploides o aneuploides i algun cop poliploides.

.

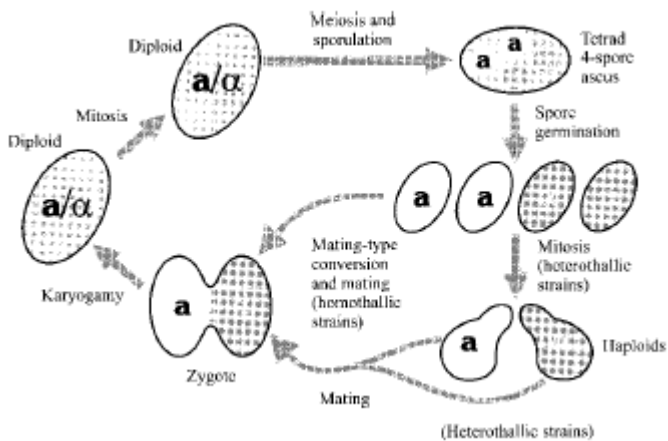
2.3 Reproducció

S.cerevisiae té un cicle haplodiplont en el qual pot ser haploide(n) i diploide(2n).

Les cèl·lules haploides es reproduïxen sexualment amb la fusió dels nuclis. Té dos tipus de sexe un factor a i l'altre factor α els quals es fusionen entre les cèl·lules de diferent sexe formant una cèl·lula diploide.

La cèl·lula diploide es pot reproduir asexualment quan les condicions no són favorables per divisió meiòtica formant 4 'asques' (2 cèl·lules haploides tipus a i 2 tipus α).

En condicions normals es reproduïxen sexualment per divisió mitòtica i separació per gemmació formant cèl·lules diploides més petites que la mare.



Il·lustració 1: Cicle de reproducció de *Saccharomyces Cerevisiae*

Reproducció sexual: La cèl·lula *a* tenen el factor *a* i la cèl·lula α tenen el factor α . Quan la cèl·lula *a* conté en les seva proximitat el factor α es desencadena la formació d'una protuberància en les cèl·lules cap la font de feromones del sexe contrari i recíproca. Aquesta resposta ve donada per una sèrie de transcripcions i repressions de gens. El al·lel encarregat d'això es el MAT (*a* o α).

3. Tècniques de modificacions genètiques

3.1 Millora genètica

El vi és un producte amb un gran marge de millora on els experts busquen noves formes de millorar-lo, entre les quals es troba la modificació de les propietats del llevat i escollir la soca més adequada pel producte. En aquest tipus de producte actualment no hi ha una utilització generalitzada del llevat modificat genèticament, principalment és perquè les tècniques de modificació clàssiques produeixen canvis en els gens d'interès i a la vegada altres canvis en els gens no desitjats. La solució és la utilització de DNA recombinant, un mètode molt precís on modifiques solament els gens d'interès en el llevat. Aquest sistema està actualment en estudi i podria ser una bona eina per millorar el vi.

Les tècniques clàssiques són la mutagènesis i hibridació. Les tècniques de DNA recombinant són la fusió de protoplasts i totes les tècniques d'enginyeria genètica.

3.2 Mutagènesis dirigida

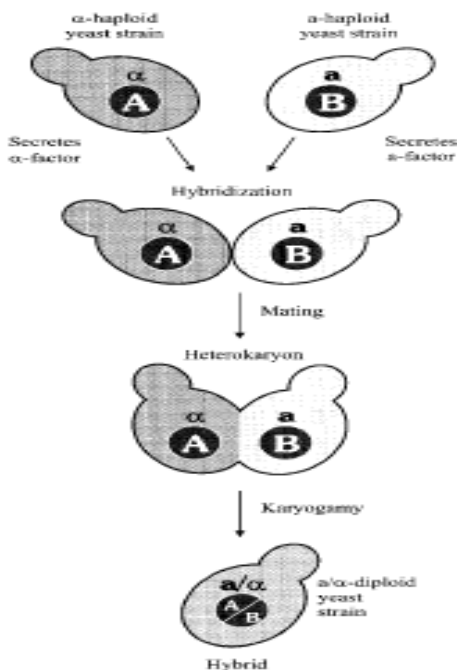
S. cerevisiae té una freqüència mitja de patir una mutació per locus de 10^{-6} per generació. Aquesta tècnica consisteix en afegir una substància mutàgena que augmenti la probabilitat de patir mutacions de 10^{-4} - 10^{-5} .

Les mutacions poden afectar a gens estructurals o zones de regulació del genoma alterant la funció o quantitat del producte gènic. Un cop detectada la mutació desitjada s'aïlla la soca i la reproduïm.

El tipus de lesió provocada dependrà del tipus de mutagen utilitzat. Els agents mutàgens més utilitzats són la llum ultraviolada, l'àcid nitrós, EMS, MMS, NTG.

3.3 Hibridació

És una tècnica que consisteix en el aparellament de dos llevats haploides per tal d'obtenir un llevat diploide heterozigot amb propietats diferents dels llevats pares.



La majoria dels llevats són homotàtics, per tant és un inconvenient respecte aquesta tècnica ja que es poden autofecundar i no ens interessa. Una solució seria la utilització de micromanipuladors per agafar les quatre ascòspores homotàtiques d'un mateix ascus i posar-les en contacte directa amb cèl·lules haploides heterotàtiques i complementaries. És un mètode ràpid.

Il·lustració 2: Hibridació de dos cèl·lules haploides

3.4 Fusió de protoplasts

Aquesta tècnica consisteix en l'aparellament asexual de dos protoplasts (llevats sense paret cel·lular) amb la conseqüent fusió dels nuclis.

Les parets cel·lulars són eliminades per enzims lítics en presència d'un estabilitzador osmòtic per tal d'evitar la lisis del protoplast. La unió dels protoplasts es fan amb ajuda d'agents de fusió com el polietilenglicol i els ions calci . Després d'aquesta fusió es col·loquen en plaques d'agar-selectiu estabilitzat osmòticament perquè regenerin la paret cel·lular.

El llevat obtingut és un híbrid molt estable que es considerat com un OMG

3.5 Enginyeria genètica

Aquesta tècnica es basa en manipular els gens d'interès de manera que es puguin introduir dins del llevat i fer que es repliquin. És una tècnica en la que saps el gen que vols introduir , per tant dóna una gran especificitat i eficàcia de manera controlada. Consta de diverses fases:

1. Selecció del gen del genoma de qualsevol organisme que volem que expressi una proteïna o regular un altre gen dins el llevat
2. Construcció d'un vector amb el gen per poder-lo integrar dins del llevat.
Normalment són plasmidis on contenen un origen de replicació del gen en els llevats, dianes per enzims de restricció al voltant del gen i molt important, un marcador de selecció que quan el llevat integri aquest plasmidi es pugui diferenciar de les altres com per exemple, utilitzar el gen de resistència d'un antibiòtic en un medi amb l'antibiòtic.
3. Introducció del vector per diverses tècniques com la utilització de electroporació i el PEG amb calci.
4. Selecció del llevat que ha integrat els gen

Aquests llevats són considerats organismes modificats genèticament, cosa que limita molt la seva utilització. És la tècnica del futur i molt útil perquè tenen moltes aplicacions en vegetals, animals, medicina, farmacologia....

4. Aplicacions en el vi

Les tècniques citades abans serveixen per obtenir llevat amb millors característiques respecte a la fermentació, producte final o sobre la salut. En l'alimentació on més s'utilitza aquesta millora en *S. Cerevisiae* és en el pa, però actualment està augmentant molt en el vi, producte que és molt consumit i produït a Catalunya i amb moltes variables que millorar entre les quals es troben:

4.1. Millora del rendiment de la fermentació

TREHALOSA : protector contra l'estrès per la dessecació

La trehalosa (α -D-glucopiranosil (1-1)- α -D-glucopiranosid) és un disacàrid que es troba àmpliament en tots els organismes amb diferents funcions. Es utilitza com a font d'energia d'insectes, actua també com a component estructural en algunes parets bacterianes, participa en la regulació del creixement de les plantes. En el llevat té com a funció principal la protecció contra l'estrès.

En *Saccharomyces Cerevisiae* poden acumular aquest disacàrid fins a concentracions de 20% del pes sec del llevat. En molts estudis han relacionat aquesta acumulació amb una elevada tolerància al estrès i a una elevada capacitat fermentativa. Actualment gràcies a observacions es sap que elevades concentracions de trehalosa milloren la viabilitat de les cèl·lules que es sotmeten a estrès tèrmic, osmòtic i dessecació.

Síntesi i degradació

La síntesi de trehalosa es produeix en el citosol. Intervenien quatre gens (TPS1, TPS2, TS11, TPS3)

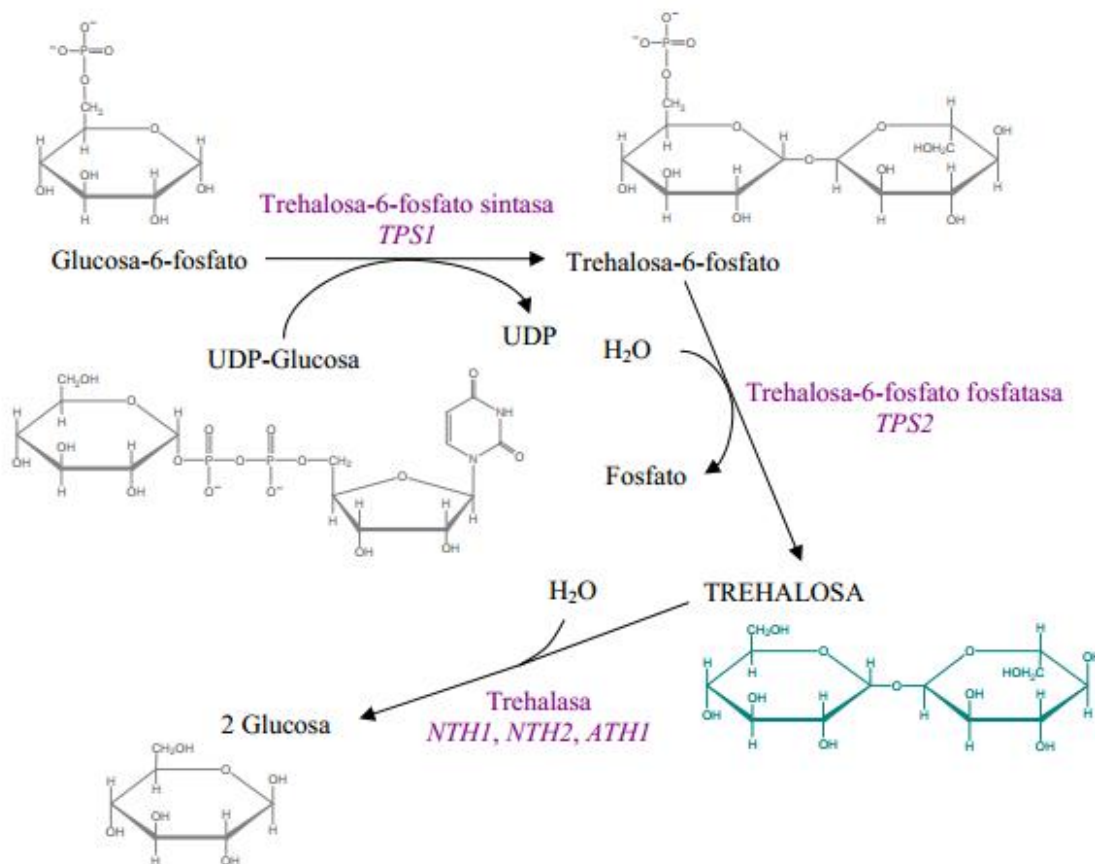
TPS1 codifica l'enzim trehalosa-6-fosfat sintasa, el qual s'encarrega d'unir una molècula de glucosa-6-fosfat amb el UDP- glucosa formant trehalosa-6-fosfat. TPS2 codifica l'enzim trehalosa-6-fosfat fosfatasa, el qual s'encarrega de desfosforilar la trehalosa-6-fosfat formant trehalosa.

TS11 i TPS3 són dos subunitats que es desconeix la seva funció específica però intervenen en el procés de regulació de la integritat del sistema de la trehalosa.

Aquests 4 gens contenen la seqüència STRE en els seus promotors i s'indueixen quan hi ha diferents tipus d'estrès, un mecanisme bastant complex.

En la degradació de la trehalosa intervenen tres gens (NTH1, NTH2, ATH1)

NTH1 codifica l'enzim trehalasa neutra amb pH: 7 i localitzada al citosol on s'encarrega de degradar la trehalosa formant 2 glucoses. ATH1 codifica l'enzim trehalasa àcida amb pH: 4,5 i localitzada al vacúol on s'encarrega de degradar la trehalosa del exterior de la cèl·lula formant 2 glucoses. NTH2 es va detectar per homologia (77%) amb NTH1 on es va detectar que interfereix en el mecanisme ja que la seva delecció provoca més sensibilitat al xoc tèrmic.



Il·lustració 3: Síntesi i degradació de trehalosa

Segons alguns estudis durant la fase exponencial de la cèl·lula els gens *TPS1* i *TPS2* són parcialment reprimits per la glucosa i també la trehalasa es troba activa de forma que no es pot acumular la trehalosa al citosol. En canvi al acabar-se la glucosa s'inhibeix la PKA que impedia la expressió dels enzims de la formació trehalosa i altres sucres provocant també la inactivació de la trehalasa neutre. D'aquesta forma sí que s'acumulava en forma de disacàrids.

La manera d'augmentar la concentració de trehalosa en enginyeria genètica seria sobreexpressar la *TPS1* o *TPS2* i la disrupció dels gens *NTH1* i *ATH1*.

Protecció contra la dessecació

Actuen en la deshidratació dels llevats per conservar-los i puguin ser manipulats i rehidratats per fer la fermentació del vi . Produeix dos accions :

- Reemplaçament de les molècules d'aigua: La trehalosa gràcies als seus grups hidroxils s'uneixen als grups fosfats dels fosfolípids de la membrana plasmàtica substituint a les molècules d'aigua. Aquesta unió evita la transició dels lípids a fase de gel i estabilització de la bicapa.
- Vitrificació: Els sucres com la trehalosa solen formar cristall provocant la viscositat del citoplasma i la conseqüent protecció de la membrana i proteïnes al limitar el moviment molecular, també suprimeix les reaccions degeneratives associades a la dessecació.

La modificació dels llevats deshidratats que produeixen més trehalosa en la seva rehidratació fa que augmenti la viabilitat i la capacitat fermentativa de les cèl·lules que els llevat sense modificar.

4.2.Millora tecnològica

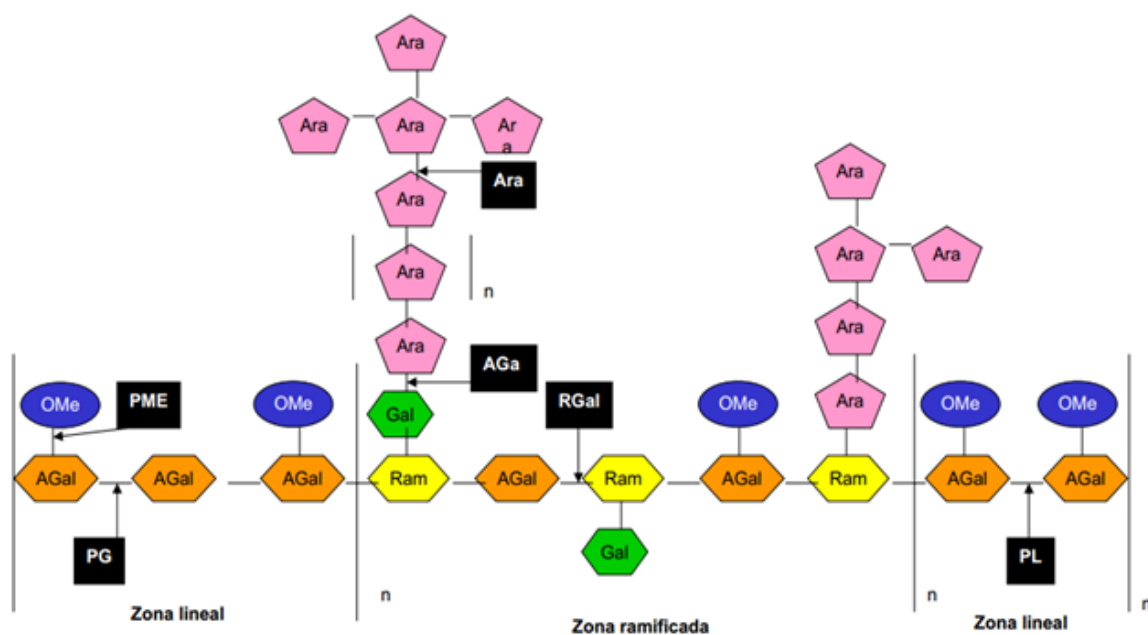
Clarificació de pectines

Les pectines són heteropolisacàrids constituents de la paret vegetal .En la indústria alimentaria les pectines poden originar un problema durant la extracció, filtració i clarificació del suc de raïm per la viscositat i terbolesa que dona.

Les pectines estan formades per un eix central de residus d'àcid D-galacturònic que presenta ramificacions de galactosa, arabinosa i ramnosa.

L'eix lineal estaria format per un homogalacturona, mentre que els blocs ramificats inclouen els ramnogalacturonans I y II als que s'associen els arabinogalactans.

En vinificació utilitzen les pectinases per millorar el rendiment durant l'extracció del most ja que degraden les pectines que interfereixen en la extracció i faciliten la clarificació del vi.



Il·lustració 4: Estructura i enzims implicats en la degradació de la pectina. AGal: àcid galacturònic, Ram: ramnosa, Gal: galactosa, Ara: Arabinosa, OMe: Metoxil.

Tipus de pectinesterases:

La pectinmetilesterasa (PME) trenca l'enllaç ester entre el metanol i el grup carboxílic del àcid galacturònic, formant pectines desmetilades.

La poligalacturonasa (PG) hidrolitza els enllaços glicosídics $\alpha(1-4)$ entre dos residus d'àcid galacturònic amb absorció d'una molècula d'aigua. La seva acció es únicament sobre les pectines ja prèviament desmetilades per la PME.

Hi ha dos tipus de poligalacturonasas:

Las exopoligalacturonasas que trenquen els grups terminals de la molècula de pectina, resultant en una escassa reducció de la longitud de la cadena i les endopoligalacturonasas que actuen al atzar sobre tots els enllaços de la cadena, originant una disminució ràpida de la viscositat.

La pectinliasa (PL) i la pectatoliasa (PAL), permeten la ruptura dels enllaços de les cadenes poligalacturòniques donant un doble enllaç entre el C4 y C5 per cada enllaç glicosídic trencat, actua sobre pectines d'alt i baix metoxil.

Enginyeria genètica: En el most del vi per tal de hidrolitzar les pectines es podria utilitzar els enzims propis del raïm o del propi llevat, però aquests no són suficients ni eficients per trencar els polisacàrids. Per tant per facilitar la clarificació es necessita introduir gens d'altres espècies en el llevat capaços de degradar la pectina .

Normalment s'utilitzen preparats enzimàtics d'*Aspergillus Niger*, però per buscar alternatives més barates com utilitzar *Saccharomyces cerevisiae* recombinant s'han fet molts estudis com ara (Laing y Pretorius, 1992, 1993)

En aquest estudi s'introdueix a *S.cerevisiae* els gens de PL(PEHe) de *Erwinia crysanthemi* i de la PG (PEH1) de *E.caratova* en diferents cassetes d'expressió i secreció amb la combinació d'origens de replicació de bacteris i llevats amb terminadors de gens , millorant la degradació de la pectina gràcies a la formació dels enzims.

4.3.Millora del sabor del vi

Reducció de sulfit i sulfur

Les molècules que porten sofre són molt volàtils i amb un potencial de detecció molt baix per tant, la seva presència afecta molt sobre el sabor del vi. El sofre pot venir del propi raïm durant la seva maduració, també de la addició de fungicides que porten sofre i de l'addició del sulfit en el vi com antioxidant i antimicrobià.

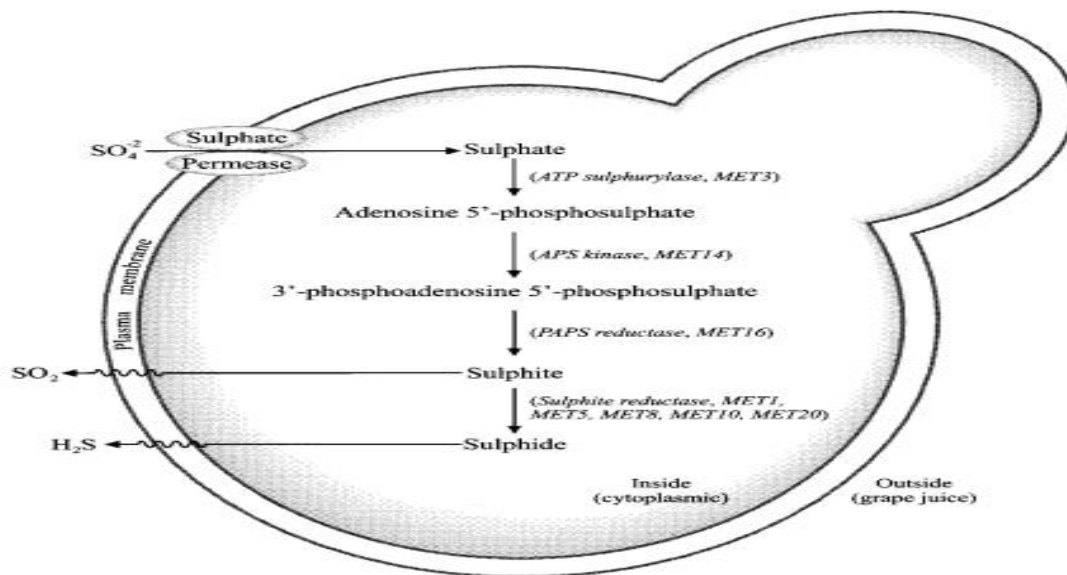
El propi llevat també produeix sofre resultat de diverses reaccions , les quals són una futura font d'investigació, degut que la presència de sulfit i altres molècules amb sofre donen sabors estranys i problemes de salut.

Saccharomyces cerevisiae necessita fonts de sofre pel seu creixement.

El diòxid de sofre (SO₂) en poques quantitats té efectes beneficiosos, en canvi, el sulfur d'hidrogen (H₂S) és un dels productes més perjudicials donant un sabor i aroma a ous podrits. El sulfit prové del sulfat, el sulfur prové del sulfit i sulfat i de la cisteïna.

Els precursors de la cisteïna(O-sulfhidrilasa-acetilserina) i de la metionina(O-acetilhomoserina sulfhidrilasa) són utilitzats per la cèl·lula per unir-se amb el sofre provinent del sulfur i així reduir la quantitat d'aquest formant els aminoàcids citat abans. El problema ve si hi ha poca font de nitrogen i per tant no hi han aquests precursors i el sofre s'uneix amb l'hidrogen lliure formant el sulfur acumulant-se i alliberant-la al exterior per difusió.

Per tant la formació i acumulació de H₂S es causat per la disminució de la quantitat de nutrients, nitrogen assimilable o de vitamines. Com a solució es pot afegir nitrogen en forma de fosfat d'amoni.



Il·lustració 5 : Cicle del sofre en el llevat

En el cas del vi negre que es produeix en un clima càlid, el llevat produeix fermentacions més ràpides i per tant utilitzen més nitrogen. La formació de H₂S durant la fermentació es pot eliminar degut a la seva alta volatilitat amb el CO₂ produït. El problema ve quan es produeix al final o després de la fermentació ja que forma tiols, mercaptans, disulfurs amb aromes d'all, ceba....

Enginyeria genètica: En aquest cas ens interessa obtenir un llevat amb una producció baixa de sulfur o amb la concentració d'aquest intracel·lularment. Modificant els enzims que intervenen en la reducció del sulfat com:

L' atenuació del gen MET3 reduint l'activitat de ATP sulfurilasa per disminuir el sulfat

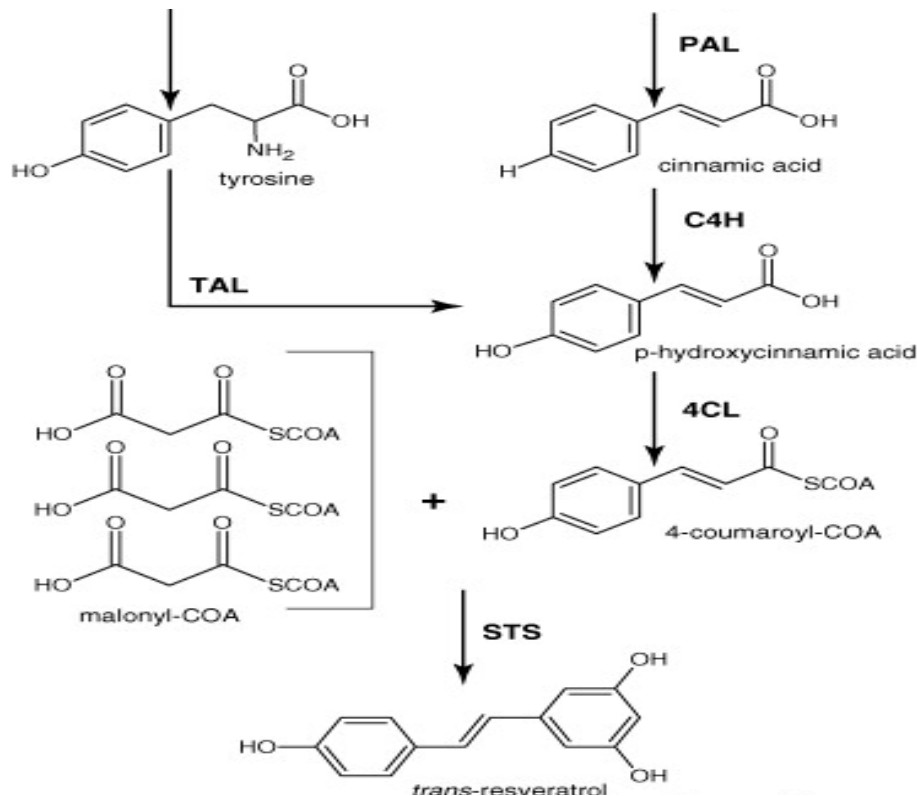
La més important l'atenuació del gen MET1 que redueix l'activitat del sulfito reductasa per disminuir el sulfur i d'aquesta manera la poca quantitat que es formi s'uneixi amb els precursors.

4.4 Millora de salubritat del vi

Resveratrol

El resveratrol és un compost fenòlic (3,5,4'-trihidroxiestilbè) utilitzat com una fitoalexina produïda per les plantes en resposta a infeccions per fongs o estrès. Aquesta fitoalexina es produeix sobretot en la pell del raïm i molt poc a la polpa, per això conté molta més quantitat el vi tinto que el blanc.

Aquest compost és beneficiós perquè redueix el risc de malaltia cardíaca coronària degut al efecte per les seves activitats inhibidores sobre la oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat, agregació plaquetàries i síntesis de eicosanoides. Actua com a antioxidant i també com a antimutagen, utilitzat com a mesura quimiopreventiva al càncer o indueix enzims específics que metabolitzen substàncies cancerígenes.



Il·lustració 6: Síntesi del resveratrol

Enginyeria genètica: Per augmentar la quantitat de resveratrol al vi, apart del que hi havia al raïm, es pot introduir els gens capaços de codificar els enzims que s'encarreguen de sintetitzar resveratrol en el llevat.

En *S.cerevisiae* s'introdueixen els gens PAL, C4H, 4CL de la via dels fenilpropanoids donant lloc als enzims amoníac-liasa, cinamat 4-hidroxilasa i coenzima A del gen liasa respectivament. La unió del 4-coumaroyl-COA amb malonil-COA es catalitza per l'enzim sintasa del estilbè codificat pel gen (STS) també afegit per formar resveratrol.

5. Normativa OGM

Actualment *S.cerevisiae* és un organisme eucariòtic model degut a la seva seqüenciació completa del genoma, està classificat com a un organisme GRAS (generalment reconegut com a segur).

En la majoria de països els llevats transgènics no estan acceptats per part del consumidor.

Certificació d'un OGM: Estudi de:

- la millora genètica (característica modificada)
- La seguretat alimentària
- Potencial de l'impacte al medi ambient

Segons la legislació Europea, tots els OGM i productes derivats han de ser avaluats per la EFSA (European Food Safety Authority). Un cop ha sigut positiva, la Comissió Europea ja pot autoritzar la seva comercialització dintre dels límits de la Unió Europea, però al final cada país membre pot acceptar o no el OGM segons la seva legislació pròpia.

Aliments GM tenen una major acceptació als EEUU que en Europa, com també passa en els països subdesenvolupats degut a les disponibilitats dels aliments i les faltes nutricionals. El 62% de les persones de la UE no veu cap benefici en les begudes i aliments considerant-los inacceptables i antinatural.

El 18 d'abril del 2004 va sortir una nova regulació sobre la traçabilitat i etiquetatge dels OGM de obligat compliment en els països membres de la Unió Europea. Segons aquest reglament tots els productors estan obligats a etiquetar els aliments que continguin algun ingredient transgènic. Si un ingredient porta menys del 0,9% de la composició del aliment quedarà exclosa de especificar-lo a l'etiqueta.

Si el fabricant de pa, vi o cervesa ha utilitzat llevat transgènic no cal ficar-lo a l'etiqueta ja que tant els llevats com enzims, ferments són substàncies que faciliten o acceleren un procés i per tant no tenen una presència substancial en el producte final.

6. Conclusions

En l'actualitat els llevats modificats genèticament com d'altres OMG tenen grans problemes sobre la seva comercialització arreu del món ja que depèn de molts factors. Es necessiten molts més estudis i informació sobre els gens, les seves funcions, relacions, expressions i sobretot l'estabilitat d'un OMG, factor del qual es molt criticat. Han d'aplicar-se més anàlisis millors i segurs, per tal de donar-li més confiança als consumidors de que aquests productes no són perjudicials per la salut ni pel medi ambient. S'han de promoure programes i publicitat de confiança per canviar el pensament que tenen les persones. La majoria de la població no renuncia al progrés, tot lo contrari en quan vegin els OMG com una utilitat pràctica per la millora de la qualitat de vida els acceptaran.

En relació amb el llevat transgènic, degut a que si s'utilitza en un producte, en l'etiqueta no s'ha de constar com a aliment transgènic, fa que no tinguin tantes restriccions com d'altres aliments fet que possibilita més la millora del vi en tots els seus aspectes.

Des de la seqüenciació completa del genoma del llevat hi ha hagut grans avanços sobre l'estudi de les proteïnes sintetitzades corresponents als gens coneguts i l'aplicació d'aquest coneixement a la biotecnologia, no obstant, el futur encara és més prometedor i amb el principal objectiu d'establir els productes modificats genèticament com aliments innocus, sans i amb grans beneficis.

En resum s'ha de finançar i aprofundir al màxim sobre els OMG perquè siguin completament segurs per tal de guanyar-se l'acceptació dels consumidors. Són els gran reptes que tindran que superar en els següents anys.

7.Bibliografía

- Bueno i Torrents. D .2011. *¿Para que sirven los transgénicos? Todas las claves de una tecnología útil y controvertida* .Publicacions i edicions en la Universitat de Barcelona.pp:375-384.

-Dominique.J, Pelletier.G, Pernollet.J.2011. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*.334,3:229-236

-Fisher.S , Procopio.S, Becker.T. 2013. Self-cloning brewing yeast: a new dimension in beverage production. *Eur food Res technol*.237:851-863

-Flanzy.C.2003.*Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 2ªedición.Mundi-prensa.Madrid.pp:274-311

-Garre.G. E.2008. Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca .Tesis doctoral del Departamento de bioquímica y biología molecular en Universitat de València.

- Gil.Á.2010.*Tratado de Nutrición, Composición y calidad nutritiva de los alimentos*.2ªEdición. Editorial Panamericana.Madrid.pp:499

-González-Candelas.L, Gil.J.V, Lamuela-Raventós.R.M, Ramón. D.2000. The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. *International Journal of Food Microbiology*.59,3:179-183

-Hidalgo.T.J. 2010. *Tratado de enología*. 2ªedición.Mundi-Prensa ,Madrid.pp:545-622

-Pretorius.S , Isak . 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.*Yeast.*, 16,8 :675-729

- Suarez.L.J.A.1997.*Levaduras vínicas , funcionalidad y uso en bodega*.Ediciones Mundi-prensa.Madrid,Barcelona,México.

-Valdivieso.U.M. 2006.Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* superproductoras de glutatión.Tesis doctoral de Química en la Universidad de Granada.

-Wikipedia.2014.*Saccharomyces cerevisiae*.Disponible en :
http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae

