

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,  
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,  
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA

Laboratorio de Microbiología Enológica

**Análisis Genómico y Molecular de  
Levaduras Vínicas. Aplicación a la  
Mejora del Proceso de Fermentación de  
Vinos mediante Selección de Levaduras  
Autóctonas**



**Tesis Doctoral**

**María Esther Rodríguez Jiménez**

**Cádiz, 2007**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,  
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,  
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA.**

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales  
Laboratorio de Microbiología Enológica  
CASEM

**Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación  
a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante  
selección de levaduras autóctonas**

**TESIS DOCTORAL**

**María Esther Rodríguez Jiménez**

**Cádiz, 2007**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,  
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,  
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA.**

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales  
Laboratorio de Microbiología Enológica  
CASEM

Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la  
mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de  
levaduras autóctonas

Memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz, presentada por:  
María Esther Rodríguez Jiménez

Directores

Dr. D. Jesús Manuel Cantoral Fernández

Dra. D<sup>a</sup>. Laureana Rebordinos González

Doctoranda

María Esther Rodríguez Jiménez





**Don Jesús Manuel Cantoral Fernández**, Catedrático de Microbiología y  
**Dña. Laureana Rebordinos González**, Profesora Titular de Genética de la  
Universidad de Cádiz,

**INFORMAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas**”, presentada por Dña. María Esther Rodríguez Jiménez, para optar al grado de Doctora, ha sido realizada bajo su dirección y autorizan su presentación y defensa.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Puerto Real a 18 de Mayo de 2007

Dr. D. Jesús Manuel Cantoral Fernández

Dra. D<sup>a</sup>. Laureana Rebordinos González



El trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria ha sido realizado dentro de la línea de colaboración entre el Laboratorio de Microbiología Enológica de la UCA y Bodegas Antonio Barbadillo S. L. de Sanlúcar de Barrameda (Proyectos OTRI 1998-2007 y PETRI 95-0855 OP).



## *AGRADECIMIENTOS*

*En primer lugar quisiera dar las gracias a mis Directores de Tesis Dr. D. Jesús Manuel Cantoral Fernández y Dra. Dña. Laureana Rebordinos González por darme la oportunidad para seguir formándome tanto profesional como personalmente. También les quiero agradecer el trato tan especial que he recibido de ellos y la confianza que siempre han depositado en mi, gracias Lauri y Jesús.*

*A todo el personal de las Bodegas Barbadillo, Montse Molina, Manolo Domínguez, Cristina, Juanjo Mesa, Antonio, Diego, José Manuel... que forman parte de esta Tesis, gracias por toda la ayuda, facilitándome en todo momento el trabajo durante estos años.*

*A Jorge Pascual del Consejo Regulador por su amabilidad a la hora de proporcionarme información sobre la vinificación en esta región.*

*A mis compañeros del laboratorio de Micro (del 710) Inma, Mari, Kiko, Carlos, Marisa y a la recién llegada Joana, y a mis también compañeros los genéticos (del 21) Ismael, Irma, Tito, Hicham, Mercedes, Tiziana e Isabel y a los que ya no están Edgardo y M<sup>a</sup> del Mar. A todos y cada uno de ellos quiero agradecer toda su ayuda, apoyo y dedicación cuando la necesité en muchos momentos, que no han sido pocos, desde que comencé en el laboratorio aquel septiembre del 98.*

*A todos los alumnos colaboradores que han pasado por el laboratorio durante todos estos años y me echaron un cable haciendo y lavando "plugs", gracias Bea, Montse, Estrella, María y a los más recientes Fernando, Germán, Tere y Antonio. También quiero agradecer la ayuda de un pequeño y especial colaborador al que tengo mucho cariño y que todos los veranos me echa una mano en el laboratorio, gracias Jesús Alberto.*

*A los que pasaron por el 710 y al final no se quedaron, Mario que me enseñó a "hacer manos" en el laboratorio, Antonio, Curro, Guillermo, Dani y Ernesto, a todos gracias. A JJIV, que también me instruyó en el apasionante mundo de las levaduras y al que tengo gran admiración, gracias. Y a Paco Debén, que empezó conmigo esta andadura siendo mi compañero de muestreos, congresos y demás aventurillas, gracias dondequiera que estés.*

*A Pachi por los cafés despertadores en la Facultad, gracias.*

*A mi familia, mi madre Carmen, hermanos Carmen, Ricardo y Sergio, cuñados Juanma, M<sup>a</sup> José y Laura, mi sobrinilla Carlota que es lo más bonito que hay, a los que están por llegar Beatriz y Ricardito que son una alegría, y a Gato, gracias por estar siempre conmigo.*

*A todas estas personas dedico esta Tesis Doctoral.*

*A mi familia*

*A Carlota*





# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1. Antecedentes históricos de la vinificación.....	3
2. Características generales de la vinificación en la zona geográfica de Cádiz.....	6
2.1. Prácticas pre-fermentativas.....	9
3. Biología de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
3.1. Estructura celular.....	11
3.1.1. Constitución genética de las levaduras .....	12
3.1.1.1. ADN cromosómico.....	12
3.1.1.2. AND mitocondrial.....	12
3.1.1.3. ADN plasmídico.....	13
3.1.1.4. Factor killer.....	13
3.2. Nutrición y Crecimiento.....	14
3.3. Ciclo de vida y Reproducción.....	15
4. Origen y evolución de las levaduras vínicas.....	17
5. Fermentación alcohólica.....	19
5.1. Sucesión de especies de levaduras durante la fermentación espontánea.....	20
5.1.1. Factores que afectan a las poblaciones de levaduras en una fermentación espontánea.....	20
5.2. Factores que afectan al curso de la fermentación.....	22
5.2.1. Composición del mosto.....	22
5.2.1.1. Composición química.....	22
5.2.1.2. Composición microbiológica. Factor killer.....	23
5.2.2. Temperatura.....	24
6. Fermentaciones inoculadas.....	26
6.1. Empleo de levaduras secas activas (LSA).....	26
6.2. Selección de cepas de levaduras autóctonas.....	27
6.2.1. Criterios de selección.....	28
6.3. Pie de cuba.....	29
6.4. Fermentaciones inoculadas frente a fermentaciones espontáneas.....	30
7. Técnicas de identificación y caracterización genética en levaduras industriales.....	31
7.1. <i>Electroforesis en Campo Pulsante</i> (PFGE). Cariotipo Electroforético.....	32
7.1.1. Polimorfismo cromosómico.....	33
7.1.1.1. Inestabilidad del cariotipo.....	35
7.2. <i>Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial</i> (RFLP-ADNmt).....	37
7.3. Otras técnicas de Biología Molecular aplicadas al estudio de las levaduras industriales.....	38
7.3.1. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i> (PCR).....	38
8. Aplicación de las técnicas de Biología Molecular a la Enológica. Antecedentes.....	39
8.1. Justificación el trabajo.....	46
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
1. Muestras industriales.....	55
1.2. Conservación de las muestras.....	55
2. Aislamiento de colonias.....	69
2.1. Selección de los aislamientos.....	69
3. Caracterización genética de las cepas de levaduras mediante la técnica de <i>Electroforesis en Campo Pulsante</i> .....	70

3.1. Preparación y tratamiento de las muestras.....	70
3.2. Preparación del gel de electroforesis.....	72
3.3. Electroforesis.....	73
3.4. Visualización del ADN cromosómico.....	74
3.5. Conservación de los aislamientos.....	75
3.5.1. En glicerol.....	75
3.5.2. En placas de medio YPD.....	75
4. Análisis microbiológicos para llevar a cabo la selección de las cepas de levaduras autóctonas.....	76
4.1. Cepas utilizadas.....	76
4.2. Poder fermentativo. Tasa de consumo de azúcares.....	76
4.2.1. Procedimiento experimental.....	76
4.2.1.1. Determinación de azúcares reductores por el método oficial.....	77
4.3. Estudio de la tolerancia al etanol.....	78
4.3.1. Procedimiento experimental.....	79
4.4. Estudio del factor killer.....	80
4.4.1. Composición química y preparación del medio MBM.....	80
4.4.2. Procedimiento analítico.....	81
4.4.3. Interpretación de los resultados.....	82
5. Micro-Fermentaciones puras.....	82
5.1. Cepas utilizadas.....	82
5.2. Desarrollo experimental.....	83
5.3. Medida de la viabilidad celular. Método del “ <i>azul de metileno</i> ”.....	84
6. Curvas de viabilidad a distintas temperaturas.....	85
6.1. Cepas utilizadas en el estudio.....	85
6.2. Composición química y preparación del mosto sintético.....	85
6.3. Procedimiento experimental.....	88
6.3.1. Medida del °Beumé.....	89
6.3.2. Determinación del grado alcohólico.....	89
7. Estudio de la estabilidad de los cariotipos.....	90
7.1. Procedimiento experimental.....	90
7.2. RFPL del ADN mitocondrial.....	91
7.2.1. Extracción del ADN genómico de levaduras.....	91
7.2.1.1. Eliminación del ARN).....	92
7.2.2. Digestión con enzimas de restricción.....	93
7.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	94
7.3. Hibridaciones ADN-ADN.....	95
7.3.1. Descripción y obtención de las sondas.....	95
7.3.1.1. Sonda ribosómica ITS1-5.8S-ITS2.....	96
7.3.1.2. Sonda del intrón AI3 del gen mitocondrial <i>COXI</i> .....	97
7.3.1.3. Visualización de los productos de PCR.....	98
7.3.1.4. Purificación de los productos de PCR.....	98
7.3.2. Marcaje de las sondas.....	98
7.3.3. Transferencia del ADN de los geles de agarosa a filtros de nylon....	99
7.3.4. Pre-hibridación del ADN.....	100
7.3.5. Hibridación.....	101
7.3.6. Lavados post-hibridación.....	101
7.3.7. Detección.....	102
7.3.8. Reutilización de los filtros.....	103
8. Control microbiológico rápido de las cepas de levaduras en fermentaciones inoculadas..	104
8.1. Tratamiento de las muestras de mosto.....	104
8.2. Extracción del ADN genómico en levaduras.....	104
8.3. Tratamiento con enzimas de restricción.....	106
8.4. Visualización de los resultados.....	106
9. Esquemas de elaboración del Pie de Cuba en cada vendimia inoculada.....	107

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
1. Esquema de selección de cepas de levaduras autóctonas. Estrategia seguida.....	115
1.1. Estudio de la diversidad genética de las cepas responsables de la fermentación espontánea de los mostos obtenidos en la vendimia 1999.....	115
1.2. Pre- selección de las cepas de levaduras.....	122
1.3. Criterios de selección.....	123
1.3.1. Análisis microbiológicos.....	124
1.1.1.1. Poder fermentativo. Tasa de consumo de azúcares.....	124
1.3.1.2. Inhibición por etanol.....	126
1.3.1.3. Factor killer.....	127
1.3.2. Análisis molecular.....	129
1.3.2.1. Elaboración del pie de cuba. Escalamientos.....	130
1.3.2.2. Control microbiológico mediante la obtención del cariotipo electroforético.....	132
1.4. Selección de cepas de levaduras autóctonas.....	138
1.5. Estudio de la diversidad genética entre las levaduras responsables de las fermentaciones espontáneas durante la vendimia 2000.....	140
1.6. Detección de cepas no- <i>Saccharomyces</i> mediante cariotipo electroforético en las vendimias 1999 y 2000.....	145
1.7. Comparación de las fermentaciones espontáneas durante dos años consecutivos. Polimorfismo y sucesión de especies. Discusión.....	153
1.7.1. Factores que afectaron a la diversidad y dinámica de las poblaciones en las fermentaciones espontáneas.....	156
2. Utilización de las cepas seleccionadas en condiciones industriales.....	159
2.1. Vendimia 2001.....	159
2.1.1. Micro-Fermentaciones puras.....	166
2.1.2. Estudio del factor killer.....	168
2.1.3. Nueva selección de cepas autóctonas.....	170
2.2. Vendimia 2002.....	170
2.2.1. Estudio de la influencia de la temperatura en las cepas autóctonas seleccionadas.....	177
2.3. Vendimia 2003.....	185
2.4. Vendimia 2004.....	194
2.5. Vendimia 2005.....	198
2.6. Factores que afectaron a la implantación de las levaduras autóctonas seleccionadas en las fermentaciones inoculadas.....	203
2.7. Fermentaciones inoculadas con levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) frente a fermentaciones espontáneas y a las inoculadas con levadura comercial (LSA).....	207
3. Análisis global de la diversidad genética de las cepas detectadas en las fermentaciones durante 7 vendimias consecutivas en una misma zona geográfica.....	213
4. Estudio de la estabilidad de los cariotipos.....	219
4.1. Polimorfismo detectado entre las cepas caracterizadas en la Vendimia 2001...	219
4.2. Polimorfismo detectado entre las cepas caracterizadas en la Vendimia 2003...	221
4.3. Estabilidad de los cariotipos tras 100 generaciones.....	225
4.4. Estabilidad de los cariotipos tras 300 generaciones.....	227
4.4.1. 300 generaciones sin presencia de etanol en el medio.....	228
4.4.2. 300 generaciones en presencia de un 7% de etanol en el medio.....	230
4.4.3. Control de la estabilidad de los cariotipos tras 100 generaciones.....	232
4.5. Hibridaciones ADN-ADN (Southern blot).....	234
4.5.1. Hibridaciones con una sonda de ADN de los genes ribosómicos.....	234
4.5.2. Hibridaciones con una sonda de ADN de los genes mitocondriales..	236
4.6. Inestabilidad del cariotipo de la cepa 313.4.....	237

4.7. Inestabilidad genética de la cepa comercial Fermivin.....	239
4.8. Polimorfismo cromosómico detectado en las vendimias inoculadas de 2001 y 2003 y estabilidad cariotípica de las cepas seleccionadas.....	240
5. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de las cepas de levaduras inoculadas.....	247
5.1. Vendimia 2005.....	248
5.1.1. Comparación de los resultados del control microbiológico rápido con los obtenidos mediante <i>Electroforesis en Campo Pulsante</i> .....	250
5.1.2. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de mostos tintos.....	251
5.2. Vendimia 2006.....	253
5.2.1. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de mostos tintos.....	259
5.2.2. Comparación de los resultados de los RFLPs del ADN mitocondrial de los mostos tintos con los obtenidos mediante <i>Electroforesis en Campo Pulsante</i> .....	260
5.3. Discusión.....	262
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>267</b>
<b>VI. ANEXO.....</b>	<b>273</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>277</b>

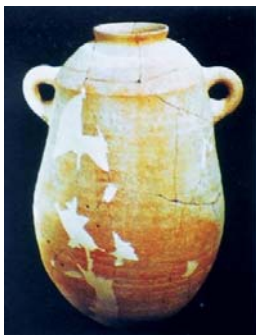
# I. INTRODUCCIÓN



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Antecedentes históricos de la vinificación

Las levaduras han formado parte de la civilización humana desde hace mucho tiempo, datando las evidencias más antiguas del Neolítico hace 7400-7000 años, ya que se han encontrado restos de sales tartáricas y de resinas en algunos ejemplares de cerámica de aquella época (McGovern y col. 1996, 1998). El ácido tartárico está presente solamente en las uvas en grandes cantidades y se ha postulado que la resina, concretamente del árbol *Pistacia*, se añadía como un conservante antibacteriano, suponiendo este hecho una fuerte evidencia de vinificación en esa época.



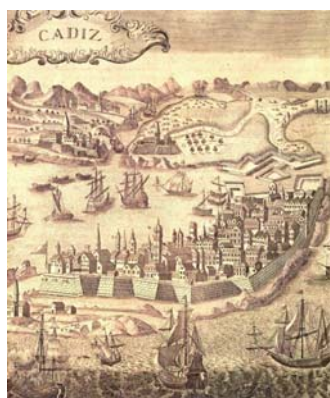
**Figura 1.** Ánfora fenicia. Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María).

Se han encontrado también evidencias de vinos hechos en Egipto y Fenicia hacia el año 5000 a.C. Actualmente Cavalieri y colaboradores (2000) han demostrado que el ADN aislado de un supuesto jarro de vino de Abydos (3150 a.C.) tenía una secuencia estrechamente relacionada con la secuencia de las levaduras modernas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Hacia el año 2000 a.C. el vino empezó a producirse en Grecia y Creta. Más tarde los romanos extendieron la vinificación por todo el Mediterráneo y en el 500 a.C. el vino empezó a producirse en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y norte de África. Los cultivos de vides también se extendieron por los Balcanes y los romanos los llevaron hacia Alemania y otras partes del norte de Europa hasta Bretaña. Los exploradores europeos durante el siglo XVI introdujeron la vid en el Nuevo Mundo y en el siglo XVII los colonizadores alemanes lo hicieron en el sur de África. Más tarde, en 1697, se extendió la vinificación a California, y más de un siglo después a Australia y Nueva Zelanda (Pretorius 2000).



En España no existe una clara unanimidad sobre el lugar en el que comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid y quiénes fueron los que introdujeron las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral sudoccidental andaluz constituyendo el punto de entrada y el lugar de las viñas más antiguas de España. Esta teoría está avalada por la presencia de los fenicios en la península hace unos 3000 años aproximadamente. Este pueblo comerciante fundó un puerto en el sudoeste al que llamaron Gades (Cádiz, en la actualidad). Después se trasladó tierra adentro, en cuyas montañas circundantes plantaron vides. Concretamente en las Ruinas del Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María) se han encontrado restos de lo que podrían haber sido lagares de elaboración de vino que datan del siglo IV a.C.



**Figura 2.** Ciudad antigua de Cádiz.

El vino que se producía en esta región llamada de Ceret (Jerez) se elaboraba cociendo el mosto recién fermentado para obtener altas graduaciones alcohólicas y poder así resistir el transporte hacia el Mediterráneo. A estos vinos se les adicionaba agua para su consumo y presentaban muchas impurezas porque la fermentación era imperfecta, razón por la que se les añadía ámbar, pez, resinas, etc. Hacia el año 138 a.C. comenzó la dominación romana, iniciándose una corriente comercial muy importante de productos de esta región hacia la metrópoli. En el año 711 da comienzo la dominación árabe, que en el sur de España duró más de cinco siglos. Durante todo ese tiempo, la zona sudoccidental siguió siendo un importante centro de elaboración de vinos, a pesar de la prohibición coránica. La producción de pasas y la obtención de alcohol con fines medicinales actuaban en cierta forma como excusas para el mantenimiento del cultivo de la vid y de la elaboración de vinos,

hasta que la conquista por Alfonso X el Sabio en 1264 supuso un giro de ciento ochenta grados para los vinos de esta región.

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras, en la que se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y dejar el zumo (llamado mosto) fermentar ya que las células de levaduras están en superficie de las uvas, preparadas para llevar a cabo la fermentación (Mortimer & Polsinelli 1999).

Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación no fue desarrollado hasta 7000 años más tarde con los trabajos de Pasteur (1872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana durante la fermentación. Con el conocimiento de que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los vinificadores pudieron controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta de embotellamiento.

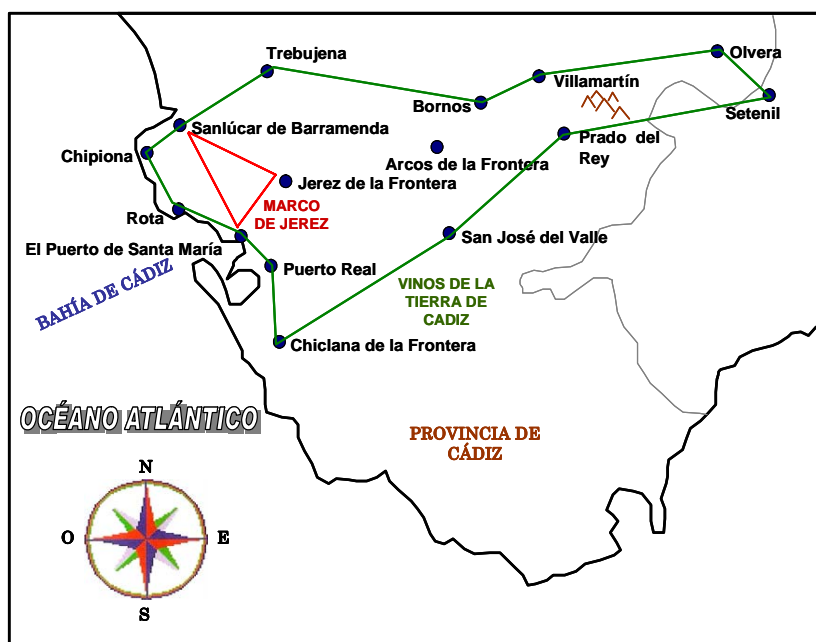
Más tarde, con el desarrollo de las técnicas microbiológicas las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de fermentación inoculada con cultivos puros de levaduras. Como resultado, la cualidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros trabajos de genética con levaduras llegaron a mediados de la década 1930-1940, introduciéndose cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos en los laboratorios de investigación ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas de laboratorio. La mayoría de ellas derivan de un aislamiento realizado por Emil Mraek a partir de higos en descomposición en Merced, California, en 1938 (Mortimer 2000). Dicho aislamiento, conocido como EM93, es una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C secuenciado completamente desde 1996 (Goffeau y col. 1996).

## 2. Características generales de la vinificación en la zona geográfica de Cádiz

En la zona de Cádiz se producen dos categorías de vinos adscritos a reglamentaciones distintas. Por un lado están los vinos con Denominación de Origen Jerez-Xérès-Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda que se engloban dentro del área de producción del Marco de Jerez, y por otro lado están los vinos de la Tierra de Cádiz, originarios de la comarca Vitivinícola de Cádiz.

La zona de producción del Marco de Jerez se encuentra en el área limitada dentro del triángulo formado por los términos municipales gaditanos de Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María y Sanlúcar de Barrameda. Otras ciudades que se encuentran en la zona de producción son Chipiona, Trebujena, Rota, Puerto Real, Chiclana de la Frontera y determinados pagos de Lebrija, en el límite de la provincia de Sevilla que linda con la de Cádiz.



**Figura 3.** Mapa geográfico de los municipios que se acogen a la mención de vinos de la Tierra de Cádiz en la provincia de Cádiz.

Los vinos de la Tierra de Cádiz abarcan fundamentalmente el Marco de Jerez y la Sierra de Cádiz englobando los términos municipales de Arcos de la Frontera, Chiclana de la Frontera, El Puerto de Santa María, Jerez de la Frontera, Prado del Rey, Puerto Real, Rota, Sanlúcar de Barrameda, Trebujena, Olvera, Setenil,

Villamartín, Bornos y San José del Valle. Los tipos de vinos elaborados bajo la mención de vinos de la Tierra de Cádiz son vinos jóvenes blancos, tintos y rosados.

**El clima** corresponde al de una zona meridional cálida, con importante influencia del Océano Atlántico, cuyo viento fresco de poniente es el que aporta a la cepa la humedad marítima, regando durante las madrugadas del estío las viñas con los rocíos. Ello actúa como un efecto moderador, atenuando los rigores del verano de la zona y el efecto de los vientos cálidos y secos de levante.

La región goza anualmente de 290 días de sol despejado e intensa luminosidad, no registrándose heladas ni pedriscos, soportando la vid en período activo una temperatura de 17,5 °C. Estas condiciones climáticas favorecen el óptimo desarrollo de las plantas y la perfecta maduración de la uva hasta el momento de la vendimia. La pluviosidad alcanza una media de unos 600 L/m<sup>2</sup>, y se concentra en su mayor parte entre los meses de octubre a mayo.

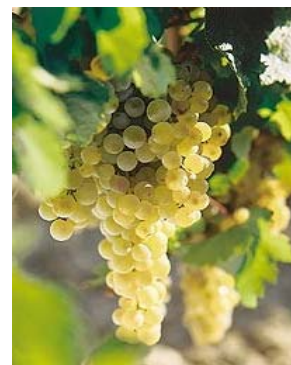


En esta zona hay que destacar la singularidad de su **tierra** blanca llamada “*albariza*”, que tiene un elevado contenido en carbonato cálcico. Además tiene una alta porosidad lo cual ayuda a retener el agua de lluvia caída durante el invierno, proporcionando así una reserva de humedad para nutrir a la cepa en los meses más secos.

**Figura 4.** Viñedo en el cual se muestra el tipo de tierra blanca “*albariza*”.

Además, este tipo de suelo hace que la uva madure mejor ya que le proporciona la claridad necesaria que le pueda faltar, debido a que los racimos se encuentran bajo el manto de hojas. También existen otros tipos de tierras, aunque en porcentajes menores, que se conocen como “*barros*” (vaguadas) y “*arenas*” (zonas costeras).

La **variedad de uva** predominante en esta zona es la Palomino, también llamada *Palomino Fino*. El cultivo de Palomino es muy antiguo por lo que debe considerarse una variedad autóctona que está muy adaptada a esta zona. Es una variedad blanca, de hojas grandes, con racimos numerosos y con gran cantidad de bayas de un tamaño mediano y color verde pálido. El zumo obtenido de esta variedad es incoloro con un contenido moderado en azúcar (10,5°- 12°). Otras variedades blancas utilizadas para la elaboración de los vinos de la Tierra de Cádiz son Moscatel, Pedro Ximénez, Chardonnay, Garrido, Mantúa, Perruno, Macabeo y Sauvignon Blanc.



**Figura 5.** Racimo de uva de la variedad Palomino.

La **extracción del zumo** de la uva para obtener el mosto se realiza con distintos tipos de prensas: neumáticas, horizontales, continuas, etc. Los racimos de uvas son prensados con el raspón ya que proporcionan al hollejo cierta elasticidad y aseguran el drenaje del zumo. La calidad del mosto depende de la presión ejercida en las prensas. La presión ejercida sobre la uva y el modelo de prensa utilizado son factores que influyen en la composición de los mostos, condicionando la presencia de compuestos que se encuentran en las células próximas al hollejo y pepitas. Los mostos de mayor calidad se obtienen a presión inferior a 1 atmósfera y se denominan “*primera yema*” y supone un rendimiento de 70 litros por cada 100 kg de uva. Los mostos obtenidos a presión comprendida entre 1 y 4,5 atmósferas tienen menos finura, y se denominan “*segunda yema*”. Y a los mostos obtenidos a presiones mayores se les denominan “*mostos prensa*”.

Respecto a la **vendimia**, en climas cálidos y cuando se trata de elaborar vinos jóvenes, no es necesario esperar a que la uva madure completamente para su recolección, sino que es preferible vendimiar pronto con el fin de conseguir vinos más finos y afrutados con un mejor equilibrio ácido evitando, además, grados alcohólicos demasiado elevados. Además de su aroma lo que hace agradable a un vino blanco es su frescura, o lo que es lo mismo, una acidez adecuada. La duración de la vendimia es de aproximadamente 20 días, entre finales de Agosto y mediados de Septiembre. La aparición de lluvias puede producir retrasos porque provoca la

paralización de las operaciones de vendimia, ya que la uva debe llegar completamente seca a los lagares de elaboración. Además, los mejores vinos blancos se obtienen partiendo de uvas sanas, por lo que hay que evitar romper y herir las uvas durante la recolección y transporte a los lagares.

## 2.1. Prácticas pre-fermentativas

**Clarificación.** El mosto que surge tras el prensado posee entre 10,5 y 11,5 grados Beaumé, es de color castaño verdoso y posee una densidad superior a la del agua con una viscosidad alta, debido a la presencia en el mismo de una elevada cantidad de materia sólida. Por este motivo, el mosto se deja entre 12 y 24 horas en un decantador donde se favorece la precipitación de los llamados fangos, constituidos por tierra, restos de pepitas, raspones, etc. que aún se encuentran en el mosto. Después, el mosto limpio se trasiega a los fermentadores eliminándose así la materia sólida. El vino que ha sido desfangado o clarificado ofrece ventajas de frescura, de acidez y ligereza.

La **adición de anhídrido sulfuroso** en el mosto es una práctica realizada para asegurar el buen funcionamiento de la fermentación. Cuando el mosto se fermenta con adición de sulfuroso los microorganismos responsables del proceso varían considerablemente y esta variación es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de sulfuroso en el medio. La selección de los microorganismos que se produce con la sulfitación va a condicionar las características del vino.

Las propiedades beneficiosas del sulfuroso para la vinificación se resumen a continuación:

- (i) Protección contra las oxidaciones. El anhídrido sulfuroso protege la vendimia de la acción del oxígeno, sobre todo bloqueando y destruyendo las oxidasas de las uvas.
- (ii) Inhibición y activación de las levaduras. El anhídrido sulfuroso ejerce una acción antiséptica polivalente sobre microorganismos tales como levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas. A dosis suficientes las inhibe completamente. Pero a

dosis más débiles, ejerce un efecto estimulante sobre la actividad de las levaduras y activa la transformación del azúcar.

(iii) Efecto selectivo. A dosis convenientes, el SO<sub>2</sub> provoca una selección entre las especies de levaduras, obstaculiza la multiplicación de las levaduras poco tolerantes al etanol, y favorece el desarrollo de las levaduras elípticas como las de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. También provoca una selección de las levaduras frente a las bacterias, ya que las bacterias son mucho más sensibles que las levaduras.

La **corrección de la acidez** es un proceso indispensable para obtener mostos equilibrados y sanos. La legislación actual permite la adición de ácido tartárico con el fin de llevar el mosto al rango de pH que interese, de manera que altere el desarrollo de las bacterias sin interactuar en el de las levaduras (Valcárcel y col. 1989). El empleo de ácido tartárico y no otro, se debe a que es el específico de la uva y el vino. Las uvas generadas en regiones cálidas, suelen poseer pH altos, por lo que la adición de este ácido incrementa la acidez natural de las mismas. Se suele llevar el pH a valores en torno a 3-3.4, ya que a este valor no se produce ningún efecto de selección sobre las especies de levaduras que intervienen en la fermentación ni se ve afectada la actividad fermentativa de éstas, pero sí se inhibe en gran medida el desarrollo bacteriano.

### 3. Biología de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetos (teleomórficas y anamórficas) y levaduras basidiomicetos (teleomórficas y anamórficas). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca.

### 3.1. Estructura celular

La estructura celular de una levadura es bastante sencilla. Son los organismos eucariotas más primitivos, y por tanto presentan las estructuras típicas de este modelo de organización celular, aunque no tienen cloroplastos.

Presentan una pared celular que cumple con varias funciones, sirve de protección y en ella se establecen enzimas de vital importancia para el organismo, muchas de ellas de carácter hidrolítico. Está formada en su mayor parte por polisacáridos, cuyos monómeros son principalmente glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa, que aparecen estructurados de dos maneras, formando cadenas de orientación radial o helicoidal entre polisacáridos sensibles a hidrólisis ácida o alcalina, o formando capas orientadas de forma paralela a la superficie celular resistentes a hidrólisis ácida o alcalina. Otros componentes mayoritarios son las proteínas y lípidos, aparte de componentes minoritarios como la quitina (Kocková-Kratochvilová 1990).

Un adecuado tratamiento de las células, utilizando mezclas de enzimas hidrolíticos procedentes de otros microorganismos en una solución estabilizada osmóticamente, permite la degradación total o parcial de la pared celular obteniéndose respectivamente protoplastos o esferoplastos. Estas estructuras se introdujeron a mediados del siglo XX como un nuevo modelo de investigación de hongos que permitía un fácil aislamiento de orgánulos y otros componentes celulares, así como el estudio detallado de la propia estructura de la pared. También han sido de vital importancia en estudios genéticos, ya que se ha logrado la fusión y la transformación de protoplastos con material genético exógeno.

Las levaduras poseen además mitocondrias. Una célula diploide de *S. cerevisiae* contiene de 15 a 29 mitocondrias, que ocupan alrededor del 12% del volumen celular (Kocková-Kratochvilová 1990).



### 3.1.1. Constitución genética de las levaduras

El material genético de las levaduras se reparte entre el genoma nuclear, genoma mitocondrial y plásmidos citoplasmáticos. Además, pueden aparecer en el citoplasma dos moléculas de doble cadena de RNA que confieren a la levadura el llamado “factor killer”.

#### 3.1.1.1. ADN cromosómico

El ADN cromosómico de una célula diploide de *S. cerevisiae* constituye alrededor del 80% del total y tiene un tamaño estimado de  $2 \times 10^4$  kilobases (kb) que se reparte entre 32 cromosomas lineales (16 pares de cromosomas) de tamaños que oscilan entre aproximadamente 200-2200 kb. El cromosoma de mayor tamaño es el XII, siendo además el más variable debido a que contiene el ADN ribosómico, es decir, genes que codifican para las distintas subunidades de ARN ribosómico, 25S, 18S, 5.8S y 5S, que forman parte de los ribosomas. Estos genes ribosómicos, se encuentran repetidos en tándem alrededor de 100 veces en el cromosoma XII.

#### 3.1.1.2. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial está constituido por un sólo cromosoma circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 75-85 kb (Foury 1998). Como ocurre con la mayor parte de las mitocondrias, en el caso de las levaduras existen muy pocas proteínas necesarias para las mitocondrias y que sean codificadas por ellas. De hecho la mayor parte del ADN mitocondrial en levaduras no codifica proteínas; la porción no codificante tiene un contenido muy elevado en AT y su función es desconocida. Las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial incluyen el *citocromo b*, *fotocromo c oxidasa* y *ATPasa*.

Existe una clase de mutantes mitocondriales denominados *petite*, en los que la mayor parte de la síntesis de proteínas mitocondriales esta abolida debido a largas deleciones en el ADN mitocondrial. Tales mitocondrias no son funcionales y las levaduras que las contienen son incapaces de realizar la respiración aunque pueden crecer anaeróbicamente (fermentación). El termino *petite* deriva del hecho de que

estos mutantes producen en medios sólidos colonias pequeñas, mientras que las células silvestres forman colonias mayores.

### 3.1.1.3. ADN plasmídico

En la especie *S. cerevisiae* se ha puesto de manifiesto la existencia de un plásmido de ADN bicatenario circular de 2  $\mu$ m de tamaño que contiene aproximadamente 6,3 kb y que se presenta en un número de entre 60 y 100 copias en el citoplasma.

### 3.1.1.4. Factor killer

Además, en el citoplasma, pueden aparecer dos moléculas lineales de doble cadena de ARN (controladas por genes del núcleo) que están relacionadas con una toxina o “factor killer”. Estas dos moléculas de RNA son de diferente peso molecular y se denominan L y M. El tamaño del genoma de L es de 4.5 kb, mientras que el segmento M varía entre 1.3 y 2 kb. M codifica para dos tipos de proteínas, una toxina (de naturaleza glicoprotéica) y un factor inmunitario, y L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas. Algunas cepas de levaduras son inmunes a estas toxinas pero no producen la actividad tóxica. Estas cepas llamadas neutras contienen los genomas L y M, pero el genoma M codifica solamente para la producción del factor inmunitario y no para la producción de la actividad tóxica. En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>28</sub> y K<sub>3GR1</sub> según la agresividad de éstas (K<sub>1</sub> el de mayor agresividad). Parece ser que K<sub>3</sub> y K<sub>3GR1</sub> son solamente variantes del tipo K<sub>2</sub>. La mayoría de las cepas killer de *S. cerevisiae* pertenecen a las clases K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>, las cuales matan una a la otra, aunque son inmunes a su propia toxina.

La toxina segregada por las cepas killer actúa sobre la pared y membrana celulares de las cepas sensibles, alterando el potencial electroquímico de la membrana y causándoles la muerte. Las toxinas K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> aunque son distintas proteínas, tienen un modo de actuar sobre la membrana plasmática similar (Marquina y col 2002).

### 3.2. Nutrición y Crecimiento

Las levaduras necesitan asimilar, vía heterótrofa, carbono y nitrógeno. La fuente de carbono utilizada principalmente por estos organismos consiste en azúcares metabolizados por vías aerobias o anaerobias.

Los azúcares básicos asimilados son: (i) hexosas: D-glucosa, D-fructosa y D-manosa, utilizadas por todas las levaduras vía oxidativa y por algunas especies vía fermentativa, (ii) disacáridos: sacarosa y maltosa, fermentados por algunas especies y lactosa, asimilado raras veces por vía fermentativa y (iii) trisacáridos: rafinosa, asimilado por varias rutas metabólicas distintas.

En cuanto a las fuentes de nitrógeno utilizadas por las levaduras destacan principalmente los ácidos orgánicos. También asimilan nitrógeno por medio de sales de amonio como sulfato, fosfato y nitrato. Los aminoácidos pueden ser utilizados como fuentes potenciales tanto de carbono como de nitrógeno.

Otros elementos indispensables para la fabricación de nuevos componentes celulares son: oxígeno, hidrógeno, fósforo y magnesio. Además en cantidades muy pequeñas son necesarios los oligoelementos: potasio, calcio, silicio, azufre, hierro, cloro, boro, cobre, yodo, manganeso, molibdeno y cinc. Las vitaminas que requieren son: biotina, pantotenato de calcio, tiamina, etc.

Durante el crecimiento vegetativo de una levadura en un cultivo en discontinuo se pueden distinguir cuatro fases principalmente:

**(i) Fase de latencia**, o período de adaptación de la levadura a un nuevo entorno (nutrientes, temperatura, pH, etc.). Durante esta fase, el número de células inoculadas permanece constante, o incluso disminuye. La duración de esta fase depende del tamaño del inóculo y del estado fisiológico de las células.

**(ii) Fase exponencial**. En esta etapa se intensifica la actividad metabólica respecto a la fase anterior, y el número de divisiones celulares (mediante mitosis) crece en

progresión geométrica. La duración de esta etapa depende de la especie de levadura y de las condiciones medioambientales.

**(iii) Fase estacionaria.** Se da cuando los nutrientes comienzan a ser escasos, alcanzándose un equilibrio entre células no viables (muertas) y células viables que aún se siguen dividiendo, de manera que el número de individuos vivos permanece constante. Cuando se agotan los nutrientes, las células de levaduras comienzan a sintetizar metabolitos secundarios (no esenciales para mantener su viabilidad), algunos de los cuales pueden ser perjudiciales para la propia levadura.

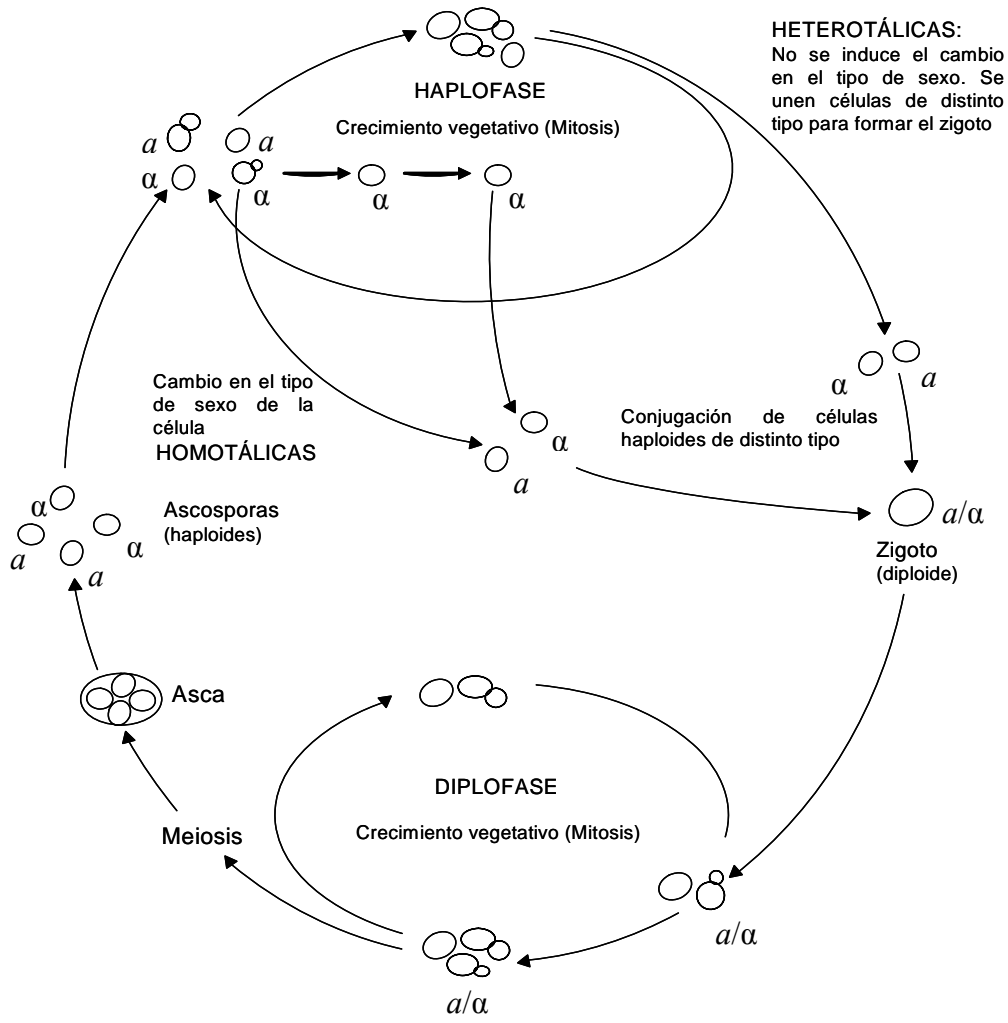
**(iv) Fase de muerte.** Se produce la muerte y lisis celular y el número de individuos no viables supera a los viables. El efecto conjunto se traduce en una disminución constante del número de células vivas hasta la desaparición total de las mismas.

### 3.3. Ciclo de vida y Reproducción

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* tienen un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse como haploides o diploides y de formar cigotos entre células haploides. El tipo de reproducción es normalmente por brote ó gemación mediante mitosis, que es un tipo de reproducción asexual. Bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, en una célula diploide se generan cuatro esporas haploides encapsuladas en un asca (ascosporas). Las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un cigoto diploide mediante conjugación.

Existen tres tipos de células vegetativas en función del tipo sexual, llamadas  $a$ ,  $\alpha$  (ambas haploides) y  $a/\alpha$  (diploides). Las células del tipo  $a$  y  $\alpha$  se conjugan entre sí para dar lugar a cigotos de tipo  $a/\alpha$ , cuya eficiencia de apareamiento es mucho más alta que entre las del mismo tipo (es muy baja o no se da). Los tipos sexuales en *S. cerevisiae* están controlados por un locus en el cromosoma III, llamado *MAT* (del inglés *mating type*, apareamiento) pudiendo aparecer dos alelos,  $a$  y  $\alpha$ .

Las cepas que pueden mantenerse estables durante muchas generaciones como haploides, siendo  $a$  ó  $\alpha$  se llaman **heterotáticas**. Mientras que las cepas en las que el tipo de sexo se invierte ( $a$  cambia a  $\alpha$  y viceversa) y la unión, para formar un cigoto, se realiza entre células que proceden de una misma espора se llaman **homotáticas**. La mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son homotáticas. En las células heterotáticas no se induce el cambio en el tipo de sexo y los cigotos se forman por unión de dos células haploides de tipos opuestos. En el caso de las homotáticas la célula madre es la que cambia el tipo de sexo y se une con una célula hija de tipo sexual opuesto para dar un diploide  $a/\alpha$ . La mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son por lo general diploides y homotáticas y resulta difícil que en ellas se induzca la esporulación y por tanto la reproducción sexual.



**Figura 7.** Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*.  $a$  y  $\alpha$  hacen referencia a los alelos que controlan los tipos sexuales.



**Figura 6.** Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una célula de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* reproduciéndose mediante gemación durante su ciclo celular.

#### 4. Origen y evolución de las levaduras vínicas

Existe una cierta controversia sobre el origen y evolución de las cepas de levaduras que forman parte de la fermentación espontánea del vino. Algunos estudios recientes se han centrado en averiguar sobre todo si las levaduras tienen su origen en las uvas que se encuentran en los viñedos, o por el contrario si lo tienen en las bodegas de elaboración (Strum y col. 2006), aunque pocos han profundizado sobre la evolución de las poblaciones de levaduras desde las uvas hasta el vino (Demuyter y col. 2004; Ciani y col. 2004). Le Jeune y colaboradores (2006) muestran que realmente las levaduras involucradas en la fermentación espontánea pueden tener su origen tanto en el viñedo como en la bodegas,

En la producción de vino las células de levaduras están presentes en las uvas, durante unas pocas semanas al año, y posteriormente en la fermentación. Pero existen numerosos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan a la presencia y crecimiento de estos microorganismos en la superficie de las uvas, como por ejemplo la lluvia, maduración de la uva, temperatura, daños físicos debidos a pájaros e insectos, ataque de mohos, y aplicación de insecticidas y pesticidas. También se ha determinado que las operaciones y la tecnología empleadas durante la vinificación, como clarificación del mosto, adición de dióxido de sulfuro, temperatura y composición final del mosto, van a influir en la diversidad de levaduras que existan en el mosto (Longo y col. 1991; Fleet 1999).

Se han propuesto varias teorías sobre dónde se encuentran las levaduras y cómo llegan a formar parte del mosto que posteriormente fermenta.

(i) Algunas evidencias recientes sugieren que las levaduras son llevadas al viñedo por los insectos, cuando las uvas están casi maduras, desde sus nidos o colmenas. Se ha demostrado (Mortimer & Polsinelli 1999) que estos insectos lo primero que hacen es comer o dañar las bayas. Estas bayas dañadas junto con otras muchas bayas intactas son entonces prensadas y el mosto obtenido destinado a la fermentación. Además se ha demostrado que las levaduras en las bayas dañadas, donde se desarrollan parcialmente, pueden proporcionar el principal inóculo para las fermentaciones naturales e incluso pueden hacer contribuciones significativas cuando las fermentaciones son inoculadas (Mortimer 2000). En este modelo el reservorio natural de las levaduras está en los nidos o colmenas de los insectos, o incluso en el propio insecto formando parte de su microbiota intestinal.

(ii) Un segundo modelo propone que las células de las levaduras están presentes en las paredes de las bodegas y equipamientos, incluidos los depósitos de fermentación (Beltran y col. 2002; Sabate y col. 2002; Sangorrin y col. 2002) y desde allí entran a formar parte de la fermentación (Ciani y col. 2004). Cuando la fermentación ha sido completada, las levaduras vuelven a las paredes de la bodega en un ciclo cerrado, proponiéndose que se produce una evolución para seleccionar las levaduras mejor adaptadas al proceso (Martini 1993). El hecho de encontrar levaduras residentes en bodegas depende de algunos aspectos como por ejemplo, las condiciones específicas en las que se realizan las fermentaciones, al uso de cepas iniciadoras de la fermentación (levaduras comerciales) que si se utilizan con frecuencia en una bodega, terminan dominando sobre las cepas indígenas (Vaughan-Martini & Martín 1995; Beltran y col. 2002). La edad de la bodega es un aspecto también de interés ya que en bodegas antiguas se pueden crear ecosistemas que comprendan cepas específicas y bien adaptadas (Santamaría y col. 2005).

(iii) Un tercer modelo propone que las células de *S. cerevisiae* se encuentran solamente asociadas con las actividades humanas (Naumov 1996). De acuerdo con este modelo, las levaduras que se hallan en el viñedo entran a formar parte de la fermentación con las uvas. El modelo también propone que las levaduras pueden ser transportadas del viñedo a la bodega o a los equipos que están en los lagares de elaboración por insectos y así consiguen formar parte de la fermentación. Posteriormente, los insectos transportan a las levaduras nuevamente desde la bodega

hasta el viñedo. El hecho que avala este modelo es que *S. cerevisiae* se ha encontrado solamente en zonas cercanas a la civilización humana y no en regiones remotas. Sin embargo, las especies de levaduras *S. paradoxus* y *S. bayanus*, que están estrechamente relacionadas con *S. cerevisiae*, sí que se han encontrado en estas regiones remotas.

En algunas zonas industrializadas de Chile, existe una práctica usual en la que se utilizan los restos de mosto ya fermentados como fertilizantes de plantas, lo que podría permitir que algunas de las cepas de levaduras permanecieran en el campo hasta la siguiente vendimia. De esta forma las cepas podrían estar presentes en las uvas cosechadas al año siguiente favoreciéndose su rápida proliferación durante las fermentaciones espontáneas (Ganga & Martínez 2004).

## 5. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto corregido se ha dejado decantar.

El nombre de fermentación, que procede de la palabra latina *fervere*, que significa hervir, se dio en principio a los fenómenos de descomposición de la materia orgánica con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas diversas especies de levaduras y bacterias. El principal papel de las levaduras vínicas es catalizar la conversión del azúcar del mosto en etanol y dióxido de carbono de una forma rápida y completa sin que se desarrollen sabores indeseables.

La reacción química más simple del proceso fermentativo fue la propuesta por Gay-Lussac, en la cual el azúcar del mosto es transformado en etanol y dióxido de carbono, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están involucradas al menos doce reacciones distintas y diversos subproductos.



## 5.1. Sucesión de especies de levaduras durante la fermentación espontánea

Durante la fermentación espontánea de los mostos se da una sustitución secuencial de distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En una primera, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, o en forma de limón, productoras de bajo grado alcohólico que pueden producir importantes concentraciones de ácidos volátiles (ácido acético). Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación y son sensibles al anhídrido sulfuroso, de manera que su participación es reducida cuando las vendimias han sido muy sulfitadas. Suelen ser levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*, destacando las de los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* *Pichia* y *Hansenula* (Fleet & Heard 1993). En la segunda y tercera fases de la fermentación las levaduras apiculadas son desplazadas totalmente por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, que suelen tener forma elíptica, invaden rápidamente el medio y son bastante resistentes al etanol producido durante la fermentación.

Los estudios realizados sobre los agentes fermentativos de los mostos vienen siendo numerosos desde hace varias décadas, y en ellos se ha puesto de manifiesto ésta diversidad y variabilidad de las distintas poblaciones que se van sucediendo durante el proceso, demostrando que los principales agentes de la fermentación espontánea son cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet & Heard 1993). Esta variabilidad de cepas juega un papel importante en aportar parte de las características sensoriales al vino resultante (Pérez-Coello y col. 1999).

### 5.1.1. Factores que afectan a las poblaciones de levaduras en una fermentación espontánea

Existen determinados factores que pueden afectar a la dinámica de las poblaciones y diversidad de cepas de levaduras presentes durante la fermentación natural o espontánea del mosto. Algunos de ellos son:

(i) **Prácticas pre-fermentativas**, como clarificación y adición de SO<sub>2</sub> al mosto. En los mostos sulfitados la población de levaduras presente durante la fermentación está

representada por cepas *S. cerevisiae*, ya que se causa una represión de las levaduras sensibles como las no-*Saccharomyces* (Longo 1991) y además previene contra efectos no deseados como la elevada acidez volátil (Constantí y col. 1998). La clarificación puede provocar una reducción mayor en la totalidad de la población nativa de levaduras (Ciani & Vincenzo 2002).

También se ha puesto de manifiesto que operaciones como el estrujado y el prensado de las uvas afectan significativamente a la diversidad de levaduras (Sturm y col. 2006). En general, los tratamientos técnicos van a tener una cierta influencia sobre el desarrollo de las cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación espontánea (Epifanio y col. 1999).

**(ii) Temperatura de fermentación:** Hace que disminuya la proporción de células de levaduras en crecimiento y modifica la ecología de la fermentación (Torija y col. 2002). Además, determinadas levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* evolucionan mejor a bajas temperaturas, como por ejemplo las apiculadas de los géneros *Kloeckera*, con lo cual contribuyen más en las fermentaciones que se dan por debajo de 20 °C, y tal influencia se puede ver reflejada posteriormente en la composición química y en las propiedades sensoriales del vino (Fleet & Heard 1993; Lambrechts & Pretorius 2000).

**(iii) Adición de un inóculo iniciador realizado con levadura comercial:** La utilización de cultivos de levaduras iniciadores de la fermentación, producen un desorden en el equilibrio del ecosistema, dando lugar al desarrollo de otras cepas silvestres en minoría, pudiendo inhibir el crecimiento de las cepas naturales responsables de la fermentación (Querol y col. 1992b). También se produce una disminución en la heterogeneidad de cepas (Gutiérrez y col. 1997; Egli y col. 1998; Blanco y col. 2006) La utilización de un correcto cultivo iniciador, que tenga una alta población de *S. cerevisiae*, inhibe el crecimiento de las cepas no-*Saccharomyces* (Ganga & Martínez 2004) y esto puede permitir que la adición de SO<sub>2</sub> se disminuya o evite, lo cual es más beneficioso para la salud (Constantí y col. 1998).

**(iv) Las bodegas:** Se ha comprobado que la variabilidad de las distintas cepas de levaduras que existen en el ecosistema de las bodegas depende de la edad de éstas, y

las condiciones de cada cosecha (composición del mosto, procesos elaboración, sulfitación, temperatura, etc.) van a determinar el desarrollo posterior de las cepas durante la fermentación (Santamaría y col. 2005).

**(v) Condiciones climáticas:** Van a afectar al desarrollo de las levaduras durante la fermentación, por ejemplo las condiciones de lluvia y humedad hacen que durante la fermentación, si además la uva no está en condiciones sanitarias buenas, se detecten levaduras apiculadas y oxidativas como *Pichia*, ambas no pertenecientes al género *Saccharomyces* (Longo y col. 1991).

## **5.2. Factores que afectan al curso de la fermentación**

### **5.2.1. Composición del mosto**

Cada zona enológica se puede considerar como un ecosistema en el que existirá una amplia diversidad de cepas de levaduras representativas de esa área (Vezinhet y col. 1992; Sabate y col. 1998; Martínez y col 2004; Le Jenué y col. 2006). La presencia de estas cepas en el mosto, una vez prensado, y posteriormente en la fermentación estará condicionada por diversos factores entre los que destacan las prácticas pre-fermentativas y las condiciones medioambientales, como se ha mencionado anteriormente. Pero también, el desarrollo de estas cepas va a depender en parte de la composición química y microbiológica del mosto.

#### **5.1.1.1. Composición química**

En general el mosto contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las levaduras. Sin embargo, la composición química puede variar de un año a otro en función de varios parámetros como las condiciones climáticas, que condicionan la calidad de la cosecha y por tanto del mosto, o el grado de maduración de la uva antes de vendimiarse. La variación en la concentración de algunos de los nutrientes del mosto puede dar lugar a fermentaciones difíciles. Por ejemplo, la alta concentración de azúcar afecta directamente a las levaduras

provocando inicios del proceso complicados, a no ser que se utilicen levaduras capaces de fermentar esos mostos. La variación en las concentraciones de nitrógeno asimilable en el mosto puede producir un “efecto selectivo” sobre las cepas de levaduras (Granchi y col. 2003), pero cuando se agota el nitrógeno afecta al crecimiento celular pudiendo ser causa de parada fermentativa (Bisson 1999).

#### 5.2.1.2. Composición microbiológica. Factor killer

Se sabe que durante el proceso de fermentación se van sucediendo distintas especies de levaduras. Las diversas cepas participantes se influyen recíprocamente en sentido favorable o desfavorable, originando como consecuencia de esas interacciones un sinergismo en sus acciones vitales, o un antagonismo. El antagonismo también llamado antibiosis, se manifiesta en la convivencia de dos o más especies microbianas cuando una de ellas, al desarrollarse más rápidamente, termina con los nutrientes o cambia bruscamente las condiciones ambientales, o cuando algunas especies producen compuestos químicos activos contra otras especies, causando bien la paralización de su desarrollo (acción antiséptica), su muerte (acción microbicida) o la muerte acompañada de lisis (acción lítica).

Uno de los más importantes antagonismos que se conocen es el llamado “factor matador” o “factor killer”, descubierto en levaduras en el año 1963 por Markower y Bevan, que definieron los fenotipos killer (K), sensible (S) y neutro (N) para *S. cerevisiae* (Markower & Bevan 1963).

Las cepas killer no sólo se limitan al género *Saccharomyces* sino que también se han encontrado en otros géneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Tilletiopsis* y *Zygosaccharomyces*.

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>28</sub> y K<sub>3GR1</sub>, aunque la mayoría de las cepas killer aisladas de la fermentación son generalmente del tipo K<sub>2</sub> y K<sub>28</sub>, debido probablemente a que el bajo pH óptimo para la actividad de estas toxinas se encuentra en el mosto (pH 2.8-3.8).

Las levaduras vínicas silvestres con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo (Coratza y col. 1992; Frazier & Dubourdieu 1992; Shimizu 1993; Vagnoli y col. 1993; Versavaud y col. 1995; Da Silva 1996; Izgü y col. 1997; Regodón 1997; Lopes y col. 2005). La presencia de estas levaduras en el mosto y posteriormente en la fermentación puede significar un problema en las fermentaciones que son inoculadas con levaduras seleccionadas, ya que si el inóculo está preparado con levaduras sensibles, como son muchas de las levaduras comerciales (Marquina y col. 2002), pueden llegar a ser suprimidas por las cepas killer durante la fermentación. Como consecuencia se pueden producir fermentaciones lentas o incluso paradas, y aumentar la acidez volátil, la producción de H<sub>2</sub>S y aromas indeseables. Esto da como resultado la obtención de un producto final con características sensoriales no deseadas, que puede originar pérdidas económicas para la industria (Van Vuuren & Jacobs 1992; Medina y col. 1997; Pérez y col. 2001).

Por este motivo, cuando se realizan fermentaciones inoculadas con levaduras seleccionadas uno de los criterios a tener en cuenta a la hora de elegir la cepa es que tenga fenotipo killer, de esta forma puede suprimir a otras cepas silvestres no deseadas para dirigir la fermentación.

Además el uso de determinadas cepas killer puede proporcionar una alternativa en la utilización de anhídrido sulfuroso utilizado para eliminar, en parte, a estas levaduras no deseadas (Yap y col. 2000).

### **5.2.2. Temperatura**

La temperatura de fermentación es uno de los parámetros más importantes que afectan directamente a la marcha de la fermentación y a la ecología de los microorganismos que se encuentran presentes en el mosto (Fleet & Heard 1993). Dependiendo del tipo de vinificación que se vaya a realizar, la temperatura será una u otra, si por ejemplo, se trata de fermentar mostos tintos la temperatura empleada será alta, en torno a los 30 °C, mientras que para la fermentación de vinos blancos se debe mantener entre 17-20 °C para que el producto final mantenga las características aromáticas deseadas y un grado alcohólico adecuado.

En la vinificación de blancos, cuando se produce la fermentación tumultuosa (inicio de la fermentación) la temperatura aumenta con rapidez, llegando hasta los 30°-35° C, es el momento en el que hay que controlar la temperatura, porque aunque ayuda a iniciar la fermentación puede provocar un efecto inhibitorio en el crecimiento de las células de levaduras. El aumento de la temperatura puede provocar también la evaporación de alcohol y de compuestos aromáticos primarios procedentes de las uvas y además fomentar el desarrollo de bacterias dañinas. Por tanto, para que esto no ocurra, es necesario mantener en los depósitos una temperatura adecuada, mas bien baja (15-20 °C), que aunque producirá inicios de fermentación lentos, se consumirán más rápido los azúcares porque se mantendrá una proporción de biomasa mas elevada durante todo el proceso generando un grado alcohólico mayor (Torija y col. 2002). La temperatura se suele controlar mediante la utilización de camisas de agua fría que cubren los depósitos.

El problema de fermentar a bajas temperaturas es que existen determinadas especies de levaduras no-*Saccharomyces* que tienen una oportunidad de crecimiento mayor y son más capaces de contribuir a la fermentación a bajas temperaturas que las del género *Saccharomyces* (Sharf & Margalith 1993; Head & Fleet 1988), pudiendo incluso llegar a predominar en las fermentaciones reflejándose su efecto en la composición química y características sensoriales del vino. Las bajas temperaturas aumentan la duración de la fermentación alcohólica porque las células permanecen vivas más tiempo debido a que se alarga la fase estacionaria, aunque disminuye la tasa de crecimiento de las levaduras y modifica la ecología de la fermentación vínica (Torija y col. 2002). De manera que, aunque fermentar por debajo de 20 °C tiene aplicaciones industriales interesantes, porque se mantienen los aromas primarios de las uvas, también tiene un efecto adverso en el crecimiento celular, ya que incrementa el estrés de las levaduras durante la producción de vino (Bauer & Pretorius 2000). Parece ser que la composición lipídica de la membrana plasmática de las levaduras se modifica para corregir los cambios producidos en su fluidez causados por las bajas temperaturas (Suutari y col. 1990; Torija y col. 2002).

En cuanto a las fermentaciones que se llevan a cabo a temperaturas elevadas (en torno a 35 °C) también presentan ciertos riesgos ya que se pueden producir paradas fermentativas dejando el mosto con concentraciones altas de azúcares sin

consumir, produciendo por tanto fermentaciones incompletas con bajo contenido en etanol. A temperaturas elevadas la fase estacionaria de crecimiento es muy corta porque las células mueren debido al efecto etanol-temperatura, ya que el etanol se vuelve más tóxico con la temperatura, sin que éstas lleguen a consumir todos los azúcares, siendo por tanto el rendimiento alcohólico menor.

## 6. Fermentaciones inoculadas

En el proceso industrial de vinificación ha existido una considerable controversia sobre la utilización de inóculos iniciadores de la fermentación, ya que éstos pueden afectar a la dinámica de las poblaciones de levaduras naturales que se dan en las fermentaciones espontáneas reduciendo la variabilidad de cepas (Beltran y col. 2002) y, por tanto, la complejidad y tipicidad del vino resultante. Por eso, muchos enólogos prefieren las fermentaciones espontáneas frente a las inoculadas con levaduras seleccionadas.

### 6.1. Empleo de levaduras secas activas (LSA)

Aunque los cultivos líquidos de levadura vínica han sido utilizados desde 1930 (Instituto Laclaire, Francia), las levaduras secas activas no se introdujeron hasta mediados de los años 50. Las primeras levaduras secas activas fueron producidas en California (Estados Unidos) a mediados de los 60 pero solamente se comercializaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Montrachet y Pasteur Champagne). Estas cepas fueron utilizadas universalmente como cepas iniciadoras en todo tipo de fermentaciones pero, aunque fueron aisladas originalmente de fermentaciones naturales (Johnston y col. 2000), se vio que no eran las más adecuadas para fermentar todos los tipos de mostos ya que éstos varían según las distintas variedades de uvas y cada región geográficas. El uso de estas levaduras comerciales no se extendió hasta finales de la década de los 70. Desde entonces, en varias zonas de Europa, Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica y Australia se llevan a cabo fermentaciones utilizando estas levaduras secas activas como iniciadores de la

fermentación, aunque en otras zonas el uso de estas levaduras está todavía restringido como en el sur de América (Martínez y col. 2004). Además el número de levaduras vínicas disponibles en el mercado para su utilización como iniciadores de la fermentación se ha disparado en los últimos años (Degre 1993; Pretorius 2000; Fernández-Espinar y col. 2001).

El origen de las levaduras secas o liofilizadas para su uso en la industria vinícola como cultivo iniciador puede ser: (i) distinto al de una determinada zona de vinificación como es el caso de la mayoría de las levaduras comerciales; (ii) o puede ser una cepa autóctona previamente seleccionada por tener las características apropiadas para dirigir una fermentación en una región enológica.

Las características que se le exigen a una levadura seca activa son, principalmente, que produzca fermentaciones vigorosas, con una fase de latencia corta frente a las fermentaciones espontáneas, reproducibles, predecibles y con baja concentración de azúcar residual, que posea una buena tolerancia al etanol, a la temperatura y al anhídrido sulfuroso y que produzca un buen perfil aromático exento de aromas no deseados.

## **6.2. Selección de cepas de levaduras autóctonas**

La utilización de cepas de levaduras comerciales es una práctica común en la mayoría de las bodegas para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año y reducir también el riesgo de contaminación. Pero esta práctica puede determinar que se produzca una sustitución progresiva de la microbiota local (autóctona) y como consecuencia una pérdida en la tipicidad de los vinos de una región determinada (Cappello y col. 2004).

Para evitar esta pérdida de tipicidad hoy día se tiende a seleccionar cepas autóctonas que están muy bien adaptadas a cada región productora de vino y, por tanto, a las condiciones climáticas, a las variedades de uvas de cada zona y a los mostos obtenidos de ellas y a las prácticas y técnicas de vinificación utilizadas



(Ramón 1997; Heard 1999). Estas cepas serán las responsables, en parte, de las características sensoriales de los vinos obtenidos en cada región.

### 6.2.1. Criterios de selección

La selección de cepas adaptadas a distintos tipos de vinificación es muy importante para asegurar por un lado el inicio, desarrollo y finalización de la fermentación, y por otro la mejora de las cualidades del producto final. Algunos criterios de selección a tener en cuenta para seleccionar una levadura y establecer sus propiedades enológicas son los siguientes:

- Alto poder fermentativo
- Producción mínima en acidez volátil
- Regularidad en la actividad fermentativa
- Curva termodinámica adecuada, tratando de paliar el problema térmico en los depósitos de fermentación
- Alta tolerancia al etanol
- Resistencia al SO<sub>2</sub>
- Fenotipo killer
- Floculación
- Producción de un buen perfil aromático exento de aromas no deseados
- Máxima reducción de la fase de latencia

Estos criterios se han clasificado como favorables, pero existen otros considerados no favorables como por ejemplo:

- Producción de H<sub>2</sub>S
- Formación de espuma
- Producción de acidez volátil

Uno de los primeros pasos a la hora de seleccionar cepas autóctonas es caracterizar cómo es la dinámica de las poblaciones en una fermentación espontánea ya que serviría de ayuda para conocer las cepas autóctonas más representativas de

entre las poblaciones silvestres. Esta primera aproximación ha sido seguida por diversos grupos de investigación (Esteve-Zarzoso y col. 2001; Raspor y col. 2002; Redzepovic y col. 2002). Después, el segundo paso en la selección sería evaluar las propiedades enológicas de estas cepas en condiciones de laboratorio (Lopes y col. 2002).

En nuestro estudio las características de interés enológico aplicadas, en principio, para elegir las cepas autóctonas más apropiadas para dirigir fermentaciones industriales fueron:

- (i) Alto poder fermentativo
- (ii) Buena tolerancia al etanol
- (iii) Fenotipo killer

### **6.3. Pie de cuba**

El pie de cuba se podría definir como un volumen de mosto en plena fermentación, conducido en las mejores condiciones posibles, que sirve para iniciar la fermentación del mosto fresco y nos garantiza el predominio de las mejores levaduras para el proceso enológico.

Antes de conocer la importancia del protagonismo de las levaduras y lo que representaba en la buena marcha del proceso el factor biológico, el pie de cuba se preparaba unos días antes de la vendimia (pre-vendimia) recolectándose racimos de uvas sanos y bien maduros de los que se obtenía mosto que se dejaba fermentar hasta alcanzar 6-8 ° alcohólicos. En esas condiciones, cuando predominaban las levaduras de la segunda fase de la fermentación, este fermento se añadía a los depósitos donde se hallaba el mosto procedente de la vendimia.

En el caso de inocular las fermentaciones con levaduras secas activas, lo primero que se hace es re-hidratar las levaduras en agua y mosto. Pero la dominancia de un cultivo iniciador no siempre está garantizada ya que depende de las condiciones específicas de la vinificación como por ejemplo (i) viabilidad y nivel

del inóculo, (ii) uso correcto del inóculo, (iii) características fisiológicas y metabólicas del inóculo iniciador y (iv) tecnología empleada en la elaboración del vino (clarificación, temperatura de fermentación adición de SO<sub>2</sub>, etc.) (Ciani & Vincenzo 2002).

En algunos tipos de vinificación se ha propuesto la pre-adaptación de los cultivos iniciadores a las condiciones específicas del proceso, para asegurar la dominancia del cultivo y mejorar el desarrollo de las fermentaciones (Llauradó y col. 2005).

Cuando se trata de inocular volúmenes de mosto muy grandes para realizar fermentaciones en condiciones industriales lo más adecuado es realizar varios escalamientos a partir del inóculo iniciador hasta alcanzar un volumen que asegure el inicio de la fermentación. En el caso de disponer de levaduras conservadas en condiciones de laboratorio y no liofilizadas (LSA) se debe preparar un pie de cuba que tendrá dos fases bien diferenciadas, una primera llevada a cabo en un laboratorio en condiciones muy controladas utilizando pequeños volúmenes de mosto estéril, y otra segunda realizada en la bodega para conseguir el volumen final de pie de cuba deseado. En este caso para realizar los escalamientos, el mosto utilizado no estará estéril.

#### **6.4. Fermentaciones inoculadas frente a fermentaciones espontáneas**

En el proceso industrial de vinificación ha existido una considerable controversia sobre la utilización de levaduras comerciales secas activas (LSA) como inóculos iniciadores de la fermentación, ya que éstos pueden afectar a la dinámica de las poblaciones de levaduras naturales que se dan en las fermentaciones espontáneas, reduciendo la variabilidad de cepas silvestres (Beltran y col. 2002) y, por tanto, la complejidad y tipicidad del vino resultante. Incluso esta reducción de la diversidad de levaduras se ha observado en fermentaciones espontáneas realizadas en bodegas en las que se habían utilizado previamente levaduras secas activas (Constantí y col. 1997; Santamaría y col. 2005; Blanco y col. 2006). Por este motivo muchos enólogos prefieren las fermentaciones espontáneas a las inoculadas con levaduras

secas activas. Pero hay que destacar los problemas que se pueden presentar al fermentar de forma espontánea, como por ejemplo inicios tardíos de la fermentación, la proliferación de levaduras contaminantes u otras levaduras indígenas que no aporten las características deseadas al producto final, fermentaciones lentas, etc.

El problema de la pérdida de tipicidad se resuelve utilizando levaduras autóctonas seleccionadas, de manera que la inoculación con cepas adecuadas a cada tipo de vinificación presenta ciertas ventajas sobre la fermentación espontánea, consiguiendo controlar, en parte, la fermentación debido a la imposición de la cepa inoculada.

Las ventajas que ofrece la inoculación son, por tanto:

- Fermentaciones vigorosas con un rápido comienzo del proceso que se traduce en una fase de latencia corta
- La no proliferación de levaduras no-*Saccharomyces*
- Realización completa de la fermentación alcohólica con baja concentración de azúcares residuales

Aunque también es importante a la hora de inocular tener una concentración adecuada de levaduras, ya que ésta va a determinar la dinámica del proceso.

## **7. Técnicas de identificación y caracterización genética en levaduras industriales**

Hasta la década de los noventa, las pruebas microbiológicas clásicas basadas en características morfológicas, bioquímicas y reproducción sexual se utilizaban para identificar y caracterizar levaduras vínicas. Pero estos métodos sólo permitían discriminar entre especies, siendo muy laboriosos e imprecisos (Barnett y col. 1990; Deak 1993). El reciente desarrollo de las técnicas moleculares, basadas en el estudio directo del ADN, ha permitido conocer la distribución de la especie *Saccharomyces cerevisiae* a nivel de cepa.

Algunas de estas técnicas son: *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE) y *Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial* (RFLP-ADNmt). La ventaja que presentan frente a las técnicas clásicas es que muestran la amplia diversidad existente entre las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de procesos industriales y de la naturaleza (Querol y col. 1992a; Pérez y col. 2001; Schuller y col. 2004) y permiten, en fermentaciones inoculadas, conocer si la cepa de levadura utilizada es la que dirige el proceso o no. Por tanto estas técnicas son una poderosa herramienta para el control industrial y para el estudio de la ecología y dinámica de poblaciones de cepas naturales que están involucradas en los procesos de fermentación del vino.

### 7.1. *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE). **Cariotipo Electroforético**

Las siglas PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) engloban a una serie de técnicas utilizadas para la separación de moléculas cargadas como el ADN, que tienen en común la aplicación de un campo eléctrico cuya dirección varía en forma de pulsos durante la electroforesis. De esta manera se consigue una dinámica de migración de las moléculas de ADN a través de un gel de agarosa más compleja que permite el aumento del poder de resolución de la técnica con respecto a una electroforesis convencional, consiguiendo separar moléculas de gran tamaño o cromosomas que se diferencian entre sí en relativamente pocas pares de bases.

La utilización de esta técnica requiere una preparación de las muestras para adecuarlas a las condiciones de tratamiento, ya que para separar cromosomas mediante la acción de un campo eléctrico, éstos deben ser liberados del núcleo de las células.

Tras la electroforesis en campo pulsante los cromosomas aparecen dispuestos en forma de patrón de bandas o **cariotipo electroforético**. Los patrones de distintas cepas pueden presentar diferencias en el número, intensidad y movilidad electroforética de las bandas. Estas diferencias son las que ayudan a identificar y caracterizar cepas individuales en un proceso industrial.

Utilizando la electroforesis en campo eléctrico homogéneo, una modalidad de PFGE, Chu y col. (1986) resolvieron el cariotipo de *Saccharomyces cerevisiae* en 15 bandas, correspondiendo cada una a un cromosoma distinto siendo el rango de tamaño de éstos de 200 a 2200 kb. Las bandas con tamaños por debajo de 500 kb son características de cepas pertenecientes a esta especie.

Yamamoto y colaboradores (1991) consiguieron diferenciar claramente 51 patrones electroforéticos de 77 cepas vínicas aisladas de la fermentación mediante PFGE. Afirmaron que cepas con idénticos patrones cromosómicos pueden ser consideradas la misma cepa, siendo esta técnica una herramienta útil y fiable para la diferenciación de cepas.

### **7.1.1. Polimorfismo cromosómico**

Con la técnica de electroforesis en campo pulsante se ha podido determinar que existe un polimorfismo muy elevado entre las poblaciones de cepas silvestres aisladas de la fermentación (Vezinhet y col. 1992;) y otros procesos industriales (Codón y col. 1998). Las variaciones en el número de cromosomas halladas en las cepas de levaduras que participan en procesos industriales, como la elaboración del pan, cerveza o vino, se interpretó como una consecuencia de los mecanismos de adaptación de estos microorganismos a las condiciones del entorno industrial, que implica la existencia de una fuerte presión de selección actuando sobre el genoma nuclear (Bakalinsky & Snow 1990).

La causa principal del polimorfismo es debida a reorganizaciones cromosómicas que implican cambios en el cariotipo durante el crecimiento vegetativo de las cepas de levaduras (Longo & Vezinhet 1993). Las reorganizaciones cromosómicas son ventajosas porque generan variabilidad genética en organismos que carecen de ciclo de vida sexual, como la mayoría de las levaduras vínicas, y además permiten que evolucionen y se adapten a un medio industrial determinado -evolución adaptativa- (Rachidi y col. 1999; Puig y col. 2000; Infante y col. 2003). Esta afirmación valida la hipótesis de considerar cepas distintas, al menos desde el punto de vista industrial, a aquellas con cariotipos electroforéticos distintos.

En levaduras vínicas las reorganizaciones cromosómicas son debidas generalmente a procesos de recombinación mitótica, ya que en estos organismos la frecuencia de esporulación mediante meiosis es baja (Longo & Vezinhet 1993; Ibeas & Jiménez 1997; Nadal y col. 1999), aunque existen casos en los que se producen recombinaciones durante la meiosis en alta proporción (Codón y col. 1997).

La recombinación, definida como el proceso de intercambio o de transferencia de información entre moléculas de ADN puede ser de dos tipos (Prado y col. 2003): (i) recombinación homóloga (HR) y (ii) recombinación no homóloga (*non homologous end joining, NHEJ*) que participa en la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN.

La recombinación homóloga juega un papel muy importante durante el ciclo de vida de muchos organismos, tanto en meiosis como en mitosis. En meiosis una de sus funciones es la de producir el entrecruzamiento entre las cromátidas de los cromosomas homólogos para generar variabilidad genética. Durante la mitosis es el mecanismo principal que promueve las reparaciones de las lesiones que pueda sufrir el ADN por diversas causas (Cromie y col. 2001).

La recombinación homóloga, producida en mitosis en levaduras vínicas y durante el crecimiento vegetativo, puede darse entre secuencias homólogas de cromosomas homólogos (Longo & Vezinhet 1993), o bien entre secuencias homólogas de cromosomas no homólogos (recombinación oculta) (Nadal y col. 1999; Wolfe & Shields 1997). La recombinación homóloga no alélica (entre cromosomas no homólogos) se da al azar entre secuencias homólogas, que se encuentran repetidas y repartidas por todo el genoma. Estas secuencias son: (i) transposones de la familia Ty, que son secuencias capaces de saltar a otra posición distinta dentro del genoma nuclear; (ii) secuencias LTRs (Long Terminal Repeat), que son repeticiones en tándem que flanquean a los transposones, y pueden ser de varios tipos,  $\delta$ ,  $\tau$ ,  $\omega$  y  $\sigma$ ; (iii) secuencias teloméricas y subteloméricas Y' y X, que aparecen repartidas en tándem en el extremo de los cromosomas; (iv) genes del ARN ribosómico y (v) genes del ARN transferente.

Además, estas secuencias, así como otras microhomologías entre secuencias no alélicas pueden utilizarse como cebadores en el proceso de reparación de roturas de la doble hélice mediante *NHEJ*, que genera reorganizaciones cromosómicas al producirse entre fragmentos de cromosomas distintos. La inducción del proceso *NHEJ* para la reparación de roturas de la doble hélice se ha propuesto como una causa fundamental de variabilidad en el cariotipo y evolución adaptativa en levaduras industriales (Infante y col. 2003).

En levaduras industriales se ha determinado que los transposones de los tipos Ty1 y Ty2 están repartidos por todo el genoma, así como las secuencias subteloméricas Y' (Codón y col. 1998).

Aunque los procesos de recombinación mitótica pueden explicar el alto polimorfismo detectado entre las levaduras industriales, cuyos ciclos de vida son generalmente asexuales, Mortimer y colaboradores (1994) propusieron un modelo llamado "*Genome Renewal*" como posible alternativa. El modelo propone que las cepas vínicas diploides que acumulan mutaciones deletéreas como heretocigotas pueden llegar a esporular en condiciones de crecimiento vegetativo. Dado que estas cepas son mayoritariamente homotálicas, pueden formar células diploides homocigotas, generando así nuevos clones que puedan sustituir al resto si durante ese proceso adquirieron alguna ventaja selectiva. Pero algunos hechos como el alto nivel de heterocigosidad y la baja frecuencia de esporulación en las levaduras vínicas (Bakalinsky & Sannow 1990; Barre y col. 1993; Guijo y col. 1997) no están a favor de esta teoría.

Las cepas de levaduras vínicas de fermentación no tienen un cariotipo estable y definido formando parte de las poblaciones como se ha mostrado en el caso de las levaduras de velo de flor que son mucho más homogéneas, presentando un menor polimorfismo cromosómico (Mesa y col. 1999).

#### **7.1.1.1. Inestabilidad del cariotipo**

En muchas cepas silvestres se ha detectado inestabilidad genética, fenómeno definido porque sus cariotipos varían notablemente con el paso de las generaciones



en crecimiento vegetativo. La inestabilidad cariotípica se puede dar tanto en meiosis como en mitosis, y es debida a reorganizaciones cromosómicas que dan como resultado la aparición de polimorfismo cromosómico entre clones de una misma cepa o entre sus derivados meióticos. Este fenómeno es muy importante desde el punto de vista industrial ya que el uso de una cepa de levadura seleccionada que presente inestabilidad en su cariotipo no garantiza la reproducibilidad de las propiedades del producto final en un proceso industrial. La inestabilidad de los cariotipos en cepas de levaduras naturales es un fenotipo difícil de detectar siendo la forma más adecuada de hacerlo mediante el cariotipo electroforético, analizando un amplio número de clones aislados tras muchas generaciones en crecimiento vegetativo.

Adams y colaboradores (1992) analizaron la inestabilidad de los cariotipos aislados, después de pasar 1000 generaciones, a partir de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que se encontraba en crecimiento vegetativo en un medio con limitación de fosfato. Mostraron que la consecuencia de la adaptación a ese medio fue la aparición de polimorfismo en los clones, pudiéndoles proporcionar este cambio alguna ventaja selectiva.

Longo y Vezinhet (1993) pusieron de manifiesto la inestabilidad del cariotipo en una cepa vínica diploide, de manera que los clones, aislados tras pasar 275 generaciones, presentaron cambios en cromosomas pequeños como los cromosomas I, VI, VIII y V siendo las variaciones más frecuentes en los cromosomas I y VI. Afirmaron que estas modificaciones en los cariotipos de los clones se debieron a reorganizaciones cromosómicas producidas durante las divisiones mitóticas de las células, la cuales parece que suceden con una frecuencia alta.

Nadal y colaboradores (1999) analizaron la inestabilidad genética de cepas vínicas aisladas de la segunda fermentación de vinos espumosos observando que, después de pasar 100 generaciones, los cariotipos de los clones aislados variaron en las zonas de los cromosomas de mayor tamaño, como XII y IV, y en la de los de menor tamaño, como IX, III, VI y I. Mostraron que la alta variabilidad en el tamaño del cromosoma XII se debió a variaciones en los genes que codifican para el ARN ribosómico, siendo esta variación una característica común de las cepas de levaduras

(Chindamporn y col. 1993; Pasero & Marilley 1993). Observaron que las modificaciones del cromosoma IX se debieron a la variación en el número de copias del gen *SUC2* que codifica para la enzima *invertasa*, esencial para el metabolismo del azúcar sacarosa, ya que estas levaduras, en la producción de vino espumoso, tienen en la segunda fermentación éste azúcar como única fuente fermentable. Concluyeron que estos cambios estuvieron influenciados por el medio de crecimiento, siendo la principal fuente de inestabilidad cromosómica durante la mitosis las recombinaciones ocultas (entre secuencias homólogas en posiciones no alélicas).

Carro y Piña (2001), continuando con el estudio de las levaduras de vinos espumosos, analizaron la inestabilidad cariotípica, tras 100 generaciones, de los derivados mitóticos de una cepa aislada de la segunda fermentación de este tipo de vinos. Pusieron de manifiesto que la principal modificación en los cariotipos se debió a variaciones en las repeticiones de los genes ribosómicos, afirmando que estos cambios no son indicativos de inestabilidad genética.

## ***7.2. Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt)***

Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en sitios o secuencias específicos que se denominan dianas de restricción. Son aisladas de microorganismos simples como bacterias, que las producen fundamentalmente para degradar ácidos nucleicos de origen exógeno como el procedente de la infección de un virus. Estas enzimas, cuyo descubrimiento significó el nacimiento de la Biología Molecular moderna, también juegan un papel muy importante en la identificación y caracterización de cepas de levaduras industriales.

El alto contenido de bases AT en el ADN mitocondrial de las levaduras hace que se produzcan fragmentos de restricción de gran tamaño, cuando el ADN genómico se trata con enzimas de restricción cuyas dianas de restricción presentan alta proporción de las bases CG, quedando el ADN nuclear degradado completamente. De esta manera se puede analizar el patrón de restricción del ADN

mitocondrial evitando contaminación del ADN nuclear sin necesidad de aislar mitocondrias (Querol y col. 1992a). Cuando se analizan estos fragmentos mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa se observa un patrón de bandas característico para una especie o incluso de una determinada cepa industrial. El polimorfismo encontrado tras aplicar esta técnica a diferentes cepas industriales, hace que, junto a la anterior, sean las dos técnicas más importantes de caracterización de levaduras (Querol y col. 1992a; Benítez y col. 1996).

### **7.3. Otras técnicas de Biología Molecular aplicadas al estudio de las levaduras industriales**

#### **7.3.1. *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

La reacción en cadena de la polimerasa es un método utilizado para amplificar *in vitro* secuencias específicas de ADN mediante ciclos repetidos de síntesis, utilizando cebadores (*primers*) específicos y la enzima *ADN polimerasa*, lo cual permite multiplicar hasta mil millones de veces en un tubo de ensayo una secuencia determinada de ADN.

El esquema de un ciclo de amplificación de PCR es el siguiente: las dos hebras complementarias de una cadena de ADN se separan por calor, los cebadores se unen en lugares específicos de cada hebra y a partir de ellos, la *ADN polimerasa* va catalizando la unión de los nucleótidos, tomando como molde cada una de las hebras. El resultado son dos nuevas dobles hebras de ADN.

La enzima *ADN polimerasa* que se utiliza suele ser la *Taq polimerasa* que permanece estable a las altas temperaturas que se utilizan para desnaturalizar el ADN en cada ciclo (hasta 95 °C). Esta enzima fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*.

Los productos de PCR pueden ser analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, o bien ser secuenciados, aumentando el poder de resolución de esta técnica en estudios de caracterización molecular.

En hongos, y particularmente en levaduras, las secuencias de ADN que se han de amplificar deben tener un alto grado de conservación, para evitar considerar los cambios en el genoma debidos a mutaciones puntuales. Una de estas regiones altamente conservadas es la que contiene los genes que codifican para el ARN ribosómico. De manera que la técnica de PCR se utiliza para la identificación de levaduras vínicas, amplificando primero estas regiones junto con los espaciadores transcritos internos (ITS). Las secuencias ITS, al ser más variables, se incluyen cuando se pretende distinguir entre cepas relacionadas de una misma especie. Tras la amplificación por PCR se digiere el producto con una enzima de restricción determinada (Guillamón y col. 1998; Esteve-Zarzoso y col. 1999; Fernández-Espinar y col. 2000; Espinosa y col. 2002).

La técnica de PCR también ha sido empleada para la detección temprana de levaduras contaminantes como *Dekkera-Brettanomyces* de entre la población de las levaduras que forman el velo de flor involucrado en la crianza biológica del vino fino (Ibeas y col. 1996). La ventaja que presenta esta técnica es que, conociendo la secuencia específica que se quiere amplificar, se puede detectar la presencia de estas levaduras a partir de muestras tomadas directamente del barril, sin necesidad de purificar previamente los ácidos nucleicos.

## **8. Aplicación de las técnicas de Biología Molecular a la Enológica. Antecedentes**

El reciente desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido desde la primera década de los 90 la caracterización genética de cepas de levaduras de la especie *S. cerevisiae* que participan en diversos procesos industriales, como por ejemplo la elaboración del pan, cerveza, vino, etc. En diversas regiones del mundo, además, ha permitido facilitar la selección de levaduras vínicas, así como su seguimiento durante las fermentaciones en el caso de ser inoculadas. Se ha podido asociar determinadas cepas o especies a áreas concretas de vinificación, y además éstas técnicas han arrojado nuevas pistas sobre el origen de las levaduras que forman parte de la fermentación del mosto, etc. Algunos de los trabajos realizados por diversos grupos de investigación se resumen a continuación:

En primer lugar, el alto polimorfismo encontrado en el trabajo pionero mencionado anteriormente de Yamanoto y colaboradores (1991) lleva a proponer el uso del cariotipo electroforético para definir las cepas dentro de la especie *S. cerevisiae* desde un punto de vista industrial.

Veizinh et al. (1992) realizaron un estudio ecológico, durante varios años consecutivos, de las levaduras vínicas asociadas a una región productora de vino en Francia. Aplicaron tanto la técnica de PFGE como la de RFLP-ADNmt, observando que los dos métodos fueron válidos para poner de manifiesto la alta diversidad de patrones participando en la fermentación espontánea, pudiendo confirmar la existencia de cepas nativas representativas de una zona enológica determinada.

Querol y colaboradores (1992c) utilizando las técnicas de PFGE y RFLP-ADNmt llevaron a cabo una selección de cepas autóctonas en los vinos de Alicante, eligiendo aquella de entre varios aislamientos que mostró las mejores propiedades enológicas (fenotipo killer, cinética de fermentación adecuada y propiedades organolépticas adecuadas). Con las dos técnicas moleculares citadas anteriormente hicieron una caracterización genética de la cepa elegida. La cepa seleccionada fue liofilizada en forma de levadura seca activa (LSA) y sirvió para inocular las fermentaciones, en condiciones industriales, en esta región en años posteriores (Querol y col. 1992b). Mediante los perfiles de restricción obtenidos con determinadas enzimas, hicieron un seguimiento de la cepa inoculada y estudiaron como incidió ésta cepa en la población silvestre de levaduras que participaban en la fermentación, así como su capacidad de implantación frente a ellas. Estos mismos autores estudiaron, aplicando la misma técnica, la dinámica de las poblaciones de levaduras que se van sucediendo durante una fermentación espontánea del mosto, poniendo de manifiesto el elevado polimorfismo que existe entre las cepas de la especie *S. cerevisiae*.

Versavaud y colaboradores (1995) utilizaron el cariotipo electroforético, RFLP-ADNmt, y PCR para estudiar la variabilidad genética, afinidades filogenéticas y la distribución geográfica de levaduras silvestres de *S. cerevisiae* involucradas en los procesos de fermentación espontánea en la región de Charentes (Francia).

Nuevamente, con las dos primeras técnicas pusieron de manifiesto un elevado polimorfismo además de la sucesión de especies de levaduras que se dan durante la fermentación espontánea. Observaron que las iniciadoras del proceso fueron cepas no-*Saccharomyces*, predominando en la mitad y final de la fermentación cepas de *S. cerevisiae*, afirman que las cepas predominantes durante la fermentación se pueden considerar representativas de una determinada zona enológica, igual que se observó en estudios previos en otra zona distinta de Francia (Vezinhet y col. 1992).

Sabaté y colaboradores (1998) observaron resultados similares, en cuanto a la diversidad y sustitución secuencial de distintas cepas de levaduras *S. cerevisiae* durante la fermentación espontánea utilizando como herramienta la técnica de RFLP-ADNmt.

Mesa y colaboradores (1999) realizaron una caracterización genética, utilizando las técnicas de PFGE y RFLP-ADNmt, de las poblaciones de levaduras que forman parte del *velo de flor* propio de la crianza biológica de los vinos finos en la zona del Marco de Jerez. Mostraron en un sistema dinámico de criaderas y soleras la variación de estas poblaciones en función del estado de envejecimiento del vino, así como la predominancia de determinadas cepas en cada fase debido a la mejor adaptación de éstas a las condiciones del vino. Determinaron además, comparando dos sistemas estáticos de envejecimiento biológico (Mesa y col. 2000), una correspondencia entre el tipo de cepas presentes en cada sistema (caracterizadas genéticamente mediante PFGE y RFLP-ADNmt) y las características del vino envejecido.

Esteve-Zarzoso y colaboradores (2000) llevaron a cabo un estudio de la microbiota presente durante la fermentación espontánea de los mostos procedentes de distintas variedades de uvas en la zona de El Penedés, para seleccionar una cepa autóctona y utilizarla como inóculo iniciador del proceso. Para este fin, primero llevaron a cabo una caracterización genética mediante el análisis de los perfiles de restricción para el ADN mitocondrial, que les sirvió de ayuda a la hora de simplificar el número de aislamientos como posibles candidatos para ser seleccionados. Demostraron además que las cepas autóctonas seleccionadas son

importantes contribuidoras a la fermentación del vino, y que están mejor adaptadas a las condiciones de la fermentación que las levaduras comerciales foráneas.

Naumov y colaboradores (2000), por un lado realizaron un estudio de identificación mediante la técnica de PFGE entre dos especies de levaduras pertenecientes al grupo *Saccharomyces* “*sensu stricto*”, mostrando que la especie *S. bayanus* var. *uvarum* puede distinguirse de *S. cerevisiae* por su cariotipo electroforético ya que las cepas de la primera especie presentan dos bandas de tamaño molecular comprendido entre 245-370 kb frente a las tres que presentan las cepas de *S. cerevisiae*. Por otro lado, analizaron las poblaciones de levaduras relacionadas con tres regiones de Francia productoras de vino, poniendo de manifiesto que estas poblaciones variaron según el área estudiada y el tipo de vinificación realizada en cada una, cambiando la frecuencia de aparición de algunas cepas en una misma localidad de un año a otro. Además mostraron la presencia de cepas de *S. bayanus* var. *uvarum* en las uvas de los viñedos, relacionando además estas cepas con fermentaciones llevadas a cabo a bajas temperaturas, como posteriormente también observaron en los vinos de Tokaj (Eslovaquia y Hungría) (Naumov y col. 2002).

Toriya y colaboradores (2001) analizaron las poblaciones de levaduras que forman parte de las fermentaciones espontáneas en dos regiones del noreste de España durante tres años consecutivos. Utilizando la técnica de RFLP-ADNmt encontraron que estas poblaciones variaron de un año a otro, aunque existieron cepas que permanecieron en las bodegas de un año a otro, formando así parte de un nicho ecológico de las bodegas.

Ciani y colaboradores (2004) estudiaron el origen de las cepas de levaduras de *S. cerevisiae* en una bodega de vinificación. Utilizando la técnica de PCR confirmaron que las cepas que se encuentran colonizando las superficies de la bodega (equipamiento y fermentadores) son las que posteriormente llevan a cabo la fermentación espontánea del mosto. Posteriormente, Comiti y Ciani (2006) con la técnica de PCR-RFLP mostraron que las cepas de *S. cerevisiae* no están en las uvas (dañadas o intactas) de los viñedos, y que las bayas no proporcionan el nicho ecológico más adecuado para el desarrollo y colonización de estas levaduras.

Raspor y colaboradores (2002) en una zona vinícola de Eslovenia, utilizaron la técnica de PFGE para caracterizar las levaduras presentes en una fermentación espontánea, y para comprobar la implantación de una levadura comercial en el caso de una fermentación inoculada. Comprobaron la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* durante las primeras 48 horas en la fermentación espontánea, poniendo de manifiesto los riesgos que supone fermentar de esta forma frente a una fermentación inoculada, destacando la importancia de inocular las fermentaciones con cepas de levaduras autóctonas. Posteriormente, también en Eslovenia, estudiaron la influencia de las variedades de uvas y la localización geográfica sobre las poblaciones silvestres de levaduras en las bayas. Mediante la técnica PCR-RFLP estudiaron la región de los genes ribosómicos 18S-ITS poniendo de manifiesto la presencia de diversos géneros de levaduras no-*Saccharomyces* existiendo en las superficies de las uvas, cuya presencia fue variable en función de la localización geográfica, variedades de uvas (tintas o blancas) y de las condiciones microclimáticas que las rodeaban, no detectando cepas de *S. cerevisiae* (Raspor y col. 2006).

Granchi y col. (2003) realizaron un estudio en el que evaluaron si la diversidad de cepas de *S. cerevisiae* en una fermentación espontánea, realizada en condiciones industriales, se vio influenciada por la concentración inicial de nitrógeno asimilable. Utilizando la técnica de RFLP-ADNmt pusieron de manifiesto que la variabilidad genética de cepas propias de las fermentaciones espontáneas no dependió de la disponibilidad de nitrógeno inicial en el mosto.

En las fermentaciones espontáneas de vinos tintos, llevadas a cabo en condiciones industriales en Mendoza (Argentina) también se han realizado estudios acerca de la dinámica de las poblaciones de las levaduras. Mediante el método de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS de los genes ribosómicos Combina y colaboradores (2005) identificaron al comienzo (y mitad, en algunos casos) de tres fermentaciones, realizadas con tres mostos procedentes de distintas variedades de uvas, diversas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, siendo la especie *S. cerevisiae* la que se implantó hacia la mitad y final en cada proceso. Pusieron de manifiesto la distinta frecuencia de aparición de las distintas especies de levaduras en función del tipo de mosto.



Lopes y colaboradores (2002) en la Patagonia argentina utilizaron las técnicas de RFLP-ADNmt y PCR-RFLP de determinadas secuencias génicas para hacer un estudio ecológico. Pusieron de manifiesto la diversidad y dinámica de las cepas de levaduras presentes durante las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo, tanto en condiciones de laboratorio como industriales, en mostos tintos. Posteriormente, en esta región (Lopes y col. 2007) evaluaron mediante RFLP-ADNmt la capacidad de implantación de una cepa de levadura autóctona seleccionada en fermentaciones llevadas a cabo en condiciones industriales, relacionando los resultados obtenidos con las cualidades sensoriales del producto final.

Martínez y colaboradores (2004) realizaron una caracterización de cepas de levaduras mediante las técnicas de RFLP-ADNmt y PFGE en tres áreas distintas productoras de vino en Chile (América del Sur), estudiando la influencia de la utilización de las levaduras comerciales foráneas sobre las cepas autóctonas. Comprobaron que la técnica de PFGE proporcionó un mayor poder de discriminación entre cepas ya que detectaron mayor variabilidad genética entre los aislamientos estudiados que con la técnica de RFLP-ADNmt.

En Italia, Cappello y colaboradores (2004) investigaron la posible correlación entre origen geográfico, variedades de uvas y población de levaduras en la última fase de la fermentación, estableciendo, además, el posible origen de las levaduras. Mediante el empleo de técnicas como PCR-RFLP de diversas secuencias génicas y RFLP-ADNmt estudiaron la estrecha relación entre diversas cepas de *S. cerevisiae* aisladas de distintas fermentaciones realizadas con mostos procedentes de diferentes variedades de uvas, indicando que estas cepas eran representativas de la zona enológica estudiada más que de las variedades de uvas.

Santamaría y colaboradores (2005) llevaron a cabo un análisis de la población de levaduras implicada en la fermentación espontánea del vino tino en La Rioja (España). Mediante al utilización de la técnica de RFLP-ADNmt mostraron que la utilización de inóculos comerciales para iniciar las fermentaciones supone un riesgo en las bodegas, ya que dependiendo de la edad de éstas pueden crear nichos

ecológicos, pasando a formar parte de la microbiota de la bodega, entrando incluso a formar parte de las fermentaciones espontáneas.

Le Jeune y colaboradores (2006) realizaron una caracterización genética de levaduras mediante el análisis de PCR para establecer el origen de las cepas de *S. cerevisiae* y determinar cómo es la evolución de las poblaciones desde las uvas hasta que entran a formar parte de la fermentación espontánea. Demostraron que las cepas de levaduras *S. cerevisiae* que están involucradas en las fermentaciones espontáneas pueden tener su origen tanto en las uvas de los viñedos como en las superficies de las bodegas. Confirmaron que durante los primeros pasos de la vinificación, antes o durante el prensado y clarificación por ejemplo, pueden introducirse nuevas familias de *S. cerevisiae*.

En Galicia, norte de España, Blanco y colaboradores (2006) llevaron a cabo un estudio en una bodega experimental sobre la diversidad genética de cepas de *S. cerevisiae* que participan en diversas fermentaciones espontáneas. Para ello utilizaron la técnica de RFLP-ADNmt. Compararon las cepas que predominaron durante la fermentación de mostos procedentes de distintas variedades de uvas, poniendo de manifiesto que las cepas predominantes en cada una de ellas están mejor adaptadas a las condiciones del mosto del que proceden, pudiendo ser estas cepas unas buenas candidatas para su selección, en el caso de obtener con ellas vinos con cualidades organolépticas mejoradas.

Sturm y colaboradores (2006) analizaron la influencia de las prácticas pre-fermentativas, como por ejemplo el tratamiento de las uvas, sobre la población de levaduras aisladas de las fermentaciones espontáneas de vinos tintos. Mediante PCR-RFLP de la secuencia de los genes ribosómicos 5.8S-ITS mostraron que estas prácticas alteran significativamente la diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* presentes en las fermentaciones espontáneas.

## 8.1. Justificación del trabajo

Las Bodegas Barbadillo fueron pioneras en elaborar el primer vino blanco de Andalucía. Lanzado al mercado en 1975, la marca *Castillo de San Diego* se convertiría en pocos años en un gran éxito de ventas. Hoy día es el vino blanco más vendido de España. Actualmente la Bodega vende en torno a seis millones de botellas al año.

Desde sus comienzos, las fermentaciones de este vino se realizaban de forma espontánea, preparando de manera tradicional un pie de cuba que en plena fermentación se adicionaba al mosto procedente de la vendimia para iniciar así las fermentaciones industriales.

Dada la importancia comercial del vino en cuestión, surgió la necesidad de controlar el proceso de fermentación mediante la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas.

Esta necesidad constituye un ejemplo que se puede extender a todo el sector bodeguero a escala global. La realización de fermentaciones vínicas con características únicas y propias de cada zona productora gracias al uso de levaduras autóctonas seleccionadas y el control microbiológico de las mismas es uno de los retos de la enología en la actualidad.

El presente trabajo se inició con el convencimiento de la capacidad de la investigación pública para realizar la transferencia de tecnología y conocimiento necesarios para satisfacer la necesidad de las bodegas.

Tal y como indican los trabajos comentados anteriormente, el control microbiológico de las fermentaciones vínicas y la selección de cepas autóctonas implican la capacidad de discriminar entre cepas distintas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Basándonos en los trabajos mencionados, se elige como técnica principal para este fin la obtención del cariotipo electroforético mediante *Electroforesis en Campo Pulsante*. Debido a que los mecanismos de evolución adaptativa de las cepas industriales se basan de forma primaria en cambios que

afectan a numerosas regiones genómicas y provocan reorganizaciones cromosómicas, el cariotipo electroforético se presenta como una técnica eficaz para detectar estos cambios y correlacionar distintos patrones cromosómicos con distintas cepas, que han evolucionado en el ambiente industrial. Además el uso de esta técnica permite determinar la estabilidad genética de cepas, característica fundamental para su uso industrial.

Como complemento al cariotipo electroforético se considera la técnica de RFLP-ADNmt, ya que permite añadir de forma sencilla valores de proximidad filogenética entre cepas y es capaz de reflejar de forma rápida la variabilidad genética existente en la población de un fermentador.



## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

El objetivo principal de la Tesis es la mejora de las propiedades sensoriales del vino joven *Castillo de San Diego* perteneciente a los vinos de la Tierra de Cádiz, mediante la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas. El vino se elabora a partir de la variedad de uva blanca Palomino (*Palomino Fino*) y la fermentación se realiza en los lagares que están ubicados en Gibalbín, entre los municipios de Jerez de la Frontera y Arcos de la Frontera.

Para llevar a cabo la selección de cepas autóctonas más adecuadas, se siguió un esquema de selección en el que se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterización genética de las cepas de levaduras implicadas en la fermentación espontánea del vino objeto de estudio, mediante la utilización de la técnica molecular de *Electroforesis en Campo Pulsante*. El conocimiento de las cepas implicadas durante el proceso de fermentación es muy importante para poder seleccionar aquéllas que aporten al vino producido las mejores características organolépticas.
2. Pre-selección de las cepas más representativas del proceso.
3. Aplicación de algunos parámetros de interés enológico a las cepas elegidas tales como: fenotipo killer, poder fermentativo y tolerancia al etanol; y estudio de la capacidad de implantación de las cepas pre-seleccionadas en fermentaciones llevadas a cabo en condiciones semi-industriales.
4. Selección de cepas.
5. Utilización de las cepas seleccionadas como iniciadoras de las fermentaciones en condiciones industriales durante varias vendimias consecutivas. Seguimiento de éstas mediante cariotipo electroforético.



A medida que se fueron obteniendo los resultados de las fermentaciones inoculadas y se mostró el comportamiento de las cepas seleccionadas en condiciones industriales fueron surgiendo nuevas cuestiones, como por ejemplo, si las cepas inoculadas durante el proceso de fermentación se mantenían estables genéticamente. Por otro lado, durante las fermentaciones inoculadas, ante la posibilidad de que la cepa seleccionada no fuera la conductora de la fermentación, fue necesario aplicar un método de control microbiológico que nos pusiera de manifiesto si la cepa inoculada era la que estaba llevando a cabo la fermentación.

De manera que se plantearon nuevos objetivos:

- 6.** Estudio de la estabilidad de los cariotipos de las cepas autóctonas seleccionadas. El descubrimiento de la inestabilidad del cariotipo de las levaduras durante el crecimiento vegetativo ha planteado una grave amenaza para todas las industrias, ya que las propiedades genéticas de una cepa inestable pueden variar, haciéndola inadecuada para el proceso deseado.
  
- 7.** Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de las cepas inoculadas, mediante la técnica molecular de RFLP-ADNmt.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Muestras industriales

La toma de muestras se llevó a cabo durante el periodo de vendimia, en los meses de agosto y septiembre, durante 7 años consecutivos (desde 1999 hasta 2005) en los lagares de elaboración, en Gíbalbín. En las vendimias de 1999 y 2000 las muestras fueron tomadas de las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en depósitos de 400.000 litros (Tablas 1 y 2). Y en los años posteriores fueron tomadas de las fermentaciones que se inocularon con cepas autóctonas seleccionadas (Tablas 6, 8, 10, 12 y 14), y de los depósitos en los que se llevó a cabo la elaboración del pie de cuba (Tablas 5, 7, 9, 11 y 13). En todas las tablas se indica el contenido en azúcar de cada muestra mediante el grado Beaumé. El °Be mide la riqueza de azúcar de un mosto en función de su densidad (1 °Be equivale a 18 g azúcar/L).

Las muestras fueron tomadas diariamente una vez que comenzó el llenado de los depósitos, desde el inicio de las fermentaciones hasta su finalización. Se tomaron desde la parte superior de los fermentadores, introduciendo un toma-muestras hasta el centro del fermentador, aproximadamente, para que la muestra fuera lo más representativa posible. Después se adicionaron a tubos de 25 mL estériles que posteriormente se conservaron en una nevera con hielo para transportarlos desde los lagares de elaboración hasta el laboratorio de Microbiología (UCA).

#### 1.2. Conservación de las muestras

Las muestras tomadas de las fermentaciones se centrifugaron a 3800 rpm y a 4 °C durante 5 minutos en un equipo Sorvall® Super T21 (Dupont). Se eliminó parte del sobrenadante y el resto se resuspendió con el precipitado, tomándose 600 µL de éste para mezclarlos con 400 µL de glicerol (50%), conservándose la muestra en una cámara congeladora a -80 °C hasta su posterior procesamiento una vez finalizadas las vendimias.

Fecha	DEPOSITOS DE FERMENTACIÓN										
	A	B	C	L	M	E	K	F	G	H	J
Viernes 27/8/99	t °Be 30 horas 5,6 11,3	0 horas 11,3	0 horas 11,3	0 horas 10,75	30 horas 6						
Sábado 28/8/99	t °Be 53 horas 3,85 8,5	10 horas 8,5	0 horas 11,6	18 horas 8,7	57 horas 4,7						
Domingo 29/8/99	t °Be										
Lunes 30/8/99	t °Be 102 horas 6,4	59 horas 5,8	49 horas 7,3	67 horas 4,2	103 horas 1,45						
Martes 31/8/99	t °Be 125 horas 4,3	82 horas 4,4	72 horas 5,6	90 horas 0,6							
Miércoles 1/9/99	t °Be 149 horas 4,9	106 horas 4,1	96 horas 4,5	114 horas 1,05	Al dep. K	0; 8 y 19 horas 11; 11 y 7,95	150 horas 3,05				
Jueves 2/9/99	t °Be 172 horas 4,5	129 horas 3,95	119 horas 4,9	137 horas 2,8		32 horas 5,75	173 horas 1,3				
Viernes 3/9/99	t °Be 197 horas 3	154 horas 3,25	144 horas 4,5	162 horas 1,6		56 horas 5,75	198 horas 1,5	0 horas 10,9			
Sábado 4/9/99	t °Be 220 horas	177 horas	167 horas					0 horas			
Domingo 5/9/99	t °Be										
Lunes 6/9/99	t °Be 269 horas 0,5	226 horas 1,05	216 horas 1,9	234 horas 0,9978		129 horas 2,4	270 horas 0,9934	60 horas 5,25	48 horas 5,2	30 horas 4,7	
Martes 7/9/99	t °Be 293 horas 0,9995	250 horas 0,45	240 horas 1	258 horas 0,9967		153 horas 1,45		84 horas 3,65	72 horas 3,5	54 horas 3,6	
Miércoles 8/9/99	t °Be 317 horas 0,9979	294 horas 0,998	264 horas 0,5			197 horas 2,15		108 horas 3,2	96 horas 3,65	78 horas 4,9	
Jueves 9/9/99	t °Be 341 horas 0,9966	318 horas 0,9968	288 horas 0,9993			221 horas 2,45		132 horas 2,45	120 horas 2,7	102 horas 3,9	5 horas 6,2
Viernes 10/9/99	t °Be 365 horas 0,9958	342 horas 0,9958	312 horas 0,9979			241 horas 2,1		156 horas 2,9	144 horas 2,7	126 horas 3,2	29 horas 4,2
Sábado 11/9/99	t °Be										
Domingo 12/9/99	t °Be										
Lunes 13/9/99	t °Be 417 horas 0,993	414 horas 0,9932	384 horas 0,9952			313 horas 0,6		228 horas 1,2	216 horas 0,9	188 horas 0,7	101 horas 1,9
Martes 14/9/99	t °Be										
Miércoles 15/9/99	t °Be 465 horas	462 horas	412 horas			361 horas		276 horas	264 horas	236 horas	149 horas

**Tabla 1.** Toma de muestras de las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 1999. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (color amarillo).

DEPOSITOS DE FERMENTACIÓN												
Fecha	A	B	C	D	E	F	G	H	I	N		
Lunes 28/8/00	t				24 horas 7,45	24 horas 7,25	Mosto 11	Mosto 10,7				
Martes 29/8/00	°Be				48 horas	48 horas						
Miércoles 30/8/00	t											
Jueves 31/8/00	°Be	Mosto	96 horas 4,95	96 horas 4,55	96 horas 7,15	96 horas 6,25						
Viernes 1/9/00	t											
Sábado 2/9/00	°Be	Mosto 9,6	168 horas 5,8	168 horas 5,8	168 horas 5,05	168 horas 4,9			2,3			
Domingo 3/9/00	t											
Lunes 4/9/00	t	0 horas 4,4	216 horas 3,75	216 horas 2,65	216 horas 1,75	216 horas 2,95						
Martes 5/9/00	°Be	Mosto 10,3	240 horas 4,75	240 horas 2,05	240 horas 2,45	240 horas 1,4	0,9		4,15			
Miércoles 6/9/00	°Be	6,05	264 horas 2	264 horas 0,95	264 horas 1,95	264 horas 1,4	6,3		2,55			
Jueves 7/9/00	t	4,5							1,45			
Jueves 7/9/00	°Be											
Viernes 8/9/00	t	96 horas 4,4	312 horas 1,65	312 horas 0,3	312 horas 1,2	312 horas 0,6	4,2		0,9974			
Sábado 9/9/00	°Be											
Domingo 10/9/00	t											
Lunes 11/9/00	°Be											
Martes 12/9/00	t	192 horas 1,3	408 horas 0,6	408 horas 0,9967	408 horas 0,55	408 horas 0,9966	0,3					
Miércoles 13/9/00	°Be	2,15	432 horas 1,05	432 horas 0,9959	432 horas 0,4	432 horas 0,996	1,25		0,9977			
Jueves 14/9/00	t	240 horas	456 horas	456 horas	456 horas	456 horas						
Jueves 14/9/00	°Be											
Viernes 15/9/00	t	264 horas	480 horas	480 horas	480 horas	480 horas						
Viernes 15/9/00	°Be											
Sábado 16/9/00	t	288 horas	504 horas	504 horas	504 horas	504 horas						
Sábado 16/9/00	°Be											
Domingo 17/9/00	t											
Domingo 17/9/00	°Be											
Lunes 18/9/00	t											
Lunes 18/9/00	°Be											
Martes 19/9/00	t											
Martes 19/9/00	°Be											
Miércoles 20/9/00	t	384 horas	600 horas	600 horas								
Miércoles 20/9/00	°Be											

**Tabla 2.** Toma de muestras de las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2000. La flecha roja indica una recarga de mosto fresco realizada entre las muestras analizadas (señaladas en amarillo).

Experimento 1			
Fecha	Volumen (litros)	t (horas)	°Be
Martes 12/9/00	500	2	10,45
Miércoles 13/9/00	500	24	10,15
Jueves 14/9/00	500	48	7,9
Viernes 15/9/00	500	72	2,65
Sábado 16/9/00	10.000	10	10,2
Domingo 17/9/00	10.000	34	-
Lunes 18/9/00	10.000	58	8,75
Martes 19/9/00	10.000	82	6,5
Miércoles 20/9/00	10.000	10	4,7
Jueves 21/9/00	100.000		
Viernes 22/9/00	100.000	44	4,1
Sábado 23/9/00	100.000		
Domingo 24/9/00	100.000		
Lunes 25/9/00	100.000	116	0,15
Martes 26/9/00	100.000	140	0,9956
Miércoles 27/9/00	100.000	164	0,9943
Jueves 28/9/00	100.000		
Viernes 29/9/00	100.000	212	0,9928
Sábado 30/9/00	100.000		
Domingo 1/10/00	100.000		
Lunes 2/10/00	100.000	284	0,9926
Martes 3/10/00	100.000	308	

**Tabla 3.** Toma de muestras del Experimento 1 llevado a cabo en la vendimia 2000.

Experimento 2			
Fecha	Volumen (litros)	t (horas)	°Be
Sábado 16/9/00	1.000	8	9,25
Domingo 17/9/00	1.000	32	
Lunes 18/9/00	10.000	6	11,1
Martes 19/9/00	10.000	30	10,25
Miércoles 20/9/00	10.000	54	8,7
Jueves 21/9/00	10.000	78	
Viernes 22/9/00	10.000	102	5,7
Sábado 23/9/00	100.000		
Domingo 24/9/00	100.000		
Lunes 25/9/00	100.000	69	6,72
Martes 26/9/00	100.000	93	4,6
Miércoles 27/9/00	100.000	117	3,3
Jueves 28/9/00	100.000		
Viernes 29/9/00	100.000	165	1,4
Sábado 30/9/00	100.000		
Domingo 1/10/00	100.000		
Lunes 2/10/00	100.000	237	0,25
Martes 3/10/00	100.000	261	

**Tabla 4.** Toma de muestras del Experimento 2 llevado a cabo en la vendimia 2000.

PIE DE CUBA				
Fecha	Volumen		°Be	Viabilidad (% Viab.)
	Cepas			
Miércoles 1/8/01	P2 P3 P5	500 mL		
Sábado 4/8/01	P2 P3 P5	2 litros	5,8 2 0,5	
Martes 7/8/01	P2 P3 P5	20 litros	2,8 1,8 0,9968	15,2x10Exp6 cél v/mL (55,88%) 72x10Exp6 cél v/mL (97,8%) 77,6x10Exp6 cél v/mL (90,65%)
Jueves 9/8/01	500 litros		9,95	76x10Exp6 cél v/mL (87,9%)
Viernes 10/8/01	500 litros		7,35	76x10Exp6 cél v/mL (95%)
Sábado 11/8/01	500 litros		5,1	81,6x10Exp6 cél v/mL (99%)
Domingo 12/8/01	500 litros		3,25	92,8x10Exp6 cél v/mL (99,1%)
Lunes 13/8/01	500 litros		1,25	57,6x10Exp6 cél v/mL (100%)
Martes 14/8/01	2.000 litros		6,55	77,6x10Exp6 cél v/mL (96%)
Miércoles 15/8/01	2.000 litros			
Jueves 16/8/01	2.000 litros		2,25	118,4x10Exp6 cél v/mL (98,1%)
Viernes 17/8/01	32.000 litros		10,45	28x10Exp6 cél v/mL (97,22%)
Sábado 18/8/01	32.000 litros		8,15	101,6x10Exp6 cél v/mL (97,7%)
Domingo 19/8/01	32.000 litros			
Lunes 20/8/01	32.000 litros		0,8	86,4x10Exp6 cél v/mL (94,7%)

**Tabla 5.** Toma de muestras del pie de cuba elaborado en la vendimia inoculada del año 2001. Las muestras analizadas se indican en color amarillo.



Fecha	DEPÓSITOS DE FERMENTACIÓN							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Martes 21/8/01	t °Be 24 horas 6,8	24 horas 8,2	24 horas 6,2	24 horas 7,7				
Miércoles 22/8/01	t °Be 48 horas 8,35	48 horas 7,85	48 horas 8,25	48 horas 10				
Jueves 23/8/01	t °Be 72 horas 5,15	72 horas 7,65		72 horas 8				
Viernes 24/8/01	t °Be 96 horas 3,25	96 horas 7,35		96 horas 5,15				
Sábado 25/8/01	t °Be 120 horas 6,8	120 horas 4,6	24 horas 5,5	120 horas 6,1				
Domingo 26/8/01	t °Be							
Lunes 27/8/01	t °Be 168 horas 3,55	168 horas 3,1	72 horas 3,1	168 horas 2,7				
Martes 28/8/01	t °Be 192 horas 2,15	192 horas 1,55	96 horas 1,8	192 horas 1,4				
Miércoles 29/8/01	t °Be 216 horas 3,67	216 horas 1,95	120 horas 2,07	216 horas 1,87	0 horas 5,7			
Jueves 30/8/01	t °Be 240 horas 2,3	240 horas 1,02	144 horas 1,62	240 horas 1,42	24 horas 7,05			
Viernes 31/8/01	t °Be 264 horas 2	264 horas 0,9979	168 horas 0,9994	264 horas 3	48 horas 6,1	0 horas 5,7		
Sábado 1/9/01	t °Be 288 horas 5,2	288 horas 0,9942	192 horas 1	288 horas 1,45	72 horas 5	24 horas 4,5	0 horas 6,2	Mosto 11,3
Domingo 2/9/01	t °Be							
Lunes 3/9/01	t °Be 336 horas 2,25	336 horas 0,9904	240 horas 0,9904	336 horas 0,9955	120 horas 2,6	72 horas 3,05	48 horas 2,9	24 horas 5,45
Martes 4/9/01	t °Be 360 horas 1	360 horas 1		360 horas 0,9939	144 horas 3,5	96 horas 1,85	72 horas 1,9	48 horas 3,35
Miércoles 5/9/01	t °Be 384 horas 1,3				168 horas 3,6	120 horas 0,65	96 horas 2,8	72 horas 2,42
Jueves 6/9/01	t °Be 408 horas 0,5				192 horas 2,2	144 horas 2,7	120 horas 4,3	96 horas 3
Viernes 7/9/01	t °Be 430 horas 0,9929				216 horas 2,4	168 horas 1,5	144 horas 3,5	120 horas 4,1
Sábado 8/9/01	t °Be 456 horas 0,9927				240 horas 2,8	192 horas 0,9984	168 horas 1,8	144 horas 3,6

**Tabla 6.** Toma de muestras de las fermentaciones inoculadas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2001. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (señaladas en amarillo).

PIE DE CUBA				
Fecha	Volumen		°Be	Viabilidad (% Viab.)
	Cepas			
Sábado 3/8/02	P2 P5 P5I	500 mL		
Martes 6/8/02	P2 P5 P5I	2 litros	5,1 2,7 2,7	
Jueves 8/8/02	P2 P5 P5I	20 litros	7,3 5,25 5,25	104x10Exp6 cél v/mL (94%) 13,2x10Exp6 cél v/mL (99%) 115,2x10Exp6 cél v/mL (100%)
Sábado 10/8/02	P2 P5 P5I	20 litros	2,4 1,15 1,15	12x10Exp6 cél v/mL (88,2%) 48x10Exp6 cél v/mL 65,6x10Exp6 cél v/mL
Lunes 12/8/02		1.000 litros	8,25	
Martes 13/8/02		1.000 litros	5,9	
Miércoles 14/8/02		1.000 litros	4,65	
Jueves 15/8/02		1.000 litros		
Viernes 16/8/02		1.000 litros	0,9951	85,6x10Exp6 cél v/mL
Sábado 17/8/02		3.750 litros	7,2	
Domingo 18/8/02		3.750 litros		
Lunes 19/8/02		3.750 litros	4,9	
Martes 20/8/02		3.750 litros	4,45	24x10Exp6 cél v/mL
Miércoles 21/8/02		18.000 litros	9,45	
Jueves 22/8/02		18.000 litros	8,45	
Viernes 23/8/02		18.000 litros	7,15	41,6x10Exp6 cél v/mL
Sábado 24/8/02		18.000 litros	3,8	
Domongo 25/8/02				
Lunes 26/8/02		81.000 litros	8,15	
Martes 27/8/02		81.000 litros	4,95	95,2x10Exp6 cél v/mL

**Tabla 7.** Toma de muestras del pie de cuba elaborado en la vendimia inoculada del año 2002. En color amarillo se indican las muestras analizadas.

Fecha	DEPÓSITOS DE FERMENTACIÓN										
	A	E	F	G	B	D	H	M	P		
	°Be										
Miércoles 28/8/02	9,4	9	9,2								
Jueves 29/8/02	6,3	6,2	6,45	Mosto							
Viernes 30/8/02	4,1	4,15	4,15								
Sábado 31/8/02	8	8,15	7,95	Mosto							
Domingo 1/9/02											
Lunes 2/9/02	4,4	4,45	3,7								
Martes 3/9/02	3,75	2,55	2,6		2,6						
Miércoles 4/9/02	2	2,65	1,65	Mosto	6,15						
Jueves 5/9/02	1,95	4,25	0,55		6,25						
Viernes 6/9/02	0,9977	5,05	0,9967	3,85	5,05						
Sábado 7/9/02	0,9957	2,6	0,9952	1,8	3,4	11,2	3				
Domingo 8/9/02											
Lunes 9/9/02	0,9952	0,9967	0,9942	5,1	1,2	2,4	2,4				
Martes 10/9/02	0,9944	0,9949	0,9937	2,5	0,9979	2,8	0,75				
Miércoles 11/9/02	0,9942	0,9944	0,9934	4,6	0,65	1,4	1,5				
Jueves 12/9/02	0,9937	0,9939	0,9929	2,3	1,9	0,6	1,4	4,5	5,2		
Viernes 13/9/02	0,9937	0,9934	0,9924	1,9	0,9	0,4	2,7	1,4	3,5		
Sábado 14/9/02	0,9937	0,9932	0,9922	0,35	0,9932	0,9967	1,1	3,3	4,1		
Domingo 15/9/02											
Lunes 16/9/02				0,9944			0,9974	0,9979	1,2		
Martes 17/9/02									0,9987		

**Tabla 8.** Toma de muestras de las fermentaciones inoculadas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2002. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (color amarillo).

Fecha	PIE DE CUBA A			PIE DE CUBA B		
	Volumen Cepas	<sup>9</sup> Be	Viabilidad (% Vlab.)	Volumen Cepas	<sup>9</sup> Be	Viabilidad (% Vlab.)
Sábado 28/03	P2 P5 P5I 2 litros	1,85 1,65 1,85				
Lunes 4/8/06	P2 P5 P5I 20 litros	2,1 2,55 2,25	44x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (57,8%) 72x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (75%) 80x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (77%)			
Miércoles 6/8/03				P2 P5 P5I 2 litros	0,75 0,7 0,45	
Viernes 8/8/03	Dep. 11- 500 litros Dep. 12- 500 litros	8,8 9,75	65x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (91,1%) 58,4x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (90,12%)	P2 P5 P5I 20 litros	3,15 2,55 2,55	64x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (72,7%) 76x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (82,6%) 96x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (92,3%)
Sábado 9/8/03	Dep. 11- 500 litros Dep. 12- 500 litros	5,2 5,45	91x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (91,1%) 60x10 <sup>6</sup> Exp6 cél v/mL (91,5%)	Dep. 10- 1.000 litros	10,65	
Domingo 10/8/03						
Lunes 11/8/03	Dep. 7- 3.000 litros Dep. 8- 3.000 litros	4,7 5,4		Dep. 10- 1.000 litros	5,95	
Martes 12/8/03	Dep. 7- 3.000 litros Dep. 8- 3.000 litros	2 3,1		Dep. 10- 1.000 litros	3,35	
Miércoles 13/8/03	Dep. 12.500 litros	7,7		Dep. 8- 2.500 litros	7,8	
Jueves 14/8/03	Dep. 12.500 litros	4,8		Dep. 8- 2.500 litros	5,4	
Viernes 15/8/03	Dep. 12.500 litros	2,15		Dep. 8- 2.500 litros	2,65	
Sábado 16/8/03				Dep. 5.000 litros	0,35	

**Tabla 9.** Toma de muestras del pie de cuba elaborado en la vendimia inoculada del año 2003. En amarillo se indican las muestras analizadas.

DEPÓSITOS DE FERMENTACIÓN								
Fecha	A	B	C	D	E	F	G	H
°Be								
Sábado 16/8/03	10,6							
Domingo 17/8/03	9							
Lunes 18/8/03	13,4							
Martes 19/8/03		8,1	8,1					
Miércoles 20/8/03								
Jueves 21/8/03	11,15	5,3	5,6					
Viernes 22/8/03	10,15	2,8	3	6,6				
Sábado 23/8/03	10,8	1,6	2,5	3,65				
Domingo 24/8/03								
Lunes 25/8/03		0,9914	0,85	1,2				
Martes 26/8/03		0,9914	0,9935	0,65	0,3			
Miércoles 27/8/03		0,9912	0,9915	3,6	5,35			
Jueves 28/8/03	5,3	0,9912	0,9913	2,05	7,65	5,1		
Viernes 29/8/03	7,6	0,9912	0,9912	0,55	4,57	7,3		
Sábado 30/8/03	6	0,9912	0,9912	0,9944	4,15	6,5	6,35	Mosto 11
Domingo 31/8/03								
Lunes 1/9/03	2,95			0,9913	1,45	2,35	3,45	
Martes 2/9/03	1,35			0,9907	2,65	1	1,35	1,15
Miércoles 3/9/03	1,9			0,9994	2	1,9	0,9977	3,55
Jueves 4/9/03	1,6				1,2	1,9	2,1	1,95
Viernes 5/9/03	2,5				1,25	2,35	1,95	0,8
Sábado 6/9/03	2,2	3,5			0,75	1,4	2,3	3,2
Domingo 7/9/03								
Lunes 8/9/03	2,3	4,8			0,9969	0,4	0,3	2,7
Martes 9/9/03	1,6	3,5			0,9946	0,9973	0,9957	2,55
Miércoles 10/9/03	1,2	4,2			0,9933	0,9957	0,9939	2,85
Jueves 11/9/03	1,5	2,4			0,9925	0,9937	0,9925	2,35
Viernes 12/9/03	0,9	1,1			0,9916	0,9924	0,9914	2,7
Sábado 13/9/03								
Domingo 14/9/03								
Lunes 15/9/03	0,9995	0,9925			0,9905	0,9905	0,9903	0,9979

**Tabla 10.** Toma de muestras de las fermentaciones inoculadas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2003. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (color amarillo).

Fecha	PIE DE CUBA A				PIE DE CUBA B			
	Volumen		°Be	Viabilidad (% Viab.)	Volumen		°Be	Viabilidad (% Viab.)
	Cepas				Cepas			
Lunes 2/8/04	P2	500 mL		13x10Exp6 cél v/mL (100%) 16,5x10Exp6 cél v/mL (100%)				
Jueves 5/8/04	P5				P2	500mL		36x10Exp6 cél v/mL (100%) 52x10Exp6 cél v/mL (100%)
Viernes 6/8/04	P2	2 litros	1,45	24x10Exp6 cél v/mL (98%) 72,8x10Exp6 cél v/mL (99%)				
Lunes 9/8/04	P5	20 litros	1	17,6x10Exp6 cél v/mL (91,6%) 55,6x10Exp6 cél v/mL (97,2%)	P2	2 litros	0,75	112x10Exp6 cél v/mL (95,8%) 152x10Exp6 cél v/mL (98,9%)
Miércoles 11/8/04		540 litros	0,6	50x10Exp6 cél v/mL (97,5%)	P2	20 litros	3,7	184x10Exp6 cél v/mL (92%) 84x10Exp6 cél v/mL (95,4%)
Viernes 13/8/04		540 litros	3,7		P5	500 litros	6,7	
Martes 17/8/04		5.500 litros	3,97			500 litros	2	
Jueves 19/8/04		5.500 litros	0,9959			3.000 litros	4,7	
Viernes 20/8/04		7.500 litros	0,4			3.000 litros	2,4	
Sábado 21/8/04		7.500 litros	0,9945	64x10Exp6 cél v/mL (91%)		3.000 litros	0,9	109x10Exp6 cél v/mL (97%)
Domingo 22/8/04								
Lunes 23/8/04		15.500 litros	2,1			7.000 litros	4,3	
Martes 24/8/04		15.500 litros	0,75			7.000 litros	2,75	
Miércoles 25/8/04		15.500 litros	0,996			7.000 litros	1,6	
Viernes 27/8/04		25.000 litros	3,7			25.000 litros	0,73	
Sábado 28/8/04		75.000 litros	4,4			52.000 litros	2,6	
Lunes 30/8/04		75.000 litros	1,55			89.500 litros	4,05	

**Tabla 11.** Toma de muestras del pie de cuba elaborado en la vendimia inoculada del año 2004. Las muestras analizadas se indican en amarillo.

Fecha	DEPOSITOS DE FERMENTACION													
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	M	N	O	R	
Martes 31/8/04	8,3	7,7												
Miércoles 1/9/04	7,1	6,8												
Jueves 2/9/04	4,65	4,45												
Viernes 3/9/04	3,25	4,55												
Sábado 4/9/04	3,15	3,95			7,25									
Domingo 5/9/04	6,05	4,35	7,75				5,25							
Lunes 6/9/04	3,95	2,05												
Martes 7/9/04	1,7	0,25		10,04	3,1		2,4							
Miércoles 8/9/04	0,9978	0,9928		4,4	3,5			5						
Jueves 9/9/04	0,9917	0,9909		4,3	5,2			4,4						
Viernes 10/9/04	0,9917		7,2	4,15	3,15	6,75		3,65						
Sábado 11/9/04	0,991		6,1	3,2	1,8	7,6	Mosto 10,7	3,6						
Domingo 12/9/04														
Lunes 13/9/04	0,9909		5,45	0,5	0,5	5,3		0,8						
Martes 14/9/04	0,9909		4,95	0,9854	0,9837	3,35	6,35	0,9864						
Miércoles 15/9/04			x	x	x	x	x	x						
Jueves 16/9/04			x	x	x	x	x	x						
Viernes 17/9/04			x	x	x	x	x	x						
Sábado 18/9/04			x			x	x							
Domingo 19/9/04														
Lunes 20/9/04			x			x	x		x	x	x			
Martes 21/9/04			x			x	x		x	x	x			
Miércoles 22/9/04			x			x	x		x	x	x			
Jueves 23/9/04			x			x	x		x	x	x			
Viernes 24/9/04			x			x	x		x	x	x			
Sábado 25/9/04			x			x	x		x	x	x			
Domingo 26/9/04														
Lunes 27/9/04			x						x	x	x			
Martes 28/9/04									x	x	x			
Miércoles 29/9/04									x	x	x			
Jueves 30/9/04										x	x			
Viernes 1/10/04										x	x			
Sábado 2/10/04											x			
Domingo 3/10/04														
Lunes 4/10/04														x

**Tabla 12.** Toma de muestras de las fermentaciones inoculadas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2004. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (señaladas en color amarillo).

Fecha	PIE DE CUBA A				PIE DE CUBA B			
	Volumen		Viabilidad (% Viab.)		Volumen		Viabilidad (% Viab.)	
	Cepas	°Be	Viabilidad (% Viab.)	Cepas	°Be	Viabilidad (% Viab.)		
Viernes 29/7/05	P5	500 mL (a) 500 mL (b)	76x10Exp6 cél v/mL (100%) 40x10Exp6 cél v/mL (100%)	P5	500 mL (a) 500 mL (b)	36,4x10Exp6 cél v/mL (94,8%) 50,8x10Exp6 cél v/mL (96,2%)		
Lunes 1/8/05								
Martes 2/8/05	P5	2 litros (a) 2 litros (b)	131,6x10Exp6 cél v/mL (90,13%) 106x10Exp6 cél v/mL (83,6%)	P5	2 litros (a) 2 litros (b)	150,4x10Exp6 cél v/mL (94,5%) 203,2x10Exp6 cél v/mL (96,99%)		
Jueves 4/8/05	P5	20 litros (a) 20 litros (b)	81,2x10Exp6 cél v/mL (99%) 72,4x10Exp6 cél v/mL (97,8%)					
Sábado 6/8/05		700 litros	9,05					
Domingo 7/8/05		700 litros	8,1					
Lunes 8/8/05		700 litros	6,6	P5	20 litros (a) 20 litros (b)	46,4x10Exp6 cél v/mL (95,8%) 60,8x10Exp6 cél v/mL (96,8%)		
Martes 9/8/05		700 litros	5,7		700 litros	9,2		
Miércoles 10/8/05		700 litros	4,4		700 litros	69x10Exp6 cél v/mL (98%)		
Jueves 11/8/05		4.000 litros	10		700 litros	6,1		
Martes 16/8/05		33.000 litros	6,8		9.000 litros	3,77		
Miércoles 17/8/05		33.000 litros	4,95		29.000 litros	7,85		
Jueves 18/8/05		33.000 litros	3,47		29.000 litros	7,2		
Viernes 19/8/05		69.500 litros	3,2		29.000 litros	4,75		
Sábado 20/8/05		69.500 litros						

**Tabla 13.** Toma de muestras del pie de cuba elaborado en la vendimia inoculada del año 2005.



DEPÓSITOS DE FERMENTACIÓN									
Fecha	A	B	C	D	E	F	G	H	J
	°Be								
Lunes 22/8/05					9,9	9,9	8	7,9	
Martes 23/8/05					6,8	9,15	6,45	8,25	
Miércoles 24/8/05					5,15	7,3	5,25	6,4	
Jueves 25/8/05					4	5,2	5,1	4,65	
Viernes 26/8/05	5,6	3,6	6,5						
Sábado 27/8/05	4,4	5,9	6,3						
Domingo 28/8/05	↘								
Lunes 29/8/05	6	3,5	5,3	4,6					
Martes 30/8/05	4,4	2,4	5,3	5,1			↘		
Miércoles 31/8/05	3,6	↘ 1,5	4,7	11,8			↘ 5,8	6,3	
Jueves 1/9/05	2,25	2,9	3,6		↘	1,8	6,2	6,5	
Viernes 2/9/05	1,15	1,9	2,4	10,13	11,7	3,1	4,7	4,8	
Sábado 3/9/05	0,9993	0,9	1,6	10,5		5,4	4,7	5,5	
Domingo 4/9/05									
Lunes 5/9/05	0,9997	0,9954	2,4	2,3	6,9	5,1	4,7	5,5	
Martes 6/9/05	0,9888	0,9918	1,55		5,45	6,95	4,6	5	
Miércoles 7/9/05	0,9889	0,9895	2,45	0,8	5,7	6,2	4,5	3,75	
Jueves 8/9/05	0,9986	0,9892	2,45	4,85	4,85	5,9	3,45		
Viernes 9/9/05		0,9893	1,65	6,65	3,95	3,95	2,35		1,9
Sábado 10/9/05			0,9	5,8	3,2	3,2	1,5		1,2
Domingo 11/9/05									
Lunes 12/9/05			X	X	2,1	X	X		X
Martes 13/9/05									
Miércoles 14/9/05			X	X	X	X	X		X
Jueves 15/9/05									
Viernes 16/9/05			X	X	X	X	X		X
Sábado 17/9/05									
Domingo 18/9/05									
Lunes 19/9/05					X	X			

**Tabla 14.** Toma de muestras de las fermentaciones inoculadas llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2005. Las flechas rojas indican las recargas de mosto fresco realizadas entre las muestras analizadas (color amarillo).

## 2. Aislamiento de colonias

Las cepas de levaduras que se caracterizaron mediante técnicas moleculares fueron aisladas de las muestras que se indican en color amarillo en las tablas de toma de muestras. Para llevar a cabo los aislamientos se aplica el “*método de las diluciones sucesivas*” para lo cual se prepara un banco de diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 en tubos de 1,5 mL.

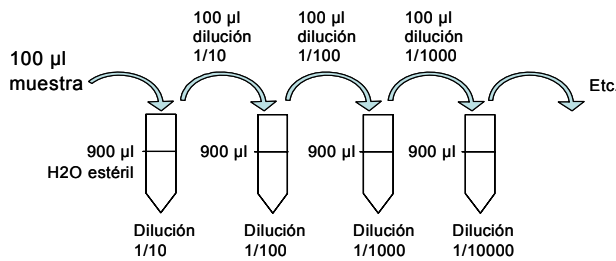


Figura 8. Método de las diluciones sucesivas.

De cada dilución se toman 100 µL que se extienden a modo de césped en placas con medio de cultivo YPD y se incuban a 28 °C durante 4-5 días.

➤ Medio de cultivo YPD: Extracto de levadura 1%; agua de peptona 2%; glucosa 2%; agar 2.5% (medio sólido).

### 2.1. Selección de los aislamientos

Transcurridos los 3-4 días tras la siembra, de las placas más representativas, es decir de las que muestran en torno a 100-200 colonias aisladas, se eligen al azar de 30-40 aislamientos. De manera que con palillos de dientes planos y estériles se recoge cada una de las colonias seleccionadas para sembrarlas a modo de cruz en placas Petri de medio YPD.

### **3. Caracterización genética de las cepas de levaduras mediante la técnica de *Electroforesis en Campo Pulsante***

El estudio de la diversidad genética de las cepas de levaduras responsables de las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo durante las vendimias 1999 y 2000, y el seguimiento de las cepas inoculadas desde la vendimia de 2001 hasta 2005 se realizó mediante la obtención del cariotipo electroforético de un número determinado de asilamientos, obtenidos a partir de las muestras señaladas en amarillo en las tablas, una vez que finalizaron las vendimias.

El estudio del cariotipo de las células de levaduras implica degradar tanto la pared celular como las membranas citoplasmática y nuclear, para conseguir así liberar el material genético y separar posteriormente los cromosomas mediante una Electroforesis de Campo Pulsante. Por lo tanto, la preparación y tratamiento de las muestras se debe realizar evitando la manipulación directa del material genético, ya que de lo contrario se podrían producir roturas de forma aleatoria en los cromosomas, troceándolos en moléculas de pequeño tamaño, lo cual no permitiría su adecuada separación mediante esta técnica. Por este motivo las muestras que se preparan deben contener células intactas embebidas en bloquitos de agarosa (plugs) y ser tratadas para facilitar la salida del ADN sometido a la acción del campo eléctrico.

#### **3.1. Preparación y tratamiento de las muestras**

Existen dos métodos de preparación de las muestras antes de la realización de la electroforesis, la primera es mediante la producción de esferoplastos, y la segunda sin producción de esferoplastos. En el primer caso, la metodología empleada sólo permite procesar un número pequeño de colonias al día, en torno a 6, mientras que en el segundo caso se pueden procesar de 30-40 asilamientos al día, lo cual supone una ventaja cuando se pretende analizar el cariotipo de un número elevado de aislamientos. El protocolo utilizado, basado en el procedimiento descrito por Carle y Olson (1985), se desarrolla a continuación:

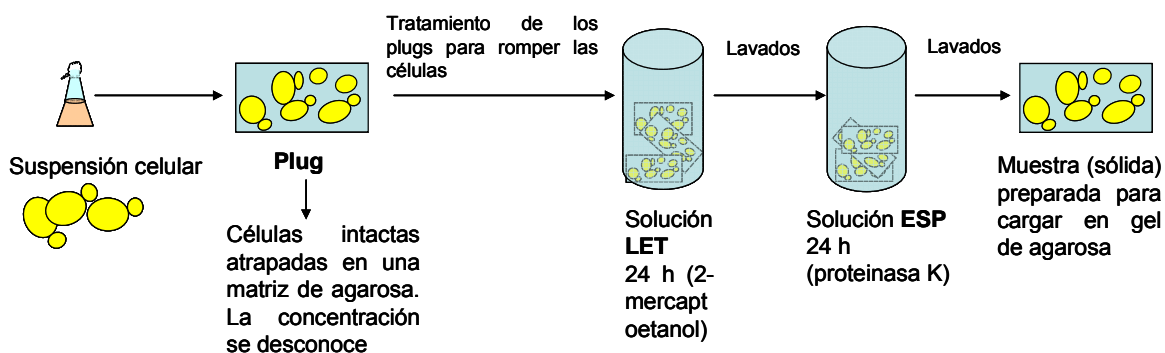
1. Se inocula cada uno de los asilamientos objeto de estudio en 15 mL de medio YPD en tubos estériles de 25 mL, incubándose a 28 °C en agitación (180 rpm) durante toda la noche (Incubador orbital Gallenkamp).
2. Transcurrido ese tiempo se centrifugan los cultivos a 3800 rpm durante 5 minutos.
3. Se desecha el sobrenadante y cada precipitado celular se resuspende en 300-400 µL de la solución de EDTA 50 mM, pH 8, tomándose 300 µL y pasándolos a un tubo de 1.5 mL (Eppendorf, Alemania).
4. Se prepara agarosa de bajo punto de fusión (*Low Melt Preparative Grade Agarose*, Bio-Rad) al 1% en EDTA 50 mM, pH 8 que se calienta a unos 70 °C en el microondas para fundir la agarosa. Después se añaden 300 µL a la suspensión celular de cada aislamiento.
5. La mezcla se homogeniza bien y se reparte en moldes de 100 µL de volumen, de manera que por cada aislamiento en estudio se tengan al menos 5 bloques o plugs, los cuales se dejan enfriar a 4 °C.
6. Una vez que los bloquecitos solidifican, se extraen de los moldes y se introducen en tubos nuevos de 1.5 mL para comenzar el tratamiento de las muestras, de manera que a cada tubo se le adiciona 500 µL de solución LET y se incuban a 37 °C durante 24 horas.
7. Transcurrido ese tiempo, se realizan dos lavados a las muestras en agitación suave durante 10 minutos con la solución de EDTA 50 mM, pH 8 para eliminar los restos del mercaptoetanol.
8. Los plugs correspondientes a cada aislamiento se introducen en tubos nuevos de 1.5 mL y se adicionan 300 µL de solución ESP, incubándose a 50 °C durante 24 horas.

9. Pasado ese tiempo, los plugs se vuelven a lavar con EDTA 50 mM, pH 8 en las mismas condiciones que la primera vez.
10. Finalmente se conservan los plugs en la solución EDTA 50 mM, pH 8 a 4 °C hasta el momento de su utilización en la electroforesis.

➤ Solución LET: EDTA 0.5 M, pH 9; Tris-HCl 10 mM, pH 8; 2-mercaptoetanol 7.5% (v/v) (Sigma).

➤ Solución ESP: EDTA 0.5 M, pH 9; N-lauroilsarcosina 1% (Sigma); proteinasa K 1 mg/mL (Sigma).

Los tratamientos con agente reductor (2-mercaptoetanol) y proteinasa K sirven para desestabilizar y digerir parcialmente la pared y membranas celulares. Por lo tanto, al final de los tratamientos con las dos soluciones se tendrán bloques de agarosa que contendrán células rotas.



**Figura 9.** Esquema seguido en la preparación y tratamiento de las muestras, sin producción de esferoplastos, para llevar a cabo la *Electroforesis en Campo Pulsante*.

### 3.2. Preparación del gel de electroforesis

El gel se prepara al 1% (p/v), disolviendo la agarosa (*Pulsed Field Certified Agarose*, Bio-Rad) en 80 mL del tampón TBE 0.5x por calentamiento en el microondas. A continuación se vierte en un molde de dimensiones 14 x 13 cm, colocando un peine de 15 pocillos. Una vez sólido el gel, se retira el peine,

introduciéndose en cada pocillo los plugs correspondientes a los distintos aislamientos.

➤Tampón TBE 10x: Tris-base 108 g; ácido bórico 55 g; 40 mL EDTA 0.5 M, pH 8.

### 3.3. Electroforesis

Para realizar la *Electroforesis en Campo Pulsante* se utilizó un aparato CHEF-DR II (Bio-Rad). La cubeta de electroforesis consiste en una caja de metacrilato de 43 x 44 cm con 24 electrodos dispuestos en forma hexagonal que rodean al gel y producen un campo eléctrico homogéneo que alterna entre dos direcciones orientadas 120°. Está acoplada a un módulo de control, un termostato que controla la temperatura del tampón de electroforesis y una bomba que lo recircula para mantener la temperatura constante, fijada de antemano.

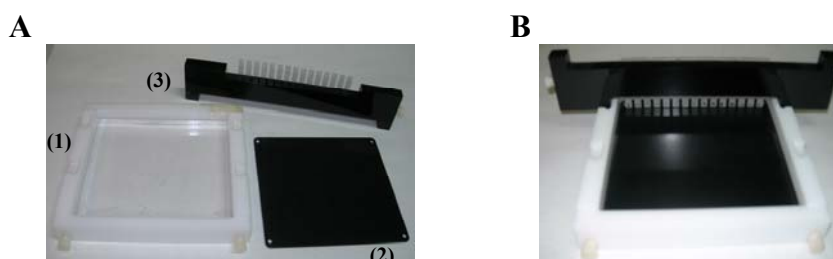
La plataforma sobre la que se asienta el gel se retira del molde y se coloca en el centro de la cubeta, quedando también en el centro del hexágono formado por los electrodos. A continuación se vierte cuidadosamente el tampón de electroforesis hasta cubrir el gel y se introducen las condiciones de electroforesis en el panel del módulo de control.



**Figura 10.** A) Equipo CHEF-DR II utilizado para realizar la *Electroforesis en Campo Pulsante* en el que se muestra de izquierda a derecha la unidad de frío, cubeta de electroforesis y la fuente. B) Disposición hexagonal de los electrodos dentro de la cubeta de electroforesis.

Las condiciones de electroforesis varían según el tamaño estimado del ADN del organismo objeto de estudio. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, para separar los cromosomas con tamaños comprendidos entre 200 y 2200 kb son las siguientes:

- Tampón de electroforesis. TBE 0.5x
- Potencial aplicado: 6 V/cm
- Pulso inicial del campo eléctrico: 60 segundos
- Pulso final del campo eléctrico: 120 segundos
- Tiempo total de la electroforesis: 24 horas
- Temperatura del tampón de electroforesis: 14 °C



**Figura 11.** A) Instrumental necesario para realizar el gel de agarosa, (1) molde, (2) plataforma sobre la que se asienta el gel y (3) peine. B) Resultado del montaje de las tres partes para obtener el gel.

### 3.4. Visualización del ADN cromosómico

Una vez terminada la electroforesis, se retira el gel de la cubeta y se introduce en una solución de Bromuro de Etidio (0.5 µg/mL en tampón TBE 0.5 x) durante 10-20 minutos. El Bromuro de Etidio es un mutágeno que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y presenta fluorescencia bajo la luz ultravioleta. Transcurrido ese tiempo se introduce el gel en una cubeta que contenga el mismo tampón de electroforesis durante 5 minutos para eliminar zonas de tinción inespecíficas o demasiado teñidas. A continuación se coloca el gel en un transiluminador de luz ultravioleta que revela las zonas teñidas con Bromuro de Etidio y se capta la imagen mediante una cámara digitalizadora Gel-Doc 1000 de

Bio-Rad. La imagen digitalizada se analiza mediante el programa informático *Molecular Analyst* (Bio-Rad), el cual permite la determinación del número y tamaño de las bandas una vez separadas.

### **3.5. Conservación de los aislamientos**

Los aislamientos que fueron caracterizados mediante cariotipo electroforético se conservaron de dos formas:

#### **3.5.1. En glicerol**

Se parte de un cultivo joven, en placa de YPD, con los aislamientos que se vayan a conservar. Con un palillo de dientes estéril se recoge toda la biomasa de cada aislamiento y se introduce en un tubo estéril de 1.5 mL (Eppendorf) que contiene 600  $\mu$ L de medio de cultivo líquido YPD. Se disgregan bien las células en un vórtex y se añaden 400  $\mu$ l de glicerol al 50%, quedando la muestra al 20%. Se conservan los tubos en una cámara congeladora a -80 °C.

Para revitalizar los aislamientos, basta con sembrar 100  $\mu$ L en una placa Petri de medio YPD, o bien, en 100 mL de medio YPD líquido y en agitación. La ventaja de conservar de esta forma las cepas es que pueden mantenerse viables durante largos periodos de tiempo, meses e incluso varios años.

#### **3.5.2. En placas de medio YPD**

Consiste en replicar la placa con la colonia aislada e incubarla a 28 °C durante 2-3 días. Una vez crecida se guarda en una cámara termostaticada a 4°C. La ventaja de esta forma de conservación es la rapidez con la que se revitalizan las colonias, aunque presenta el inconveniente de que las placas se pueden contaminar fácilmente, además del corto tiempo de conservación.



## 4. Análisis microbiológicos para llevar a cabo la selección de las cepas de levaduras autóctonas

### 4.1. Cepas utilizadas

Cepas	Cariotipo	Origen
		Depósito E- Vendimia 1999
313.18	P1	313 horas
313.4	P2	313 horas
313.10	P3	313 horas
153.12	P5	153 horas

**Tabla 15.** Cepas pre-seleccionadas, aisladas de la fermentación espontánea del depósito E en la vendimia 1999.

### 4.2. Poder fermentativo. Tasa de consumo de azúcares

El poder fermentativo de una levadura puede ser medido industrialmente por la cantidad de azúcar que puede fermentar, o por la cantidad máxima de alcohol que ha llegado a producir. En nuestro laboratorio ha sido medido en función de la cantidad de azúcar que llegó a fermentar una cepa determinada.

#### 4.2.1. Procedimiento experimental

Se inocula la cepa en estudio en un matraz erlenmeyer conteniendo 100 mL de mosto yema estéril (en autoclave, 126°C, 20 minutos), tapándolo con un algodón hidrófobo para evitar contaminaciones y que la fermentación sea lo más pura posible. Una vez iniciada la fermentación, se hacen medidas de los azúcares reductores, desde el inicio hasta el final de la fermentación, utilizando el método oficial de la OIV (*Organización Internacional de la Vid y el Vino*). Los criterios que se tomaron para decidir el final de la fermentación fueron:

- desaparición de la espuma en la superficie del mosto fermentado
- ausencia de desprendimiento de CO<sub>2</sub>

- olor a vino

#### 4.2.1.1. Determinación de azúcares reductores por el método oficial

La *materia reductora* del vino es aquella capaz de reaccionar con una solución cupro-alkalina. La constituyen en su mayoría la materia colorante (taninos y antocianos), los azúcares reductores y algunos otros compuestos con función cetona o aldehído de carácter reductor. La materia reductora y los azúcares reductores tienen un mismo método de análisis, y sólo se diferencian en el pretratamiento que sufre la muestra para eliminar o enmascarar toda materia reductora distinta de los azúcares, en el caso de que queramos determinar solo éstos.

El método oficial se basa en valoraciones de tipo redox, y consisten en hacer reaccionar la disolución problema azucarada (mosto o vino) con una cantidad de solución patrón de Cu (II) en medio básico, y la posterior determinación por yodometría de los iones cúpricos en exceso.

El desarrollo experimental se detalla a continuación:

1. En un erlenmeyer de 250 mL, se ponen 25 mL de la solución cupro-alkalina, 15 mL de agua y 10 mL de la solución problema (no debiendo contener más de 60 mg de azúcar).
2. A continuación se añaden algunos granos de piedra porosa y se calienta hasta llevarlo a ebullición, que deberá alcanzarse en 2 minutos. Se mantiene la ebullición durante 10 minutos exactamente.
3. Pasado este tiempo, se enfría inmediatamente bajo un chorro de agua fría. Una vez que se haya enfriado completamente, se añaden 10 mL de solución de KI al 30%, 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25%, y 2 mL de engrudo de almidón.
4. A continuación se valora con la solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 0.1 M. Como prueba en blanco de comparación, se efectuará un proceso de valoración similar, pero utilizando 10 mL de agua destilada en lugar de los 10 mL de muestra. Los

resultados se expresan en g/L de azúcar reductor. Los gramos se obtienen a partir de la tabla siguiente:

Corresponde al volumen de tiosulfato 0,1 N gastado (n'-n)					
Tiosulfato mL	Azúcar mg	Diferencia	Tiosulfato mL	Azúcar mg	Diferencia
1	2,4	2,4	13	33,0	2,7
2	4,8	2,4	14	35,7	2,8
3	7,2	2,5	15	38,5	2,8
4	9,7	2,5	16	41,3	2,9
5	12,2	2,5	17	44,2	2,9
6	14,7	2,6	18	47,1	2,9
7	17,2	2,6	19	50,0	3,0
8	19,8	2,6	20	53,0	3,0
9	22,4	2,6	21	56,0	3,1
10	25,0	2,6	22	59,1	3,1
11	27,6	2,7	23	62,2	
12	30,3	2,7			

**Tabla 16.** Correspondencia entre los mL de tiosulfato, gastados en la valoración, y cantidad de azúcar (mg), expresada ésta en azúcares reductores contenida en la muestra analizada, en función de n'-n. Siendo n' el volumen, en mL, de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N utilizados en la prueba en blanco; y n el volumen, en mL, de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N utilizados en la valoración de la muestra.

La tasa de consumo de azúcares se calculó haciendo un ajuste lineal de los valores medidos de azúcares reductores a lo largo de la fermentación para la cepa en estudio.

- 
- Solución cupro-alcalina: 25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  puro; 50 g ácido cítrico; 388 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ ; hasta 1 L de agua destilada.
  - Solución KI: 30%. Debe ser conservada en frasco topacio.
  - Engrudo de almidón: al 5%, contendrá 200 g de NaCl para asegurar su conservación. Esta solución debe ser mantenida 10 minutos en ebullición en el momento de su preparación.
- 

### 4.3. Estudio de la tolerancia al etanol

Este análisis consiste en medir el grado de inhibición que ejercen distintas concentraciones de etanol adicionadas al medio de cultivo YPD sobre el crecimiento

celular de una determinada cepa de levadura, en este caso sobre las pre-seleccionadas que se indican en la Tabla 15.

#### 4.3.1. Procedimiento experimental

1. Se parte de un matraz erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio YPD estéril que se inocula con la cepa a estudiar. Se deja creciendo durante toda la noche a 28 °C y en agitación a 180 rpm.
2. Transcurrido este tiempo, se hace un recuento de células con una cámara Neubauer para tomar el volumen correspondiente a  $2 \times 10^6$  células/mL aproximadamente, de manera que ése será el volumen del cultivo que se añada a cada uno de los tres matraces que contienen las distintas concentraciones de etanol absoluto (0%, 5% y 10% v/v) que se preparan de la siguiente forma:
  - Matraz I: mL del cultivo + mL de medio YPD (hasta llegar a 100 mL)
  - Matraz II: mL del cultivo + 5 mL EtOH absoluto + mL de YPD (hasta 100 mL)
  - Matraz III: mL del cultivo + 10 mL EtOH absoluto + mL de YPD (hasta 100 mL)
3. Cada 2 horas se van tomando muestras de los tres matraces y se hace un recuento de células, en una cámara Nuebauer, para observar el crecimiento celular.

La tasa de crecimiento celular viene dada por la expresión:

$$Ln = Ln_0 + \mu t$$

Siendo  $N_0$ , el número inicial de células inoculadas ( $2 \times 10^6$  cél/mL);  $N$ , el número de células medido cada dos horas;  $\mu$ , la tasa de crecimiento; y  $t$ , el tiempo. Esta expresión se asemeja a la ecuación de una recta, por lo que la tasa de crecimiento se obtiene cuando se hace el ajuste lineal de los datos.

El porcentaje de inhibición se calcula, para cada una de las concentraciones de etanol, a partir de la tasa de crecimiento mediante la fórmula:

$$\% i [\text{EtOH}] = \left[ 1 - \frac{\mu (\text{YPDE} [\text{EtOH}])}{\mu (\text{YPD})} \right] \times 100$$

#### 4.4. Estudio del factor killer

El estudio de las posibles características matadoras de una cepa de levadura implica la utilización de un medio de crecimiento sólido que contiene azul de metileno tamponado entre pH 4,2-4,7.

##### 4.4.1. Composición química y preparación del medio MBM

Está formado por tres fracciones que se esterilizan por separado:

**Medio A:** Peptona 4%, extracto de levadura 2%, glucosa 4%, agar 4% y agua destilada.

Se esteriliza en autoclave (126°C, 20 minutos, 1 atmósfera de presión). Si se quiere preparar 1 litro de medio MBM, habrá que preparar 500 mL de *Medio A*.

**Medio B:** Tampón citrato-fosfato 1M, pH 4,5.

Se mezclan 250 ml de citrato 1 M con la cantidad necesaria de fosfato 1 M hasta que se alcance un pH de 4,5 (aproximadamente unos 450 mL). Se toman 500 mL de la mezcla resultante y se esterilizan por filtración amicróbica. Esta consiste en acoplar un matraz kitasato a una bomba de vacío. En la parte superior del matraz se coloca un embudo de filtración, insertando en su parte intermedia un filtro de 0,45 µm de poro que no permite el paso de microorganismos con un tamaño superior al del poro. Se conecta la bomba de vacío y se vierte la solución a esterilizar en el embudo, de manera que el líquido ya estéril se va recogiendo en el matraz.

**Medio C:** Solución de azul de metileno.

Se preparan una solución de 10 mL de azul de metileno al 3% que se esteriliza también por filtración amicróbica.

Tras esterilizar por separado las tres fracciones, se mezclan asépticamente a 60°C, se vierten en placas Petri y se espera a que solidifiquen para poder realizar los experimentos.

#### 4.4.2. Procedimiento analítico

Se necesita una cepa de levadura matadora y una sensible. Para realizar la detección del fenotipo killer se ha partido de las siguientes cepas cedidas por la *Colección de Cultivos Tipo Española (CCTE)*:

- 1101: Productora de la toxina  $k_1$  (matadora)
- 5X47: Productora de la toxina  $k_0$  (sensible)

Ambas cepas se rejuvenecen en medio YPD sólido. A las 24 horas se siembran en tubos estériles de 25 mL con 2 mL de YPD líquido, incubándose a 30°C en agitación. A las 48 horas los cultivos desarrollados se diluyen con agua estéril hasta la dilución 1/100. Posteriormente se toman 0,8 mL de esta dilución y se extienden a modo de césped con un asa de cultivo sobre las placas de medio MBM. Se espera unas horas hasta que la superficie se seque y después se siembra una estría (con un palillo de dientes estéril) con las cepas a estudiar. Las placas se incuban a 23 °C, pudiéndose observar los resultados a partir de las 72 horas.

Para cada cepa que se estudie serán necesarias por lo tanto dos placas, una con césped de levadura de fenotipo matador y otra con césped de levadura sensible (Suárez 1997).

### 4.4.3. Interpretación de los resultados

- Cepas matadoras: Crecen en las dos placas y forman halo de inhibición en el césped de la cepa sensible
- Cepas neutras: Crecen sobre los dos céspedes de cepas control, matadoras y sensibles
- Cepas sensibles: Sólo crecen sobre el césped sensible y mueren sobre el césped matador

---

➤Tampón citrato-fosfato 1 M, pH 4,5: Ácido cítrico monohidratado 1 M; di-potasio hidrogenofosfato anhídrido 1 M.

➤Solución de azul de metileno: Azul de metileno al 3%. Se prepara en agua destilada.

---

## 5. Micro-Fermentaciones puras

### 5.1. Cepas utilizadas

Cepas	Origen		
313.4	Dep. E	313 horas	Vendimia 1999
313.10	Dep. E	313 horas	Vendimia 1999
153.12	Dep. E	153 horas	Vendimia 1999
162.12	Dep. E	162 horas	Vendimia 2001
48.5	Dep. G	48 horas	Vendimia 2001
Fermivin	Comercial		

**Tabla 17.** Cepas utilizadas para realizar las micro-fermentaciones puras en mosto natural.

## 5.2. Desarrollo experimental

El estudio se llevó a cabo utilizando mosto natural descongelado, procedente de la variedad de uva *Palomino Fino* procedente de la vendimia del año 2001.

1. El mosto se reparte entre diversos matraces erlenmeyer, de manera que se adicionan 100 mL a 12 matraces de 250 mL (6 por cada cepa a estudiar y por duplicado) y 900 mL a otros 12 matraces de 1 L.
2. A continuación se esterilizan los matraces con el mosto en autoclave en condiciones suaves, 100 °C durante 30 minutos.
3. Cada una de las cepas se inocula en 100 mL de medio YPD dejándose a 28 °C en agitación a 180 rpm durante toda la noche.
4. De cada cultivo se hacen diluciones hasta 1/100 y se cuenta el número de células vivas/mL utilizando el método del “*azul de metileno*”, de manera que de cada cultivo se calcula el volumen necesario para inocular en los 100 mL de mosto  $5,5 \times 10^6$  cel v/mL.
5. Se centrifuga el volumen calculado a 3800 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 5 mL de agua estéril. Se vuelve a centrifugar, se desecha el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 5 mL de mosto estéril, el mismo que se utiliza para el experimento.
6. Se adiciona la suspensión celular a los 100 mL de mosto que se encontraban en los matraces de 250 mL. Se dejó fermentar sin agitación a 20-22 °C.
7. Los 100 mL de mosto fermentando sirvieron como pie de cuba para inocular el volumen final, 900 mL de mosto sobre el que se hicieron los análisis de catas. De manera que a los tres días tras la inoculación en 100 mL se realizó el escalamiento tomando de cada fermentación 36 mL que se adicionaron a los 900 mL finales de mosto. De esta forma el inóculo supuso el 4% del volumen total a inocular.



Los matraces inoculados se dejaron fermentar a 20-22 °C sin agitación. El seguimiento de las fermentaciones se realizó midiendo diariamente el grado Baumé, dándose por finalizadas cuando éste llegó a cero, y dejó de apreciarse desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

La medida del °Be se llevó a cabo utilizando un areómetro (Proton). Los valores se presentan para una temperatura de 20 °C, por lo que a la vez que se mide la densidad de la muestra con el areómetro hay que medir la temperatura y hacer las correcciones según la Tabla 18.

Tª (°C)	CORRECCIONES
	a restar
15	0,25
16	0,2
17	0,15
18	0,1
19	0,05
20	sin corrección
	a sumar
21	0,05
22	0,1
23	0,15
24	0,2
25	0,25
26	0,3
27	0,35
28	0,4
29	0,45
30	0,5
31	0,55
32	0,6
33	0,65
34	0,7
35	0,75
36	0,8

**Tabla 18.** Tabla de correcciones de los valores del grado Baumé medidos a partir de un areómetro.

### 5.3. Medida de la viabilidad celular. Método del “azul de metileno”

La viabilidad celular se determinó utilizando el método del azul de metileno (E.B.C. 1977). Dicho método permite observar al mismo tiempo, en el microscopio, tanto células totales como células viables, teniendo el resultado en poco tiempo.

Para llevar a cabo dicha medida, del cultivo en estudio, previamente homogeneizado, se toman una muestra y se hacen distintas diluciones con agua destilada, 1/10, 1/100 o 1/1000, y en función de lo crecido que esté el cultivo, se elegirá una u otra para hacer el recuento. Se toma 1 mL de cada dilución y se le adiciona 1 mL de la solución de viabilidad. Se deja la mezcla en agitación 10 minutos y después se hace el recuento en una cámara Neubauer. Las células viables tienen activas las enzimas necesarias para degradar el azul de metileno, quedando por tanto sin teñir. Por el contrario, las células muertas se mantienen inactivas frente a este colorante, y por tanto, quedan teñidas de color azul. El porcentaje de células sin colorear nos dará la medida de la viabilidad celular.

---

➤ Solución de viabilidad: 0.01 g azul de metileno; 2 g citrato sódico di-hidrato; 10 mL agua destilada. Filtrar y llevar hasta 100 mL con agua destilada. Conservar en oscuridad.

---

## 6. Curvas de viabilidad a distintas temperaturas

### 6.1. Cepas utilizadas en el estudio

Cepas	Origen
313.4	Vendimia 1999
153.12	Vendimia 1999
48.5	Vendimia 2001
Fermivin	Comercial
X2180	Cepa de laboratorio

**Tabla 19.** Cepas utilizadas en el estudio de micro-fermentaciones puras llevadas a cabo a distintas temperaturas.

### 6.2. Composición química y preparación del mosto sintético

Se utilizó la composición descrita por Rossignol y colaboradores (2003).

Para preparar 1 litro de mosto sintético se utilizan los siguientes compuestos:

**Azúcar**

(1) Glucosa .....200 g

**Ácidos**

(2) Ácido málico .....6 g

(3) Ácido cítrico.....6 g

**Minerales**

(4)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0.750 g

(5)  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .....0.500 g

(6)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0.250 g

(7)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0.155 g

(8)  $\text{NaCl}$ .....0.200 g

**Nitrógeno**

(9)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....0.460 g

(10) Solución stock de Aminoácidos.....13.09 mL

**Oligoelementos**

(11) Solución stock de Oligoelementos.....1 mL

**Vitaminas**

(12) Solución stock de Vitaminas.....10 mL

**Factores Anaerobios**

(13) Solución stock de Factores Anaerobios...1 mL

Se prepara en agua destilada y se ajusta el pH a 3.3. A continuación se esteriliza 30 minutos en autoclave a 100 °C.

**Soluciones stock**

- Solución stock de Aminoácidos

Se prepara el stock en 1 litro de una solución tampón de  $\text{NaHCO}_3$  al 2% (20 g/L) a la cual se le adicionan los siguientes aminoácidos (SIGMA):

Tirosina.....	1.4 g (calentar a 100 °C)
Triptófano.....	13.7 g (calentar a 70 °C)
Isoleucina.....	2.5 g (calentar a 70 °C)
Ácido Aspártico.....	3.4 g (desprende $\text{CO}_2$ )
Ácido glutámico.....	9.2 g (desprende $\text{CO}_2$ )
Arginina.....	28.6 g
Leucina.....	3.7 g (aumentar la temperatura para disolverlo)
Treonina.....	5.8 g
Glicina.....	1.4 g
Glutamina.....	38.6 g
Alanina.....	11.1 g
Valina.....	3.4 g
Metionina.....	2.4 g
Fenilalanina.....	2.9 g
Serina.....	6.0 g
Histidina.....	2.5 g
Lsina.....	1.3 g
Cisteína.....	1.0 g
Prolina.....	46.8 g (opcional)

Una vez que se tenga la mezcla, se reparte en tubos estériles conteniendo cada uno 13.09 mL del stock que se conservan a -20 °C.

- Solución stock de Oligoelementos

Se prepara 1 litro con los siguientes elementos:

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	4 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	1 g
KI.....	1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.4 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	1 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ .....	1 g

La solución se conserva en frío a 4 °C.

- Solución de stock de Vitaminas

Primero se preparan 100 mL de una solución stock de Biotina con una concentración de 100 mg/L que se conserva a -20 °C. A continuación se prepara 1 L con los siguientes elementos:

Meso-inositol.....	2.000 g
Pantotenato de calcio.....	0.150 g
Tiamina.....	0.025 g
Ácido nicotínico.....	0.200 g
Piroxidina.....	0.025 g
Biotina (tomar de la solución stock).....	3 mL

La solución stock se reparte en tubos estériles conteniendo cada uno 10 mL que se conservan a -20 °C.

- Solución stock de los Factores Anaerobios

Se preparan 100 mL de la solución con los siguientes elementos:

Ergosterol.....	1.5 mL
Ácido oléico.....	0.5 mL
Etanol al 100% + Tween 80.....	50 mL + 50 mL

Para preparar la solución, se pesan 1.5 g de ergosterol y 0.5 g de ácido oléico y se añaden a la mezcla formada por 50 mL de Etanol (100%) + 50 mL de Tween 80. Para disolverlo se calienta a 70 °C. Después se vuelve a enrasar (se evapora etanol) utilizando etanol en caso necesario para completar el volumen perdido. Se conserva la solución en frío a 4 °C.

### 6.3. Procedimiento experimental

1. Las cepas a ensayar se crecen en medio YPD durante toda la noche, en agitación y a 28 °C (incubador orbital Gallenkamp).

2. A continuación se mide el número de células vivas/mL para cada cepa con el método del “*azul de metileno*” utilizando una cámara Neubauer. En función del resultado se toma el volumen necesario de cada cultivo teniendo en cuenta el número de células vivas/mL que se van a inocular en el volumen de mosto sintético predeterminado. En este experimento se inocularon  $1 \times 10^6$  cel v/mL en 250 mL de mosto sintético.
3. Posteriormente se toma de cada cultivo el volumen calculado, se lleva a tubos estériles de 25 mL (Eurotubo) y se centrifugan a 3800 rpm durante 5 minutos.
4. Se elimina el sobrenadante y cada precipitado celular se resuspende en 5 mL de agua estéril para lavarlo. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones de antes, se desecha el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 5 mL de mosto sintético.
5. Por otro lado se tienen preparados matraces erlenmeyer de 500 mL conteniendo cada uno 250 mL de mosto estéril, de manera que cada suspensión celular se adiciona a los matraces los cuales se dejan fermentar sin agitación en un incubador orbital a la temperatura que se vaya a ensayar (Incubador Gallenkamp, modelo IMR 250).

### 6.3.1. Medida del grado Beaumé

La medida del °Be se realizó diariamente, y dado el pequeño volumen de mosto utilizado para llevar a cabo los ensayos, y para evitar perder esterilidad en cada fermentación, se utilizó un densímetro de la marca Antón Paar (DMA 35 N, Density Meter, versión de software V2.014). Por tanto, para utilizarlo correctamente primero, de cada fermentación, se centrifugaron muestras de 3 mL para eliminar las posibles burbujas, atemperando cada una a 20 °C antes de realizar la medida con el aparato.

### **6.3.2. Determinación del grado alcohólico**

Se llevó a cabo mediante destilación, una vez que las fermentaciones finalizaron. Para ello se echa en un matraz aforado de 50 mL el vino sin llegar a enrasarlo, se atempera a 20 °C y después es cuando se enrasa. A continuación se realiza la destilación, y se recoge el destilado en el matraz aforado de 50 mL el cual se introduce en hielo. Posteriormente se atempera el destilado a 20 °C y se enrasa hasta 50 mL con agua destilada. Después se mide el grado alcohólico (volumen/volumen) con el aparato de Antón Paar.

## **7. Estudio de la estabilidad de los cariotipos**

Las cepas utilizadas en este estudio fueron las mismas que se indican en la Tabla 19. El medio empleado para realizar los cultivos seriados con cada cepa fue mosto sintético cuya composición se describe en el apartado 6. 2.

### **7.1. Procedimiento experimental**

1. Cada una de las cepas se crece en medio YPD durante toda la noche incubándose a 28 °C en agitación (180 rpm) (Incubador orbital Gallenkamp).
2. Posteriormente de cada cepa se cuenta el número de células/mL utilizando una cámara Nuebauer.
3. De cada cultivo de toma el volumen necesario para inocular en 15 mL de mosto sintético  $2 \times 10^6$  células/mL. A continuación se centrifuga a 3800 rpm durante 5 minutos el volumen calculado, se elimina el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 5 mL agua estéril para lavarlo.
4. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, se vuelve a desechar el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 2 mL de mosto sintético.

5. Cada suspensión celular se adiciona a tubos estériles de 25 mL (Eurotubo) conteniendo cada uno 13 mL de mosto sintético para tener en total los 15 mL establecidos para el crecimiento.
6. Los cultivos se incuban sin agitación en una cámara termostatzada a 20 °C a fin de imitar de forma aproximada las condiciones reales de la fermentación de un vino blanco.

En el caso de suplementar el medio al 7% de etanol se utilizó Etanol Absoluto (100%). Para ello las cepas se fueron acondicionando a concentraciones consecutivas de etanol desde el 1% hasta 7%, de manera que se aumentó el contenido en etanol en cada pase realizado en los cultivos seriados hasta llegar al 4%, y se mantuvieron en las siguientes concentraciones durante 5 pases hasta llegar al 7%.

## **7.2. RFPL del ADN mitocondrial**

### **7.2.1. Extracción del ADN genómico de levaduras**

El ADN de las distintas cepas se aisló utilizando el kit *FastDNA®Kit* (Q-BIOgene) procediendo de la siguiente forma:

1. Se crece en 100 mL de YPD la cepa de levadura durante toda la noche incubándose en agitación a 180 rpm y a 28 °C (Incubador orbital Gallenkamp).
2. Se toma un volumen suficiente de cultivo para proporcionar un tamaño de pellet entre 50-100 mg, para lo cual se centrifugan 40 mL de cultivo a 3800 rpm. Después se desecha el sobrenadante.
3. Se adiciona 1 mL de la solución de lisis CLS-Y (Q-BIOgene), se resuspende el pellet y se transfiere 1 mL a un tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) que contiene la Matriz de lisis (2 esferas ¼'' + matriz granulada).



4. Se introduce el tubo en el aparato Fast-Prep® a velocidad 4.0 durante 30 segundos.
5. Después se centrifuga el tubo a 13000 rpm durante 15 minutos para precipitar los restos celulares.
6. Se transfieren 600 µL del sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL y se añaden 600 µL de la solución Binding Matriz (Q-BIOgene). Se mezcla suavemente y se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Posteriormente se centrifuga durante 10 segundos a 13000 rpm y se elimina el sobrenadante.
8. Al precipitado se le adiciona 500 µL de la solución SEW-M (Q-BIOgene), se mezcla bien y se transfiere todo a un tubo nuevo sobre el que va colocado un filtro (tubo Spin-Filter).
9. Se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto, se elimina el sobrenadante y se vuelve a centrifugar el tubo con el filtro a la misma velocidad durante 2 minutos, con el objetivo de secar la membrana.
10. A continuación se introduce el filtro en un nuevo tubo de 1.5 mL y se adicionan 100 µL de agua destilada estéril. Se deja en reposo durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.
11. Se centrifuga la muestra a 13000 durante 1 minuto y se retira el filtro, quedando la muestra de ADN resuspendida en los 100 mL de agua estéril en el tubo, la cual puede utilizarse a continuación o conservarse a -20 °C.

#### 7.2.1.1. Eliminación del ARN

1. Para los 100 µL de ADN obtenidos en el apartado anterior se adiciona el volumen necesario de *RNasa* (Sigma) (10 mg/mL) para tener una concentración final de 100 µg/mL, incubándose 1 hora a 37 °C.

2. Posteriormente se adicionan 18  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  5 M + EtOH 100% y se incuban bien a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  durante 45 minutos, o bien a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante toda la noche.
3. Centrifugar a 13000 rpm a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos
4. Se elimina el sobrenadante y se adicionan 500  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70%, centrifugando posteriormente en las mismas condiciones anteriores.
5. Se elimina el sobrenadante y se seca el ADN en una bomba de vacío. Después se resuspende el ADN en 40  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se conserva a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 7.2.2. Digestión con enzimas de restricción

El volumen de ADN, disuelto en agua estéril, para ser empleado en las reacciones de digestión es función de la concentración del ADN que se haya extraído, de manera que para una concentración de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , empleando un volumen de 5  $\mu\text{L}$  se obtienen resultados satisfactorios.

Las enzimas de restricción fueron empleadas siguiendo las instrucciones de los proveedores (Amersham, Fermentas) y fueron las siguientes: *Hinf I*, *Alu I* y *Rsa I* (*Afa I*). Cada enzima posee su propio tampón de reacción con una composición determinada, a una concentración de 10x.

Las digestiones realizadas fueron simples, es decir, que cada cepa en estudio se trató con cada una de las enzimas independientemente.

El volumen de reacción utilizado en las digestiones fue de 20  $\mu\text{L}$ , adicionando en un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

- Buffer o tampón de cada enzima de restricción: se toma 1/10 del volumen total de reacción
- Enzima de restricción: se toma 1  $\mu\text{L}$  (al adicionar 1  $\mu\text{L}$  de enzima, se introducen 10 unidades en el caso de *Alu I* y *Rsa I*, y 12 para *Hinf I*)

- Agua estéril: para completar el volumen de reacción
- ADN que va a ser digerido extraído o purificado de un aislamiento determinado

Siendo el orden de adición de los reactivos el siguiente: agua, buffer, enzima, ADN. Cuando se realizan muchas digestiones a la vez, es más fácil preparar una mezcla de reacción de agua, buffer y enzima. Esta mezcla puede ser alicuoteada en cada tubo y añadir después el ADN. Las digestiones pueden ser preparadas a temperatura ambiente pero las enzimas de restricción o la mezcla de reacción deben ser almacenadas en hielo antes de usarlas.

Las digestiones se llevan a cabo incubándose a la temperatura óptima de actividad de las enzimas de restricción, que es para las empleadas de 37 °C, durante 2-3 horas.

### **7.2.3. Electroforesis en gel de agarosa**

Para visualizar el ADN genómico aislado de las cepas de levaduras, así como los fragmentos obtenidos tras la digestión del ADN con las enzimas de restricción, se realiza una electroforesis utilizando un gel de agarosa (*Molecular Biology Certified Agarose*, Bio-Rad) al 1% en TBE 1x, adicionando además Bromuro de Etidio (0.5 µg/mL).

En el caso de la digestión, se carga en cada pocillo del gel el volumen total de la digestión de cada muestra más el tampón de carga. Se fija la intensidad del campo eléctrico a 12 mA y se corre la electroforesis durante varias horas utilizando como tampón de electroforesis TBE 1x.

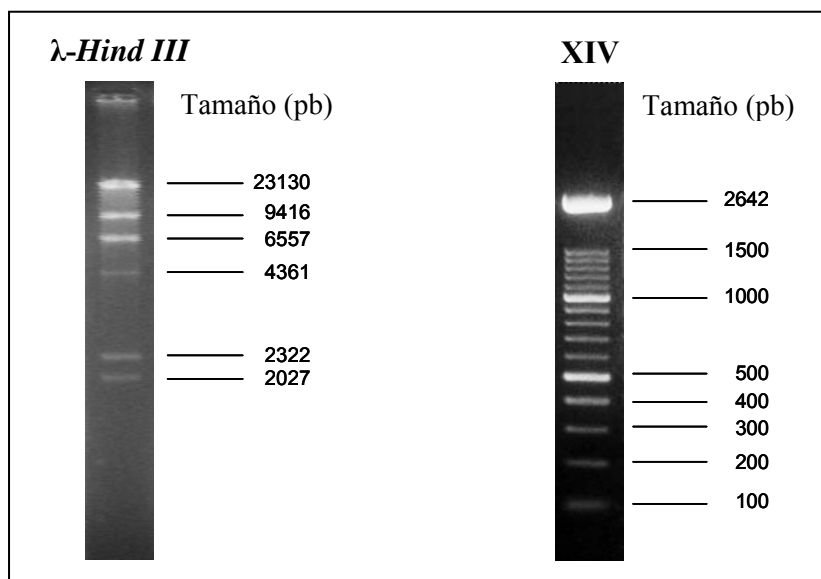
En el caso de querer visualizar el ADN aislado de una cepa determinada, se cargan en cada pocillo 2 µL de la muestra mas el tampón de carga, dejando correr la electroforesis durante 1 hora y media.

Para visualizar los resultados, se coloca el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline TVC-312A, Bio-Rad) que revela las zonas teñidas con

Bromuro de Etidio. El tamaño de las bandas se determina por comparación con un patrón conocido, utilizando por tanto un marcador de pesos moleculares, como  $\lambda$ -*Hind III* (Promega) o el marcador XIV (Roche Diagnostics, Mannheim).

En el caso de analizar los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial se utilizó el marcador  $\lambda$ -*Hind III* (5  $\mu$ L), el cual consiste en ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Hind III*. Los tamaños moleculares de los fragmentos obtenidos para este marcador mediante electroforesis se muestran en la Figura 12.

➤ Tampón de carga (6x): Sacarosa 40% (p/v); EDTA 10 mM; Azul de Bromofenol 0.25% (p/v).



**Figura 12.** Marcadores de pesos moleculares,  $\lambda$ -*Hind III* y marcador XIV.

### 7.3. Hibridaciones ADN-ADN

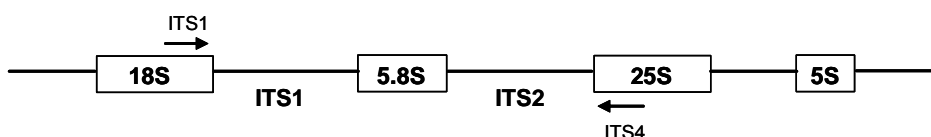
#### 7.3.1. Descripción y obtención de las sondas

Para obtener una sonda y utilizarla en posteriores experimentos de hibridación los pasos que se siguieron fueron: (i) amplificación mediante PCR de la

secuencia que se va a utilizar como sonda; (ii) visualización del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa; (iii) purificación del producto de PCR y (iv) marcaje de la sonda con digoxigenina.

### 7.3.1.1. Sonda ribosómica ITS1-5.8S-ITS2

La amplificación de la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 mediante PCR se llevó a cabo utilizando los primer ITS1 e ITS4 que fueron descritos por White y colaboradores en 1990. El esquema correspondiente a los genes ribosómicos donde se encuentra la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Representación esquemática de la región de los genes ribosómicos presentes en tándem en el cromosoma XII de *S. cerevisiae*, donde se indica la secuencia a amplificar mediante PCR utilizando los *primers* ITS1 e ITS2 (*ITS internal transcribed spacer*).

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Para llevar a cabo la PCR se utilizó el ADN aislado de la cepa de laboratorio diploide X2180 mediante el kit *FastDNA®Kit* (Q-BIOgene), como se detalla en el apartado 7.2.1.

La reacción se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ L, utilizando los siguientes reactivos: 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 1  $\mu$ M de cada primer, 1 U de la enzima polimerasa *Taq* (Roche Molecular Biochemicals), el tampón apropiado para la enzima al 1x y 1  $\mu$ L del ADN molde.

Las condiciones de reacción introducidas en el aparato (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) fueron: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C; a continuación 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 10 minutos a 72 °C.

Para calcular la temperatura de hibridación de la secuencia amplificada de 158 pb se aplicó la fórmula siguiente (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*, Roche Diagnostics, Mannheim):

$$T \text{ media} = 49,82 + 0,41 (\% G + C) - (600/I)$$

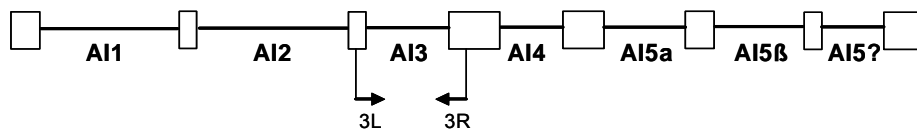
I = longitud de la secuencia (sonda) en pares de bases (pb)

$$T \text{ óptima} = T_m - 20-25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

El contenido en G + C se calculó mediante el programa informático *Bioedit* versión 7. 0. 5. 3., propuesto por Hall en 1999.

### 7.3.1.2. Sonda del intrón AI3 del gen mitocondrial *COX1*

Los *primers* utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR fueron 3L y 3R, adecuados para la amplificación del intrón AI3 situado dentro del gen *COX1* mitocondrial. Se obtuvieron a partir de la secuencia del genoma mitocondrial, publicada en la página de Internet *Saccharomyces Genome Database* (SGD), que fue descrita por Foury y colaboradores en 1998. El esquema correspondiente al gen *COX1* se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Representación esquemática del gen mitocondrial *COX1* de *S. cerevisiae*, donde se indican los *primers* utilizados, 3L y 3R, para amplificar el intrón AI3. Los rectángulos representan a los exones.

3L (5'-GCTTTAATTGGAGGTTTGG-3')

3R (5'-ATTGTCATACCATTTGTTCTCAT-3')

La PCR se llevó a cabo utilizando como ADN molde el aislado de la cepa de laboratorio diploide X2180 a partir del kit *FastDNA®Kit* (Q-BIOgene), como se detalla en el apartado 7. 2. 1.

El volumen final de reacción fue de 50  $\mu\text{L}$  y se utilizaron los siguientes reactivos: 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  de la mezcla de los dNTPs, 0.5  $\mu\text{M}$  de cada

primer, 2 U de la enzima polimerasa *Taq* (Roche Molecular Biochemicals) y 1  $\mu$ L del DNA molde. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar el ADN; a continuación 25 ciclos de 1 minuto y 30 segundos a 95 °C, 2 minutos y 30 segundos a 58 °C y 3 minutos y 30 segundos a 72 °C; y para finalizar 10 minutos a 72 °C.

La temperatura de hibridación se calculó aplicando la misma fórmula que en el caso anterior para la secuencia amplificada del intrón AI3, que tuvo un tamaño de 1833 pb. Utilizando el programa informático citado anteriormente se calculó el contenido en G + C.

#### **7.3.1.3. Visualización de los productos de PCR**

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa como se detalla en el apartado 7. 2. 3, cargando en cada pocillo 2  $\mu$ L de muestra más el tampón de carga. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el marcador XIV (2  $\mu$ L) (Roche Diagnostics, Mannheim) (Figura 12).

#### **7.3.1.4. Purificación de los productos de PCR**

Se hizo mediante el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor. Al final se tiene el producto amplificado purificado resuspendido en 40  $\mu$ L del tampón Elution Buffer incluido en el kit.

#### **7.3.2. Marcaje de las sondas**

Para marcar las sondas se ha utilizado el método de *Random primed*, utilizando el kit *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche Diagnostics, Mannheim). Este método se basa en el anillamiento de oligonucleótidos al azar en el ADN desnaturalizado. La cadena de ADN complementaria se sintetiza a partir de los extremos 3'-OH de los oligonucleótidos, utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*. Al sintetizarse la nueva hebra se introducen moléculas de digoxigenina en forma de DIG-11-dUTP cada 20-25 posiciones.

La reacción de marcaje se lleva a cabo en un tubo de 1.5 mL en un volumen total de 16  $\mu$ L de agua estéril en el que hay resuspendido 1  $\mu$ g del ADN purificado que va a servir como sonda. Se hierva durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN y a continuación se introduce en hielo durante 2-4 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añade 4  $\mu$ L de la mezcla de DIG-High Prime, se homogeniza bien y se incuba a 37 °C durante 20 horas. La reacción se detiene adicionando 2  $\mu$ L de EDTA 0.2 M pH 8 y se calienta a 65 °C durante 10 minutos. La sonda marcada se conserva a -20 °C hasta el momento de ser utilizada.

### **7.3.3. Transferencia del ADN de los geles de agarosa a filtros de nylon**

La transferencia de las moléculas de ADN separadas en una electroforesis en gel de agarosa a un soporte sólido es lo que se denomina Southern blot o transferencia de Southern (Southern 1975). Actualmente los soportes sólidos más comunes, por ser más resistentes, son los de nitrocelulosa o de nylon. La transferencia es el paso previo a la hibridación de todo ácido nucleico. El procedimiento seguido para transferir el ADN a filtros de nylon (Hybond-NX, Amersham Biosciences. Reino Unido) fue el siguiente:

1. El gel de electroforesis que se vaya a transferir se fotografía y posteriormente se mantiene 5 minutos en agua destilada con agitación moderada. Después se trata con las siguientes soluciones en el orden que se indica:
  - (i) 20 minutos con HCl 0.2 N, para depurinizar parcialmente el ADN,
  - (ii) 45 minutos con una solución desnaturalizante, para desnaturalizar la doble hélice de ADN,
  - (iii) y por último, 45 minutos con una solución neutralizante, para mantener el ADN desnaturalizado, bajando el pH a un valor adecuado para continuar con los siguientes pasos.
2. La transferencia se lleva a cabo en una cubeta a la que se adiciona SSC 20x, situando sobre ésta un soporte sólido. Encima del soporte se colocan dos láminas de papel Whatman 3MM y sobre éstas se sitúa el gel. A continuación sobre el gel



se dispone, en el siguiente orden, el filtro de nylon, dos láminas de papel Whatman del tamaño del gel previamente humedecidas en agua destilada y SSC 2x, y papel de filtro del tamaño del gel formando una torre de unos 20 centímetros. Sobre este montaje, se coloca un peso de unos 500 g. La transferencia se deja entre 16-24 horas, manteniendo siempre la cubeta con la solución de SSC 20x.

3. Una vez que la transferencia ha finalizado, se marca la posición de los pocillos sobre el filtro y se fija el ADN al filtro de nylon mediante calentamiento del filtro a 80 °C durante 2 horas, o con luz ultravioleta en un transiluminador durante 10 minutos. De esta manera, el filtro puede ser utilizado inmediatamente o bien se guarda a 4°C.

---

➤ Solución desnaturalizante: NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M

➤ Solución neutralizante: NaCl 3 M; Tris-HCl 1 M, pH 7.5

➤ SSC 20x: NaCl 3M; citrato sódico 0.3 M, pH 7

---

#### 7.3.4. Pre-hibridación del ADN

El procedimiento empleado para llevar a cabo la pre- hibridación, hibridación y detección de las sondas fue el indicado en el kit *DIG Hig Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II* (Roche Diagnostics, mannheim), procediendo de la siguiente forma:

1. Se calienta un volumen apropiado de solución DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim) a la temperatura de hibridación de la sonda que se vaya a utilizar.
2. Se introduce el filtro en un canuto de hibridación y se equilibra en solución DIG Easy Hyb precalentada durante 30 minutos a la temperatura de hibridación.

### 7.3.5. Hibridación

1. La sonda marcada se hierve para su desnaturalización durante 5 minutos y rápidamente se pone en hielo durante unos minutos.
2. A continuación, se mezcla con un volumen apropiado de la solución Dig Easy Hyb precalentada (3.5 mL/100 cm<sup>2</sup>) y se mezcla sin llegar a formar burbujas.
3. Se elimina la solución Dig Easy Hyb en la que está en contacto con el filtro y se adiciona la solución de la sonda marcada desnaturalizada al canuto donde está el filtro. Se incuba a la temperatura de hibridación determinada por cada sonda en un horno de hibridación (Ecogen, Hybridization oven). Para la sonda ITS1-5.8S-ITS4 la temperatura que rindió buenos resultados fue de 65 °C, y para la sonda AI3 fue de 61 °C.
4. Tras la hibridación se recoge la sonda y se conserva a -20 °C

### 7.3.6. Lavados post-hibridación

1. En una cubeta, se lava el filtro dos veces con la Solución de lavado 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave.
2. A continuación, se lava dos veces con la Solución de lavado 0.5x durante 15 minutos a la temperatura de 65 °C y con agitación suave.

---

➤ Solución de lavado 2x: SSC 2x; SDS 0.1 %

➤ Solución de lavado 0.5x: SSC 0.5x; SDS 0.1 %

---

### 7.3.7. Detección

El método elegido para detectar la señal de los filtros fue la detección quimioluminiscente, en el que la señal lumínica se recoge en un film de rayos X tras un tiempo corto de exposición. El sustrato quimioluminiscente empleado fue el CSPD ready-to-use (Roche Diagnostics, Mannheim). Este sustrato es desfosforilado mediante la enzima *fosfatasa alcalina*, y como consecuencia se emite una radiación de 477 nm de longitud de onda, la cual se recoge en el film de rayos X en sólo 5- 30 minutos de exposición.

1. Tras los lavados de post-hibridación, el filtro se lava dos veces durante 5 minutos con el Tampón de lavado en agitación vigorosa.
2. Después, se incuba durante 30 minutos en la Solución bloqueante, en agitación.
3. A continuación se trata el filtro con la Solución del anticuerpo durante 30 minutos, en agitación.
4. Se lava dos veces durante 15 minutos con el Tampón de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo, en agitación vigorosa.
5. Se trata el filtro con la Solución de detección durante 2 minutos, en agitación.
6. A continuación, se coloca el filtro sobre una bolsita abierta y se añade 1 mL de la solución CSPD ready-to-use sobre la cara del filtro donde se encuentra la sonda unida. Se cierra la bolsita y se incuba el filtro durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Posteriormente, se elimina el exceso de la solución anterior y se sella la bolsita, la cual se incuba a 37 °C durante 10 minutos para potenciar la reacción de quimioluminiscencia.
8. Después se expone el filtro a un film de rayos X (Hiperfilm-MP, Amersham Biosciences. Reino Unido) entre 5 y 30 minutos y en oscuridad.

Todos éstos pasos se realizan a temperatura ambiente, procurando que en cada paso no se seque el filtro.

---

- Tampón de lavado: ácido maléico 0.1 M; NaCl 0.15 M, pH 7.5; Tween 20 0.3 % (v/v)
  - Tampón ácido maléico: ácido maléico 0.1 M; NaCl 0.15 M, ajustar a pH 7.5 con NaOH sólido.
  - Solución bloqueante: preparar una dilución 1/10 de la solución blocking (Roche Diagnostics, Mannheim) en Tampón ácido maléico.
  - Solución del anticuerpo: preparar una dilución 1/10.000 de anti-digoxigenin-AP (Roche Diagnostics, Mannheim) en la Solución bloqueante.
  - Solución de detección: Tris-HCl 0.1 M; NaCl 0.1M, pH 9.5
- 

### **7.3.8. Reutilización de los filtros**

Para poder utilizar los filtros en posteriores hibridaciones es necesario eliminar la unión de la sonda al filtro, para lo cual se siguen los siguientes pasos:

1. Se introduce el filtro en una cubeta y se lava dos veces con agua bidestilada estéril durante 15 minutos en agitación vigorosa.
2. A continuación, se lava dos veces con una solución de SSC 2x durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras estos lavados el filtro queda preparado para un nuevo experimento de hibridación.
3. Si se quiere conservar el filtro, éste se deja cubierto con el Tampón ácido maléico o en SSC 2x hasta su utilización.

## **8. Control microbiológico rápido de las cepas de levaduras en fermentaciones inoculadas**

Para llevar a cabo este tipo de estudio, se toman las muestras directamente del mosto fermentando, se centrifugan y del conjunto de células que forman el precipitado se extrae el ADN, que posteriormente se trata con una enzima de restricción determinada. Antes de aislar el ADN, las muestras deben ser tratadas para eliminar los restos de mosto ya que pueden interferir en el posterior tratamiento con las enzimas de restricción, inhibiendo la actividad de éstas.

### **8.1. Tratamiento de las muestras de mosto**

1. Se centrifugan 100 mL de la muestra de mosto en estudio en tubos de 25 mL (Eurotubo), para conseguir un tamaño de pellet suficiente, a 3800 rpm durante 5 minutos.
2. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado adicionando 20 mL de agua estéril, incubándose a 65 °C durante 10 minutos. Esta operación se realiza dos veces o más, hasta que el pellet quede limpio de los restos de mosto.

### **8.2. Extracción del ADN genómico en levaduras**

Se realizó utilizando el método descrito por Querol y colaboradores (1992b), aunque se introdujeron algunas modificaciones.

1. Una vez que se tiene el precipitado celular limpio, es decir libre de restos de medio de cultivo o de mosto, se resuspende en 1 mL de la Solución 1.
2. Se toma 1 mL y se transfiere a un tubo nuevo de 2 mL, adicionando los siguientes reactivos: 200 µL de Enzima Lítico (2 mg/mL) + 40 µL de Liticasa (1.5 mg/mL) + 2 esferas (¼'').

3. La mezcla se incuba en agitación vigorosa durante 1 hora a 37 °C.
4. Posteriormente se retiran las esferas y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos.
5. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 500 µL de la Solución 2.
6. Se adicionan 200 µL de una solución de SDS al 10%, se mezcla en el vórtex y se incuba a 65 °C durante 15 minutos (Termobloc, Grant).
7. A continuación se adicionan 200µL de Acetato potásico 5M dejándose en hielo durante 10 minutos.
8. Se centrifuga durante 15 minutos a 14000 rpm a 4 °C.
9. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL (700 µL aproximadamente) y se adicionan 700 µL de Isopropanol, se agita suavemente y se deja precipitar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Posteriormente, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desecha el sobrenadante y se adicionan 500 µL de Etanol al 70%. Se agita en el vortex.
11. A continuación se vuelve a centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se deja secar el ADN a temperatura ambiente o en una bomba de vacío.
12. Se resuspende el ADN en 50-100 µL de agua estéril. Se conserva a -20 °C si no va a ser utilizado inmediatamente.

---

➤ Solución 1: Sorbitol 0.9 M; EDTA 0.1 M

➤ Solución 2: Tris-HCl 50 mM; EDTA 20 mM

---

Para tratar el ADN genómico con enzimas de restricción se debe eliminar el ARN para lo cual se procede como se describe en la sección 7.2.1.1.

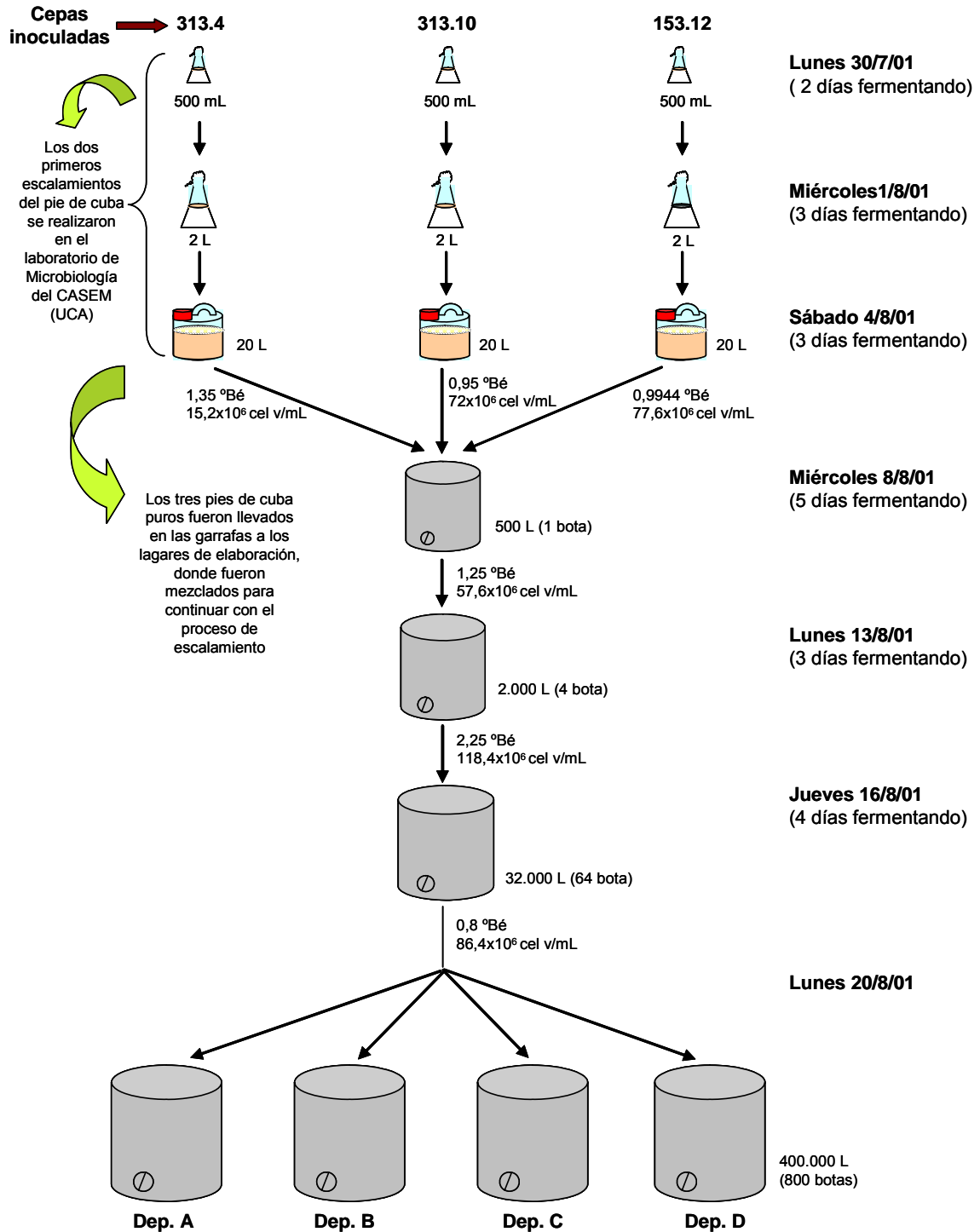
### **8.3. Tratamiento con enzimas de restricción**

Se llevó a cabo como se indica en la sección 7.2.2.

### **8.4. Visualización de los resultados**

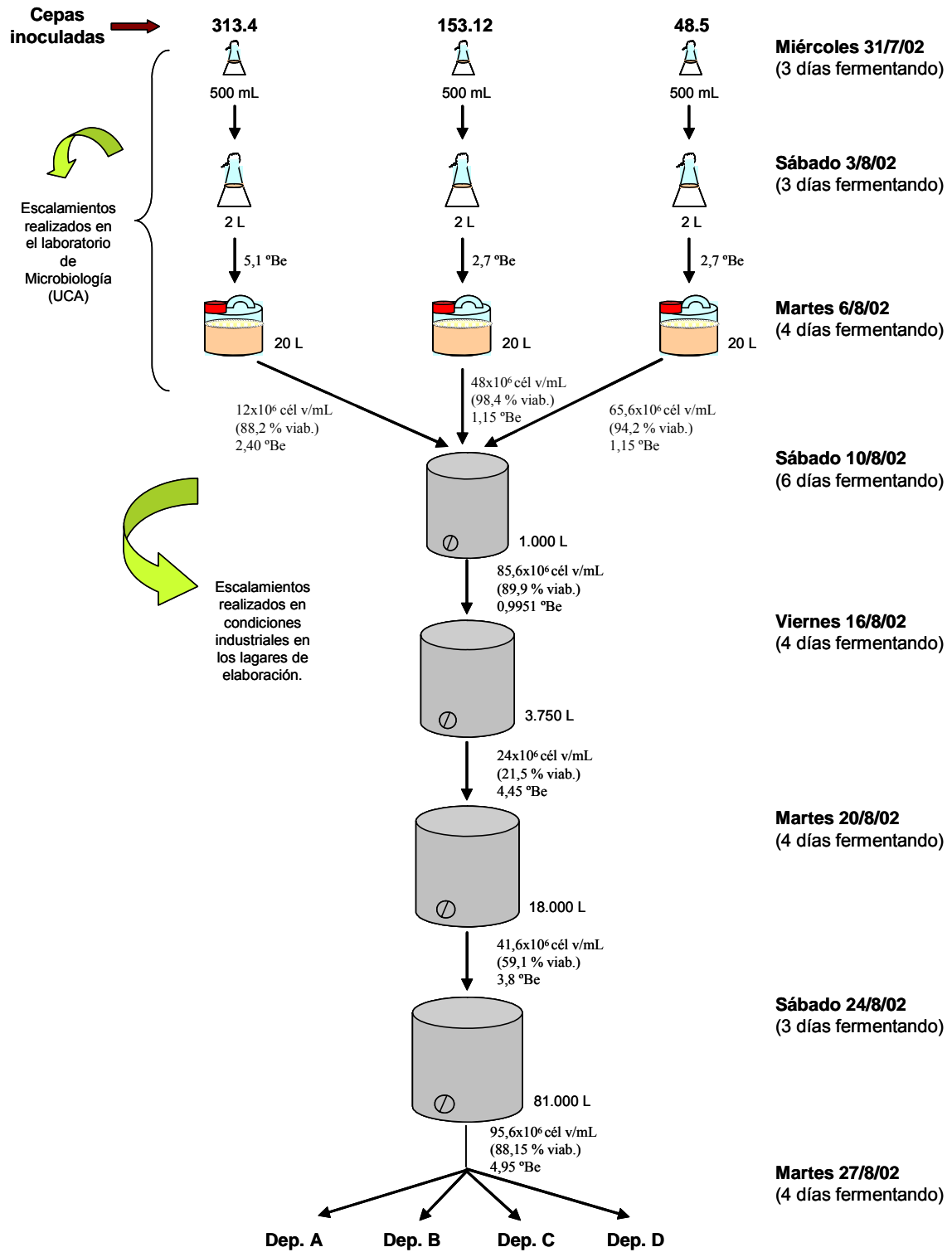
Se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa, cargando en cada pocillo los 20  $\mu\text{L}$  del ADN digerido más el tampón de carga, como se indica en la sección 7.2.3. El marcador de pesos moleculares que se utilizó fue  $\lambda$ -*Hind III*.

## 9. Esquemas de elaboración del Pie de Cuba en cada vendimia inoculada

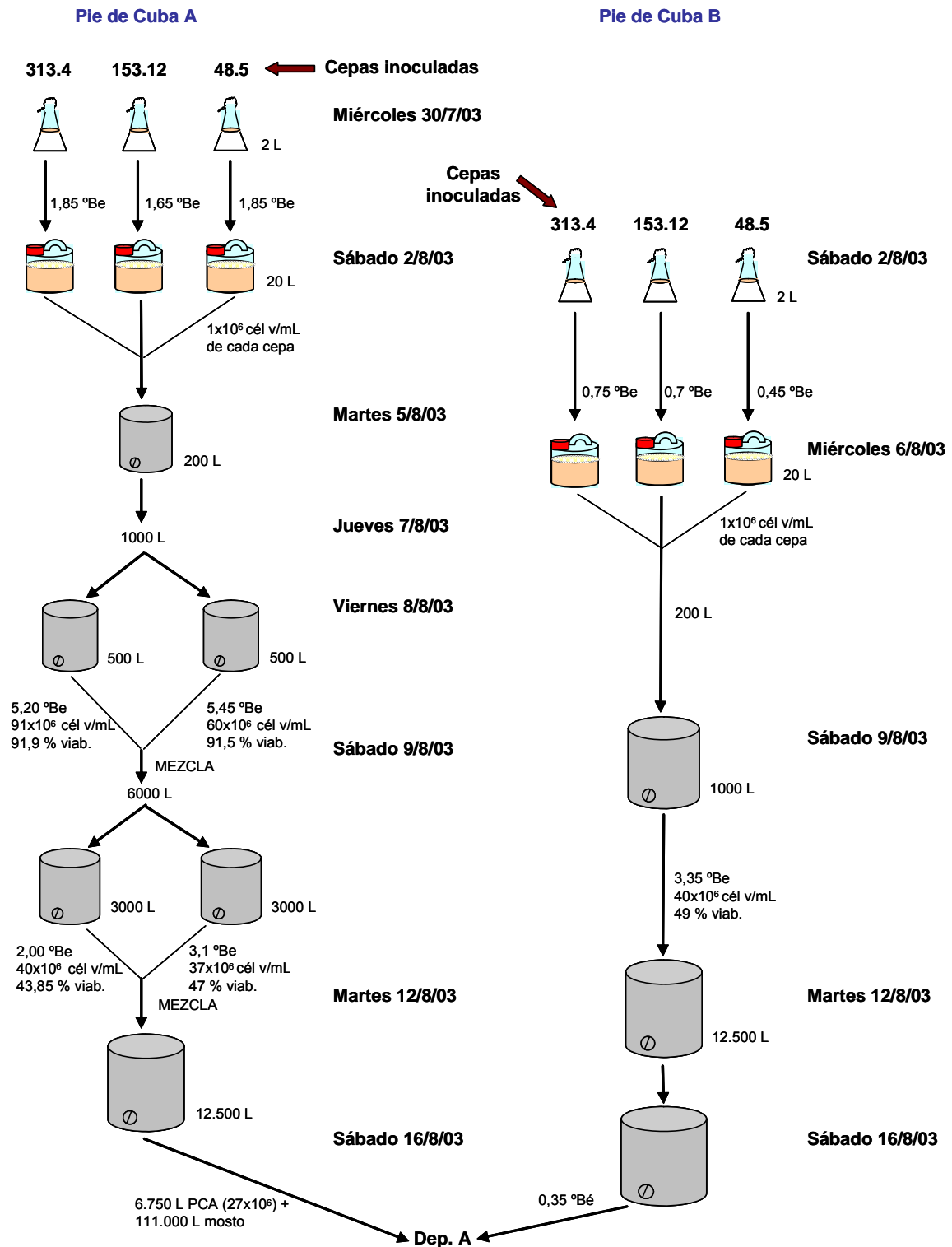


**Figura 15.** Esquema de elaboración del pie de cuba realizado en la vendimia 2001. Las fechas indican el día de la inoculación a un volumen mayor de mosto.

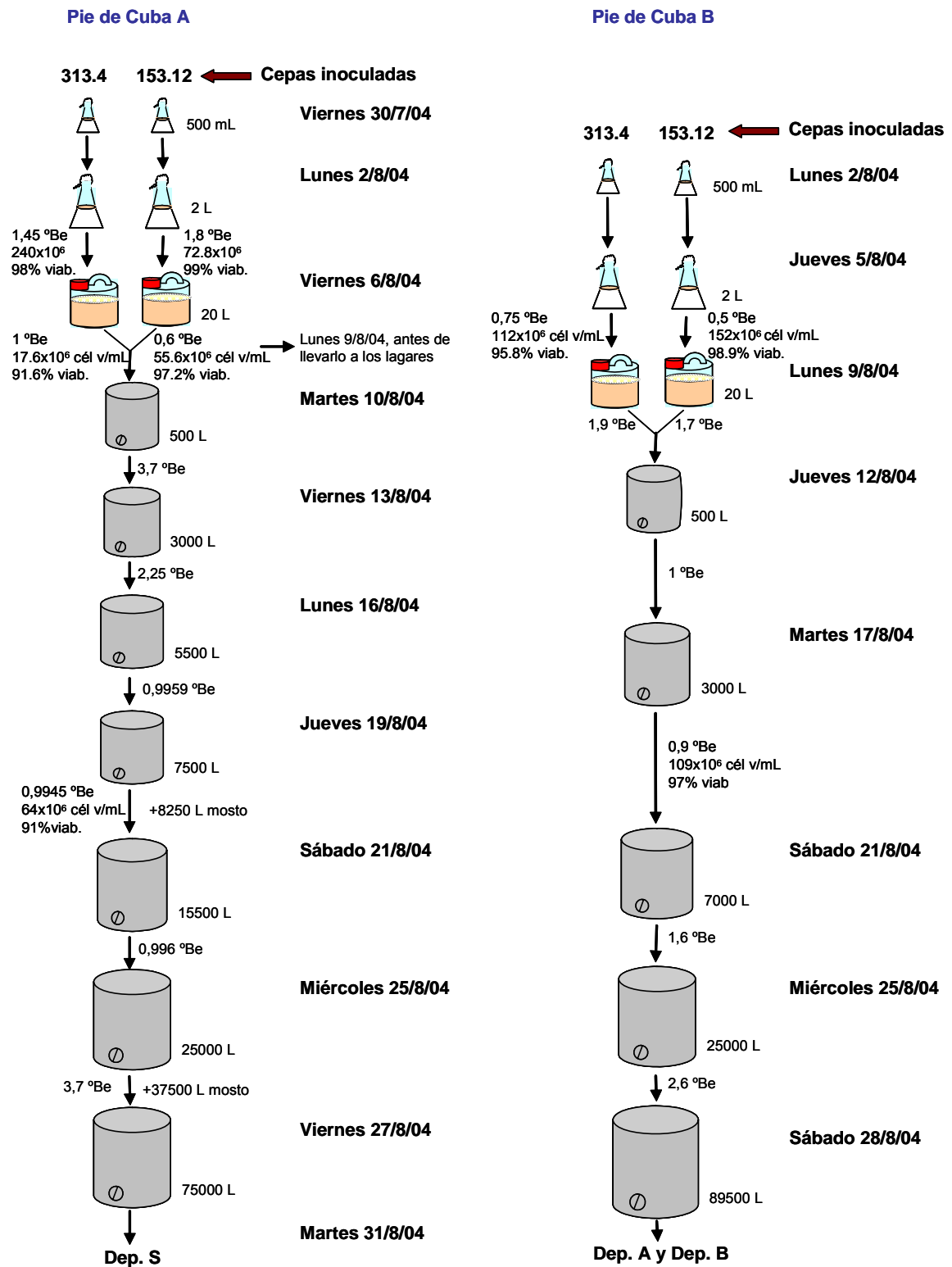




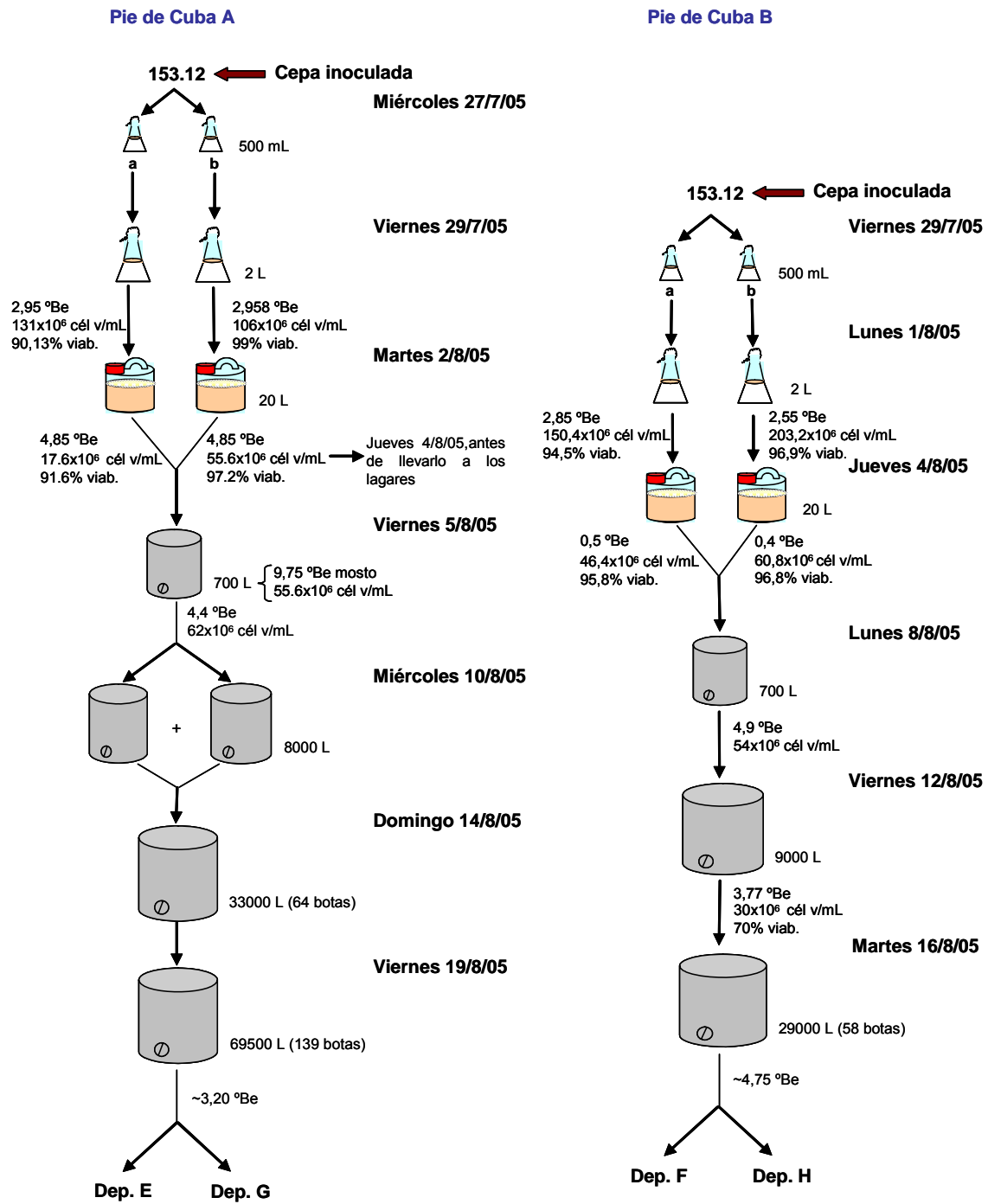
**Figura 16.** Esquema de elaboración del pie de cuba llevado a cabo en la vendimia 2002. Las fechas indican el día de la inoculación a un volumen mayor de mosto.



**Figura 17.** Esquema de elaboración del pie de cuba realizado en la vendimia 2003. Las fechas indican el día de la inoculación a un volumen mayor de mosto.



**Figura 18.** Esquema de elaboración del pie de cuba realizado en la vendimia 2004. Las fechas indican el día de la inoculación a un volumen mayor de mosto.



**Figura 19.** Esquema de elaboración del pie de cuba realizado en la vendimia 2005. Las fechas indican el día de la inoculación a un volumen mayor de mosto.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Esquema de selección de cepas de levaduras autóctonas. Estrategia seguida

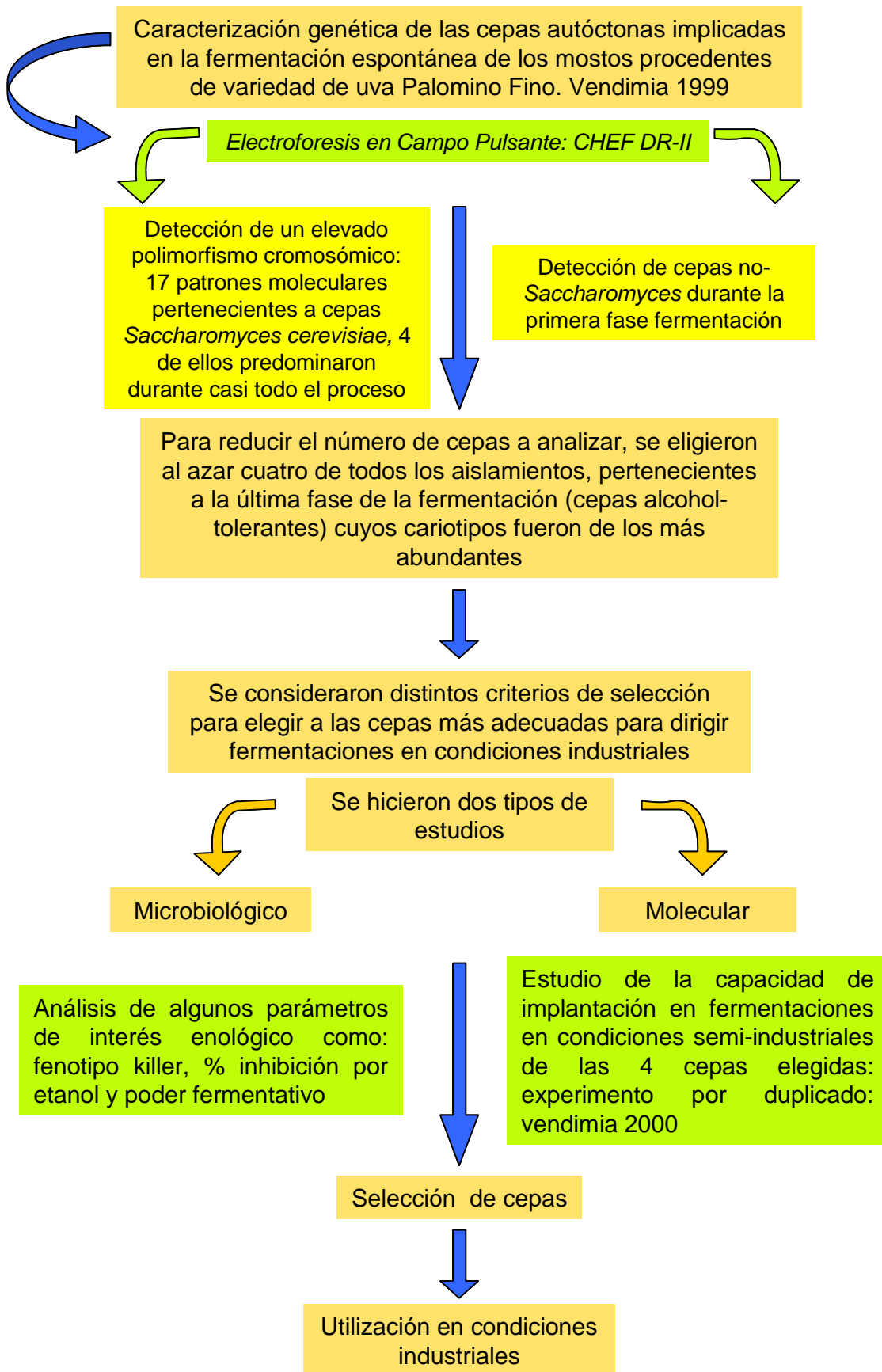
La caracterización de las cepas autóctonas implicadas en las fermentaciones espontáneas es muy importante porque ellas están dotadas de propiedades enológicas excepcionales y producen compuestos volátiles que contribuyen a las características sensoriales específicas de los vinos locales (Egli y col. 1998; Guerra y col. 1999; Martini, 2003). En este apartado de los resultados nuestro objetivo, por tanto, es conocer qué cepas están involucradas en la fermentación espontánea del vino blanco joven objeto de estudio y posteriormente, siguiendo el esquema de selección propuesto en la Figura 20, elegir aquéllas con mejores propiedades enológicas para poder utilizarlas como iniciadoras de las fermentaciones en condiciones industriales.

#### 1.1. Estudio de la diversidad genética de las cepas responsables de la fermentación espontánea de los mostos obtenidos en la vendimia 1999

Este primer estudio se realizó durante la vendimia de 1999. Las fermentaciones, llevadas a cabo en depósitos de 400.000 litros, se realizaron de manera espontánea, no habiéndose utilizado, ni en este año ni en los anteriores, levaduras secas activas (comerciales) para la elaboración del vino joven. El mosto utilizado procedió de la variedad de uva blanca *Palomino Fino*. El mosto yema recién prensado se corrigió para dejar el pH en torno a 3,3-3,4. Para iniciar el proceso durante el periodo de pre-vendimia se preparó un “pie de cuba”, es decir un determinado volumen de mosto que fermentó de manera espontánea y que cuando alcanzó un grado alcohólico alto sirvió como inóculo iniciador de las fermentaciones en los depósitos.

El proceso de fermentación en los depósitos no se llevó a cabo de forma continua desde el principio, sino que en determinados momentos se fueron realizando recargas de mosto fresco hasta completar el volumen final, 400.000 litros.



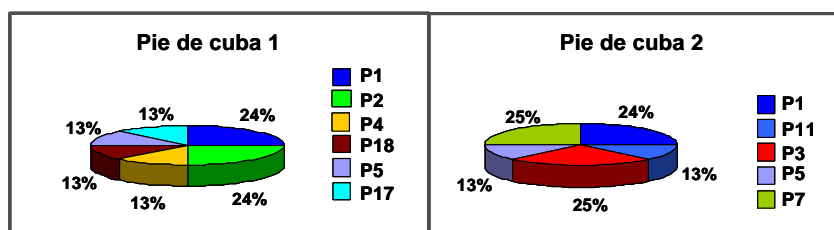


**Figura 20.** Esquema de selección seguido para la elección de cepas autóctonas.

Tanto del pie de cuba como de los fermentadores se tomaron muestras diariamente que fueron glicerizadas y conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, una vez finalizada la vendimia.

La caracterización genética, de las cepas involucradas en la fermentación del pie de cuba y de los depósitos de fermentación, se llevó a cabo mediante la obtención del cariotipo electroforético, para lo cual de las muestras elegidas para ser analizadas, señaladas en amarillo en la Tabla 1, se hicieron diluciones mediante el método de las “*diluciones sucesivas*”. Cada dilución fue sembrada en una placa de Petri de medio YPD incubándose a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3-4 días. Posteriormente de la placa más representativa, aquella que presentó entre 100-200 colonias aisladas se eligió un determinado número de aislamientos y cada uno fue tratado de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.1 de los materiales y métodos de la Tesis. Después, las muestras se sometieron a una *Electroforesis en Campo Pulsante* en un aparato CHEF DR-II (*Clamped Homogeneous Electric Fields with Dynamic Regulation*).

Del pie de cuba se analizaron dos muestras tomadas de diferentes volúmenes, siendo la segunda, Pie de cuba 2, la de mayor volumen. Tras el análisis de 8 aislamientos de cada muestra se obtuvieron los siguientes resultados:

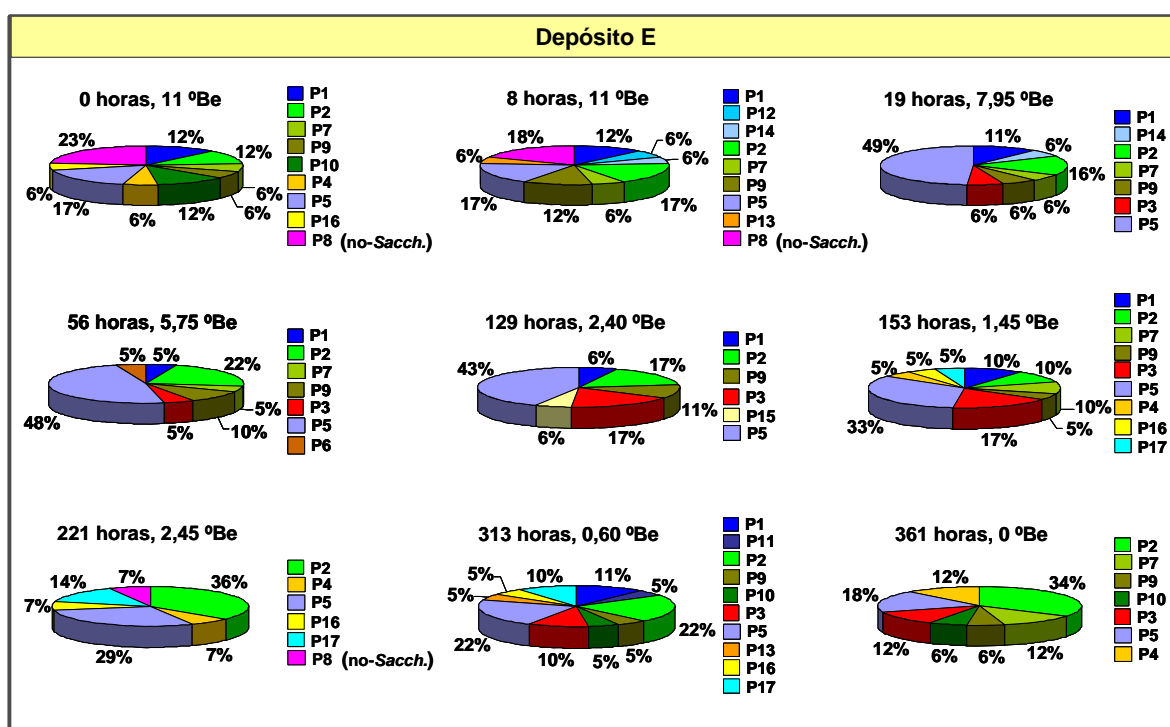


**Figura 21.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos en dos muestras tomadas del pie de cuba.

Aunque el número de cepas analizadas no es muy elevado, sí observamos que existe una cierta variabilidad genética entre las cepas, detectándose en el Pie de cuba 1 un total de 6 patrones cariotípicos distintos, mientras que en el Pie de cuba 2 que correspondió a un volumen mayor y a una fermentación más avanzada ( $5,6\text{ }^{\circ}\text{Be}$ ) la variabilidad disminuyó, existiendo un predominio de cepas con cariotipos P1, P11, P3, P5 y P7. El Pie de cuba 2 sirvió como inóculo para arrancar las fermentaciones

en los depósitos. En ninguna de las muestras analizadas del Pie de cuba se detectaron cepas no-*Saccharomyces*.

Para tener un mayor conocimiento de las cepas involucradas en una fermentación espontánea en condiciones industriales y qué ocurre a medida que avanza el proceso, es decir, si se da y cómo es la dinámica de las poblaciones de levaduras, se realizó una caracterización genética exhaustiva de uno de los depósitos de fermentación, depósito E (Figura 22), desde el inicio (0 horas) hasta la finalización de la fermentación (361 horas) cuando los azúcares se hubieron agotado. La caracterización de un total de 158 cepas mediante cariotipo electroforético proporcionó los resultados de la Figura 22.



**Figura 22.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos detectados durante la fermentación espontánea en el depósito E.

Se detectó un polimorfismo cromosómico muy elevado durante todo el proceso, encontrándose un total de 55 patrones cromosómicos distintos. Estos patrones se diferenciaron en el número, intensidad y movilidad electroforética de las bandas, confiriendo un polimorfismo del 35%. El elevado número de patrones y la similitud encontrada entre algunos de ellos permitió que se agruparan en 17 patrones

generales (desde P1 hasta P17) para facilitar el análisis de los resultados, lo que hizo reducir, por tanto, el polimorfismo a un 11%. De estos patrones, 16 pertenecieron a cepas del género *Saccharomyces* por presentar en su cariotipos las cuatro bandas o cromosomas entre 500 y 200 kb típicas de este género (Figura 25). El patrón P8 correspondió a cepas no-*Saccharomyces*, detectadas por no presentar en el cariotipo estas cuatro bandas típicas (De Jonge y col. 1986).

Los patrones cromosómicos se han representado con distintos colores, en el caso de la gama de colores verdes, éstos indican que se trata de cariotipos parecidos representándose en las gráficas de forma contigua, como por ejemplo fueron P2, P7, P9 y P10. Lo mismo ocurrió con los cariotipos P1 y P11. Las diferencias entre estos patrones se muestran en la Figura 25.

En el depósito analizado se observó al comienzo de la fermentación un predominio de cepas no-*Saccharomyces*, teniendo un 23% y un 18% a las 0 y 8 horas respectivamente. También se observó que hubo cepas cuyos patrones fueron característicos de cada fase de la fermentación, por ejemplo los patrones, P8, P12 y P14 solamente se encontraron en la primera fase (0-19 horas); los patrones P6 y P16 aparecieron únicamente en la segunda fase (56-153 horas aproximadamente) y el patrón P11 sólo se detectó en la tercera fase (221-361 horas).

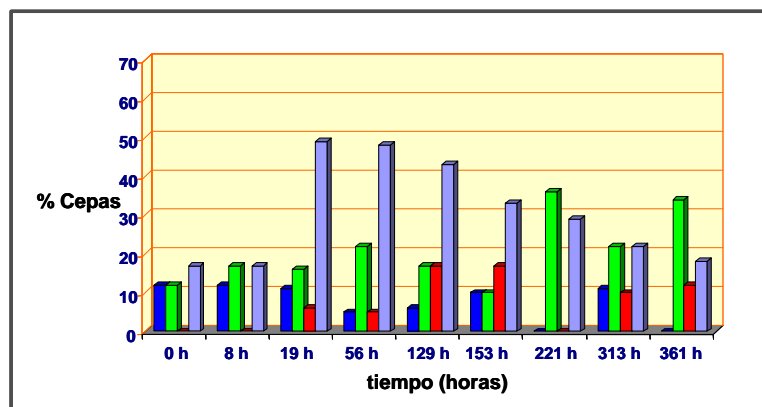
Se ha observado que al menos cuatro cepas fueron predominantes durante toda la fermentación, las de cariotipo P1, P2, P3 y P5. Acompañando a éstas existió una amplia diversidad de cepas minoritarias, con cariotipos P7, P9, P10, P4, P16, P13 y P17, que fueron sustituyéndose unas por otras a medida que fue avanzando la fermentación y cuyas proporciones fueron también variando.

El hecho de observar cepas características de una determinada fase de la fermentación y de la variación en la proporción del resto de cepas fue indicativo de la sucesión de poblaciones de levaduras que se produjo a lo largo de la fermentación. Y es que la composición química del mosto va variando durante la fermentación, de manera que aumenta el grado alcohólico, se agotan los nutrientes, disminuye el oxígeno disuelto etc., induciendo que en cada momento del proceso aparezcan las poblaciones de cepas de levaduras mejor adaptadas a dichas condiciones.

En lo referente a las cepas predominantes en el depósito E, cuyas proporciones también variaron durante todo el proceso, se podría decir que fueron las principales responsables de la fermentación.

En cuanto a las recargas de mosto fresco, la adición de éste a un volumen de mosto fermentado aunque supone un aporte de nutrientes para las levaduras que están fermentando, también implica un aporte de levaduras silvestres, bien de nuevas especies, o bien de las cepas ya existentes. En el depósito E una de las recargas se realizó después de las 153 horas de fermentación (Tabla 1) aumentando el °Be en una unidad, de hecho en la muestra siguiente que se analiza se detectan, aunque en pequeña proporción (7%), cepas no- *Saccharomyces* que vuelven a ser desplazadas por las cepas *Saccharomyces* predominantes y además también se ven influenciadas por el grado alcohólico, que va aumentando. Esta recarga no sabemos si afectó en gran medida a la población de levaduras existente en ese momento, ya que al tratarse de una fermentación espontánea a medida que ésta avanza también van cambiando las poblaciones de levaduras.

En la Figura 23 se muestra cómo fueron variando las cepas predominantes a lo largo de la fermentación.



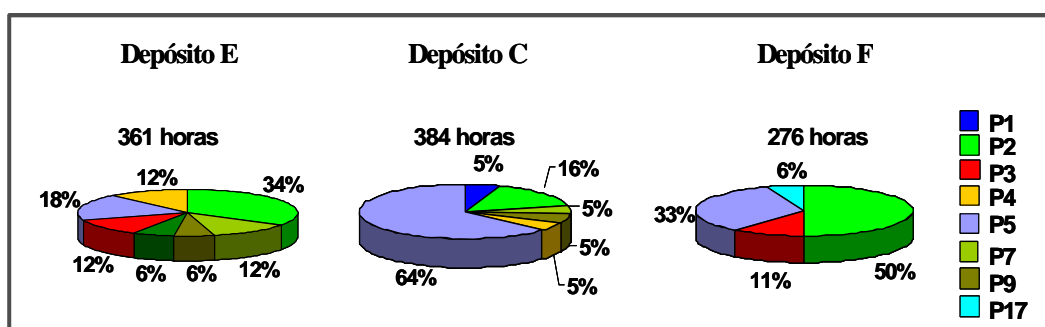
**Figura 23.** Variación del porcentaje de las cepas predominantes con patrones P1 (azul), P2 (verde), P3 (rojo) y P5 (morado) desde las 0 hasta las 313 horas de la fermentación.

Se observa que, las cepas con patrón P5 estuvieron presentes durante toda la fermentación, predominando sobre todo en la segunda fase (56-153 horas) con un 50% aproximadamente. Al patrón P3 pertenecieron cepas que no se detectaron en las

primeras horas, sino que empezaron a aparecer a las 19 horas, manteniéndose en un porcentaje del 10% al final del proceso. Las cepas con patrón P1, tuvieron un porcentaje de aparición algo bajo, del 10%, no siendo detectadas a ni a las 221 ni 361 horas de la fermentación, lo cual puede ser indicativo de que se trate de cepas que no toleren demasiado bien las altas concentraciones de alcohol alcanzadas en esta fase. En cuanto a las cepas con patrón P2, se puede afirmar que alcanzaron su mayor porcentaje en la última fase de la fermentación con un 45%.

Se puede decir, por lo tanto, que las cepas con patrón P5 y P2 fueron las que controlaron, en parte, la fermentación del depósito E, sobre todo al final, y al encontrarse en mayor proporción pudieran ser las más adaptadas a las condiciones finales de la fermentación.

Además, se analizaron dos muestras más, de los depósitos (Tabla 1) C y F, pertenecientes a la última fase de la fermentación para comparar las poblaciones de levaduras de éstas con las del depósito E. Mediante cariotipo electroforético se caracterizaron, por tanto, 37 cepas más.

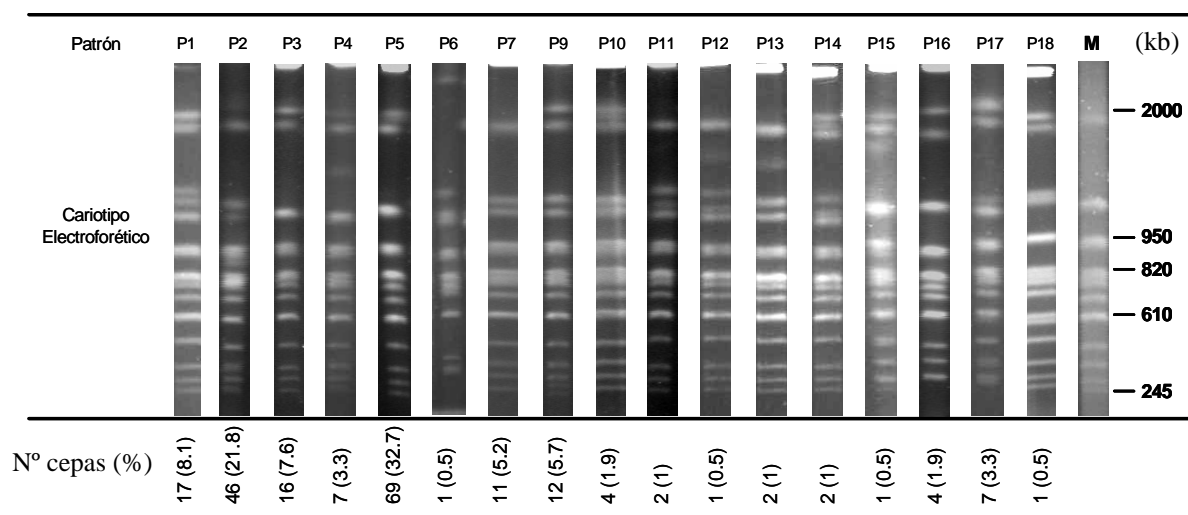


**Figura 24.** Porcentaje de las distintas cepas presentes tras la finalización de las fermentaciones en tres depósitos, E (ya estudiado), C y F.

En los depósitos C y F, se comprobó que también predominaron al final de la fermentación cepas con patrones P2 y P5 aunque en proporciones distintas en cada caso, y fueron también detectadas en el depósito E. Las cepas con patrón P1 sólo se detectaron en el depósito C en un 5%; y las de P3 se detectaron en el F en una proporción similar a como se encontraron en el depósito E. No se detectaron cepas

con nuevos cariotipos a los ya caracterizados en el depósito E. Además las cepas que fueron minoritarias en el depósito E, lo siguieron siendo en los depósitos C y F.

En la Figura 25 se han representado los 18 patrones moleculares generales detectados en todas las muestras que se analizaron en la vendimia 1999 de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, tanto en las dos muestras del pie de cuba (Figura 21), como en el depósito E (Figura 22), y en las muestras de los depósitos C y F (Figura 24). Se puede observar que los distintos cariotipos difieren en el número, tamaño e intensidad de las bandas, y en general presentan entre 13-16 bandas distintas. Dentro de un mismo cariotipo existen unas bandas más intensas que otras, pudiéndose tratar en esos casos de cromosomas homólogos del mismo tamaño (Yamamoto y col. 1991).



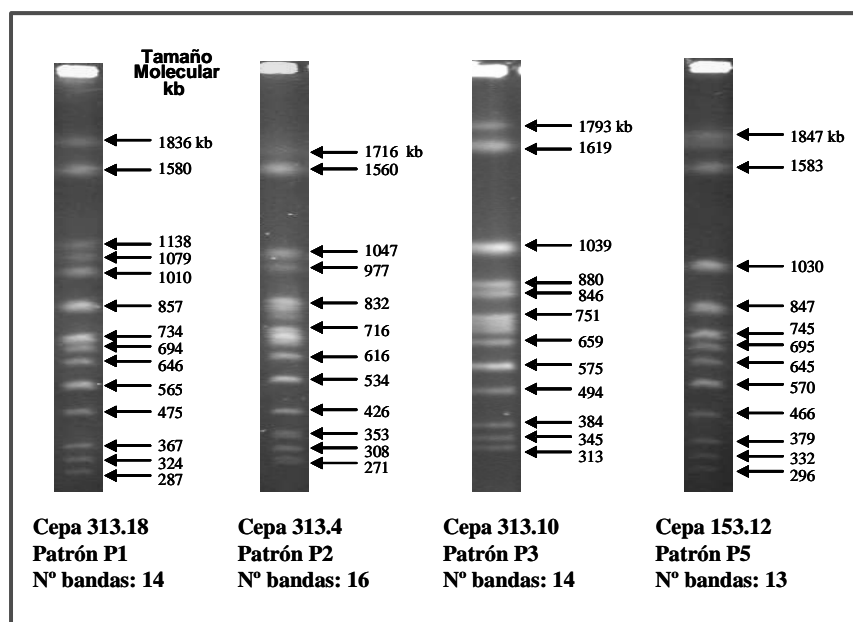
**Figura 25.** Cariotipo electroforético de las cepas detectadas en las fermentaciones de la vendimia 1999. Se ha indicado el número de cepas con cada cariotipo y el porcentaje de aparición de éstas teniendo en cuenta el total de cepas analizadas (211), incluyendo a las cepas no-*Saccharomyces* implicadas en la fermentación en el caso del depósito E, aunque no se muestran sus cariotipos. M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

## 1.2. Pre- selección de las cepas de levaduras

Cuando se lleva a cabo una fermentación industrial inoculada con cepas comerciales, normalmente se utilizan una o dos cepas para que el vino tenga unas determinadas características aromáticas propias de las cepas utilizadas.

Siguiendo el esquema de selección de la Figura 20, nuestro propósito ha sido también elegir un número reducido de cepas de entre todos los aislamientos realizados, y seleccionar aquéllas con mejores propiedades de interés enológico.

Por eso y para reducir el número de cepas a analizar, se eligieron al azar cuatro cepas pertenecientes a la última fase de fermentación, es decir alcohol-tolerantes, de entre aquéllas que mostraron los cariotipos más representativos durante todo el proceso en el depósito E (Figura 22) que fueron 313.18, 313.4, 313.10 y 153.12 con cariotipos P1, P2, P3 y P5 respectivamente (Figura 26).



**Figura 26.** Tamaños moleculares de los cariotipos de las cepas pre-seleccionadas. Se calcularon a partir del marcador molecular de Promega y mediante el programa informático *Molecular Analyst* (Bio-Rad).

### 1.3. Criterios de selección

De las cuatro cepas elegidas no sólo interesa que pertenezcan a un patrón molecular que sea el mayoritario en una fermentación espontánea, sino que también hay que considerar y analizar otras propiedades de interés enológico. Por tanto se consideraron distintos criterios de selección para elegir a las cepas más adecuadas



para dirigir fermentaciones en condiciones industriales, y se llevaron a cabo dos tipos de estudios, uno de carácter molecular y otro de tipo microbiológico.

### 1.3.1. Análisis microbiológicos

El análisis microbiológico, se realizó para seleccionar las cepas con mejores propiedades de interés enológico como poder fermentativo, inhibición por etanol y factor “killer”.

#### 1.3.1.1. Poder fermentativo. Tasa de consumo de azúcares

Para medir el poder fermentativo se prepararon cuatro matraces con 100 mL de mosto natural estéril (126 °C, 20 min), se inocularon cada uno con el mismo número de células ( $1 \times 10^6$  células/mL) de las cepas elegidas y se hicieron medidas de los azúcares reductores desde el comienzo hasta el final de la fermentación, utilizando el método oficial de la OIV.

El contenido de azúcar inicial en el mosto estéril fue de 198 g/L, y el contenido de azúcar en los cuatro matraces al finalizar la fermentación fue de 5,04 g/L (313.18), 3,84 g/L (313.4), 10,18 g/L (313.10) y 8,97 g/L (153.12). Haciendo la diferencia entre la cantidad de azúcar inicial en el mosto estéril y estos valores, se obtuvo la cantidad de azúcar que llegó a fermentar cada cepa, es decir, el poder fermentativo.

- $313.18 = 192,96$  g/L
- $313.4 = 194,6$  g/L
- $313.10 = 187,82$  g/L
- $153.12 = 189,03$  g/L

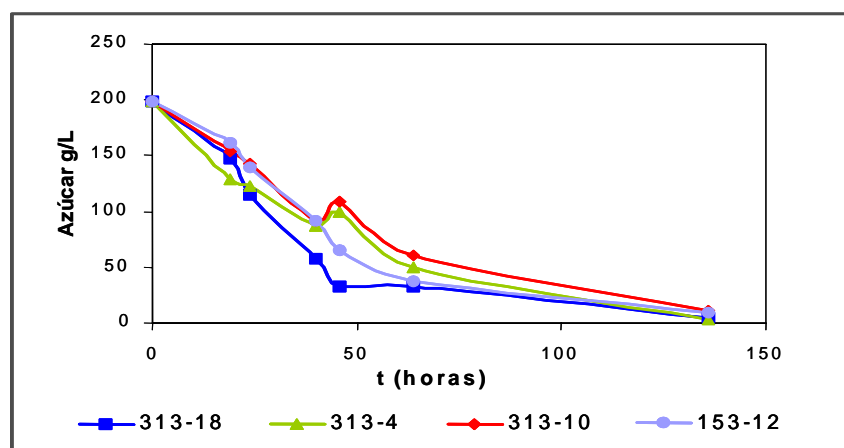
En general el poder fermentativo de las cuatro cepas fue elevado y similar aunque podríamos agruparlas en cepas de muy alto poder fermentativo como la 313.4; de bajo poder fermentativo, como 313.10 que deja más del doble de azúcares sin fermentar al finalizar la fermentación con respecto a la cepa de alto poder fermentativo; y cepas de poder fermentativo medio como 313.18 y 153.12.

Tiempo (horas)	313.18	313.4	313.10	153.12
0	198	198	198	198
19	147	129,3	154,3	162,2
24	114,6	122	142,1	139,6
40	57,6	87,3	92,15	92,15
46	32,3	99,4	109,1	65,3
64	32,3	50,4	60	37,1
136	5,04	3,84	10,18	8,97

**Tabla 20.** Medidas de los azúcares reductores, en g/L, a lo largo de la fermentación de 100 mL de mosto para cada cepa. Los datos sombreados se utilizaron para calcular la tasa de consumo de azúcares.

La cepa 313.4, que tuvo un poder fermentativo alto, dejó sólo 3,84 g/L de azúcares sin metabolizar en el medio consiguiendo alcanzar mayores grados alcohólicos, siendo estas propiedades deseadas desde el punto de vista enológico. Sin embargo el hecho de que consuman los azúcares más lentamente puede dar lugar a fermentaciones largas (Figura 27), que no interesan desde el punto de vista industrial.

La evolución de la fermentación, midiendo azúcares reductores frente al tiempo para cada cepa se muestra en la siguiente gráfica:



**Figura 27.** Evolución de la fermentación de cada cepa, representada por los azúcares reductores del mosto en función del tiempo.

En cuanto a la tasa de consumo de azúcares, ésta nos dio una aproximación de la velocidad de fermentación de cada cepa. Se calculó a partir de los datos de azúcares reductores (datos sombreados en la Tabla 20) y el tiempo transcurrido,

mediante ajuste lineal, de manera que la pendiente de la recta nos dio la tasa de consumo.

Los valores de las tasas de consumo expresadas en (g/L)/horas fueron los siguientes:

- 313.18 = 4,06
- 313.4 = 1,78
- 313.10 = 2,12
- 153.12 = 3,43

Las cepas con mayores tasas de consumo fueron 313.18 y 153.12, mientras que las que más lentamente fueron consumiendo los azúcares fueron 313.4 y 313.10. Según estos resultados se podría decir que la cepa 313.18 sería una buena candidata para ser seleccionada, no sucediendo lo mismo con la 313.10 que además es la que deja más azúcares en el medio sin consumir. La cepa 313.4 fue la que presentó la tasa mas baja, es decir, que fue consumiendo los azúcares lentamente, aunque fue la que dejó menos azúcares en el medio sin consumir, por tanto podría dar lugar a procesos más largos, aunque sí con mayores grados alcohólicos.

### 1.3.1.2. Inhibición por etanol

Para determinar el porcentaje de inhibición por etanol, de cada cepa se prepararon tres matraces con medio YPD líquido con distintas concentraciones de etanol, 0%, 5% y 10%, hasta un volumen total de 100 mL. Los tres se inocularon con el mismo número de células ( $2 \times 10^6$  cél/mL) haciéndose un recuento de las mismas cada dos horas en una cámara *Neubauer*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21.

Cepas	Medio				
	YPD	5 % EtOH		10 % EtOH	
	Tasa	Tasa	% i	Tasa	% i
313.18	0,63	0,45	27,77	0,047	92,46
313.4	0,54	0,33	37,86	0,043	91,94
313.10	0,58	0,35	39,37	0,1	82,92
153.12	0,59	0,43	28,23	0,06	89,8

**Tabla 21.** Porcentajes de inhibición por etanol y tasas de crecimiento

La tasa de crecimiento,  $\mu$ , se calculó a partir de la fórmula  $\ln N = \ln N_0 + \mu t$ ; y el porcentaje de inhibición se calculó a partir de la tasa de crecimiento para cada concentración de etanol mediante la expresión:

$$\% i (\text{EtOH}) = \left( 1 - \frac{\mu (\text{YPD} (\text{EtOH}))}{\mu (\text{YPD})} \right)$$

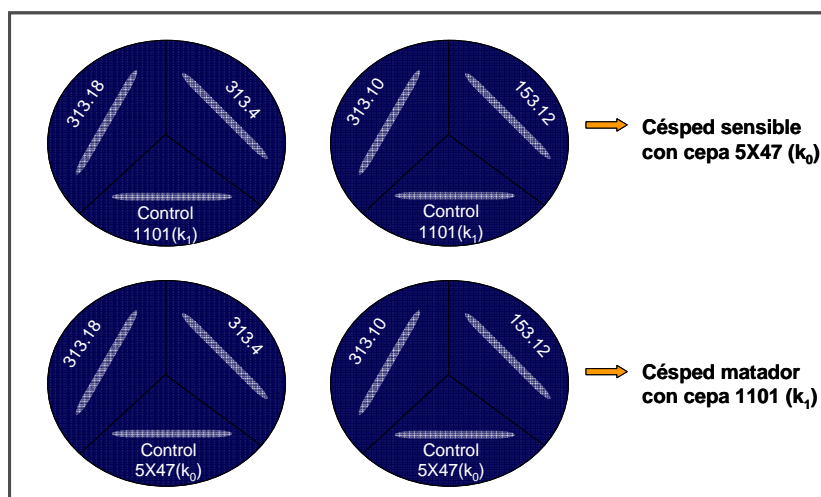
Las cuatro cepas mostraron valores de inhibición muy similares cuando el YPD se suplementó con un 5% de etanol, igual que para el caso del 10%. Ninguna de las cepas llegó a una inhibición del 100%, lo cual es lógico porque se aislaron de la última fase de la fermentación y son, por lo tanto, cepas con carácter alcohol-tolerante.

### 1.3.1.3. Factor killer

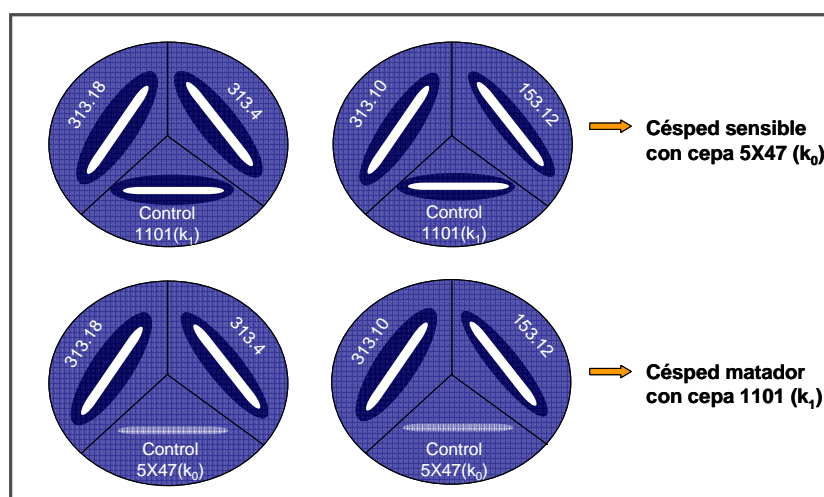
Para analizar si las cuatro cepas elegidas, 313.18, 313.4, 313.10 y 153.12, eran productoras de la toxina killer se prepararon 2 placas de Petri de medio MBM para cada cepa pre-seleccionada; en una placa se sembró a modo de césped una cepa sensible, 5X47 ( $k_0$ ) no productora de la toxina; y en otra placa se extendió un césped de una cepa matadora, 1101 productora de la toxina  $k_1$ . Estas fueron previamente crecidas en medio líquido YPD durante 48 horas antes de ser sembradas.

Como se muestra en la Figura 28 las cepas pre-seleccionadas se sembraron a modo de estría sobre los céspedes, una vez que estuvieron secos, utilizándose además las cepas de la colección como controles.

A los 3-4 días, tras la incubación de las placas a 23 °C, los resultados fueron los mostrados en la Figura 29. Las cuatro cepas fueron productoras de algún tipo de toxina killer. En teoría, cuando se hacen los experimentos en el laboratorio, cuando una cepa produce la toxina se forma un halo de inhibición sobre el césped de la levadura sensible a la toxina, y crece en el césped de la cepa matadora sin producir halo. En nuestro estudio, además de observarse halo de inhibición en el césped sensible (cepa 5X47), también se observó sobre el césped matador (cepa 1101), lo cual nos sugirió que las cuatro cepas elegidas fueron productoras del tipo de toxina  $K_2$  o  $K_{28}$ , matando a la cepa productora de la toxina  $K_1$ .



**Figura 28.** Representación de la siembra en estrías de las cepas pre-seleccionadas sobre los distintos céspedes de las cepas sensible y matadora. El medio utilizado para el experimento fue MBM.



**Figura 29.** Representación de los resultados tras incubar las placas a 28 °C durante 3-4 días. En la parte inferior de la figura se observa que la cepa control sensible 5X47 no llegó a crecer sobre el césped de la cepa matadora.

Además, el máximo de actividad de las toxinas  $K_2$  y  $K_{28}$  está en un rango de pH entre 2.8 a 3.8 dentro del cual se encuentra el pH del mosto (Marquina y col. 2002). No es de extrañar que las cuatro cepas autóctonas sean matadoras ya que se ha descrito que las levaduras vínicas silvestres con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo (Coratza y col. 1992; Frazier & Dubourdieu 1992; Shimizu 1993; Vagnoli y col. 1993; Versavaud y col. 1995; Da Silva 1996; Izgü y col. 1997; Regodón y col. 1997; Lopes y col. 2005).

La presencia de estas levaduras puede llegar a ser un problema muy importante en las fermentaciones que son inoculadas con cepas de levaduras *S. cerevisiae* que sean sensibles ya que pueden ser suprimidas por las silvestres killer (Heard & Fleet 1987; Van Vuuren & Jacobs 1992), provocando paradas fermentativas o una disminución en la calidad del vino obtenido (Medina y col. 1997).

Por tanto, el hecho de que las cuatro cepas de nuestro estudio tengan fenotipo killer las hace idóneas para su selección y utilización como cultivos iniciadores de fermentaciones industriales y que sean ellas las que dirijan las fermentaciones.

### **1.3.2. Análisis molecular**

Este análisis se realizó para comprobar, mediante cariotipo electroforético, la capacidad de implantación entre las cuatro cepas pre-seleccionadas en condiciones semi-industriales. El estudio se hizo por duplicado, aunque con 8 días de diferencia, de manera que se prepararon dos depósitos cada uno con 100.000 litros de mosto para ser fermentados por las 4 cepas. Estas fermentaciones se realizaron durante la vendimia del año 2000 y se denominaron, Experimento 1 y Experimento 2.

Para llevar a cabo este tipo de estudio los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

(i) Teniendo en cuenta la magnitud del volumen final a fermentar y que las levaduras se encontraban creciendo en placas de medio YPD, se tuvo que hacer, con cada una de las cepas por separado, un pie de cuba con varios escalamientos que tuvo dos fases de realización, una primera en el laboratorio y otra segunda en la bodega.

(ii) Toma de muestras diaria durante las fermentaciones de los dos experimentos, que se recoge en las Tablas 3 y 4 del apartado de materiales y métodos, y conservación de las muestras para el posterior procesamiento, una vez finalizada la vendimia.

(iii) Control microbiológico mediante el cariotipo electroforético de los aislamientos realizados de las muestras elegidas (se muestran en amarillo en las Tablas 3 y 4) para comprobar la capacidad de implantación de cada cepa.

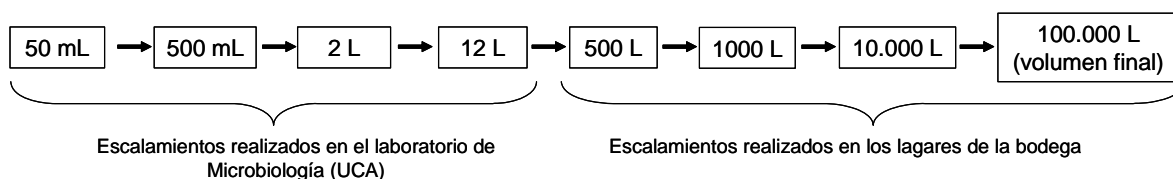
### 1.3.2.1. Elaboración del pie de cuba. Escalamientos

En la fase de laboratorio en la elaboración del pie de cuba cada una de las cepas se inocularon (313.18, 313.4, 313.10 y 153.12) en 50 mL de mosto natural esterilizado en autoclave (126 °C, 26 minutos); a continuación, cuando este volumen hubo fermentado, se adicionó a un volumen mayor de 1500 mL también de mosto esterilizado en las mismas condiciones que el anterior para tener un volumen total de 2 litros. Cuando el mosto de cada fermentación pura alcanzó, aproximadamente, un °Be de 2-1, se adicionó a un volumen mayor de mosto, 10-18 litros, descongelado y con el pH corregido a 3,4, hasta completar los 12- 20 litros.

En la segunda fase, los pies de cuba de cada cepa fueron llevados a los lagares de elaboración de la bodega donde se mezclaron y se adicionaron a volúmenes mayores para seguir con los escalamientos hasta llegar al volumen final de 100.000 litros. La operación de elaboración del pie de cuba se hizo para cada uno de los dos experimentos de fermentación, no siendo igual en cada caso ya que, además de realizarse con 8 días de diferencia, los escalamientos en bodega tuvieron algunas variaciones (Figuras 30 y 31). El mosto utilizado también procedió de la variedad de uva *Palomino Fino*.

### Experimento 1

En la elaboración del pie de cuba se realizaron los siguientes escalamientos:

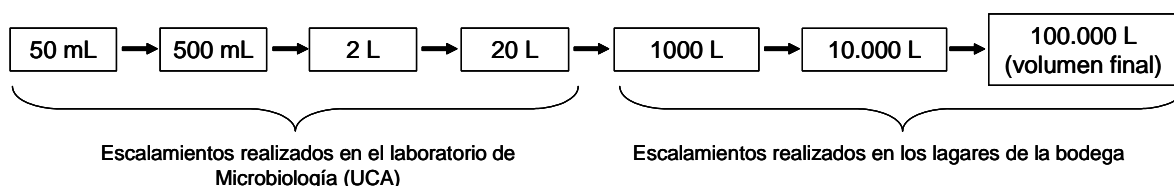


**Figura 30.** Representación esquemática de los escalamientos realizados en las dos fases de la elaboración del pie de cuba en el caso del Experimento 1.

En este experimento los dos litros de pie de cuba de cada cepa se adicionaron a 10 litros de mosto descongelado no estéril. Posteriormente, en la bodega, se mezclaron para tener un total de 48 litros de pie de cuba que se adicionaron a 500 litros de mosto centrifugado y corregido para continuar así con los escalamientos hasta llegar a un volumen final de 100.000 litros como se muestra en la Figura 30. Se procuró que el inóculo fuese en cada paso el 10-12% del volumen total a fermentar para asegurar la propagación de las levaduras en el mosto fresco (no estéril).

### Experimento 2

En este caso, en cuanto a la elaboración del pie de cuba, hubo algunas diferencias con respecto al Exp. 1, la operación fue más corta, es decir, que se hicieron menos escalamientos que en el Exp.1. En la fase realizada en el laboratorio, se llegaron a fermentar hasta 20 litros de mosto para cada cepa; y por último, en los lagares de elaboración, aunque también se mezclaron los pies de cuba de 20 litros, el siguiente escalamiento se hizo a 1000 litros de mosto (Figura 31). Igual que en Exp. 1, se procuró que el inóculo fuese en cada paso el 10-12% del volumen total a inocular para asegurar la propagación de las levaduras en el mosto fresco.



**Figura 31.** Representación esquemática de los escalamientos realizados para las dos fases de la elaboración del pie de cuba en el caso del Experimento 2.

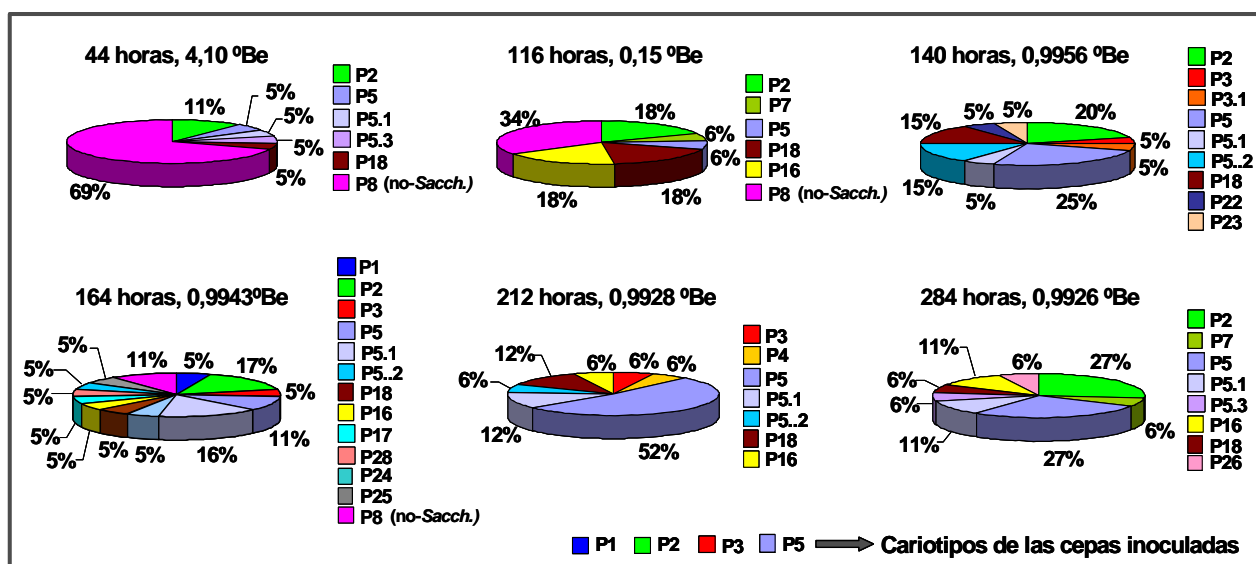
#### 1.3.2.2. Control microbiológico mediante la obtención del cariotipo electroforético

### Experimento 1

Se analizaron muestras tomadas a las 44 horas, 116, 140, 164, 212 y 284 horas de la fermentación, una vez que el depósito estuvo lleno con los 100.000 litros de mosto, no realizándose recargas de mosto fresco tras llegar a este volumen. De



cada muestra se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD, se incubaron a 28 °C durante 3-4 días, y de las más representativas se eligieron al azar 20 colonias totalmente aisladas. Mediante cariotipo electroforético se analizaron un total de 110 aislamientos (entre 19-17 cepas/muestra) obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 32.

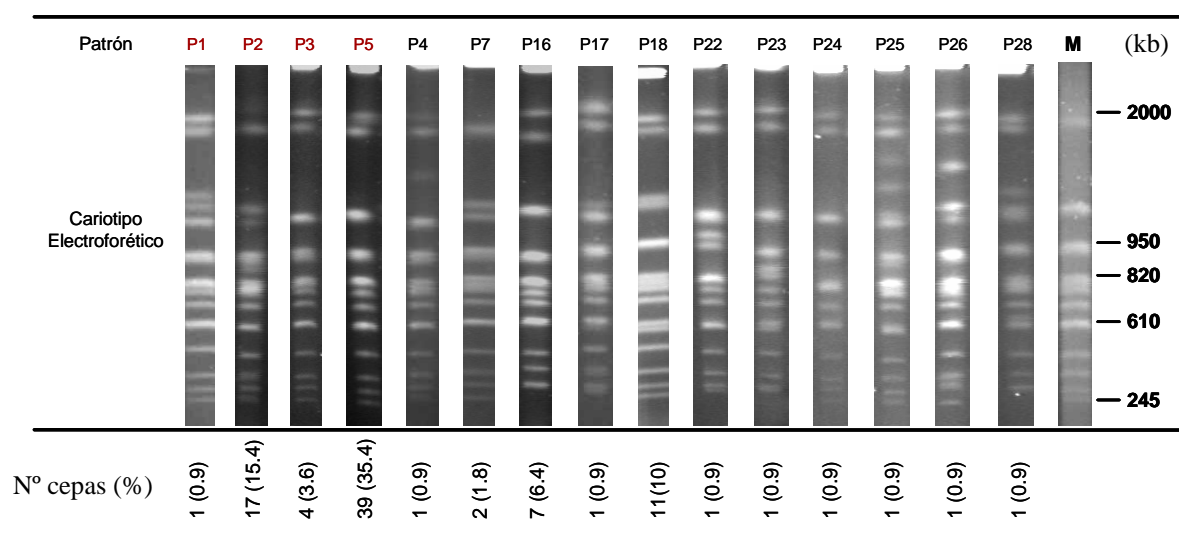


**Figura 32.** Resultados de la caracterización molecular del Experimento 1. Se representa el porcentaje de las cepas con distintos patrones cariotípicos durante seis momentos distintos de la fermentación de 100.000 litros de mosto.

El análisis reveló un acusado polimorfismo durante toda la fermentación, aún habiendo sido inoculada, identificándose un total de 59 patrones cromosómicos distintos, que se diferenciaron en el número, movilidad electroforética e intensidad de las bandas, confirmando un polimorfismo del 54%. Debido a que el número de patrones fue elevado y a que existían similitudes entre algunos de ellos, éstos se agruparon, igual que se hiciera en la vendimia 1999, en 16 patrones generares, 15 correspondieron a cepas *S. cerevisiae* (Figura 33), y 1 llamado P8 a cepas no-*Saccharomyces*. Se mantuvieron los mismos nombres y colores para representar a los mismos patrones detectados en las fermentaciones de la vendimia de 1999.

Los patrones P5.1, P5.2 y P5.3 se incluyeron dentro del patrón P5, aunque en la Figura 32 se muestran con colores parecidos al de P5; y P3.1 se incluyó dentro del P3.

Durante las primeras horas de la fermentación se detectó una carga importante en el mosto de cepas no-*Saccharomyces* con distintos cariotipos que se englobaron dentro del patrón P8, de manera que a las 44 horas de la fermentación, aunque el °Be descendió hasta 4,10, existía todavía un 69% de estas levaduras (Figura 32). A las 116 horas con un 0.15 °Be se detectaron en un 34%, cifra demasiado alta para las condiciones del mosto en ese momento (grado alcohólico elevado) que no eran las más adecuadas para el desarrollo de estas levaduras, pudiéndose tratar, en principio, de cepas contaminantes. Estas cepas no fueron iguales a las detectadas en el depósito E de la vendimia 1999 (Figura22) aunque se han representado con el mismo nombre y color para facilitar su identificación con respecto a las *Saccharomyces*. En el apartado 1.6 de los resultados se discutirá sobre la presencia de estas cepas durante las fermentaciones.



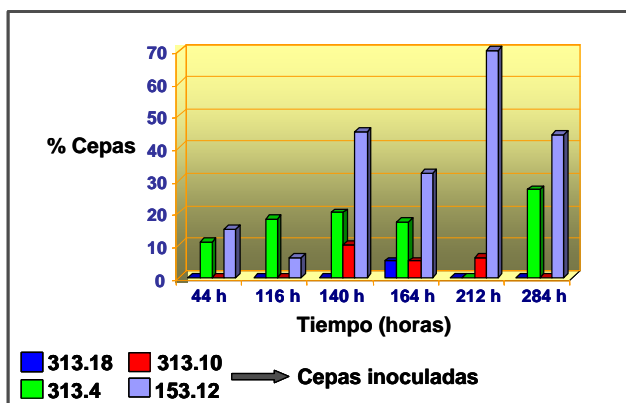
**Figura 33.** Cariotipos electroforéticos distintos detectados en el Experimento 1. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (110), aunque no se ha incluido el cariotipo de las cepas no-*Saccharomyces*. P1, P2, P3 y P5 corresponden a los patrones de las cepas inoculadas. M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

En este experimento las cepas inoculadas no llegaron a implantarse al 100 %. Aunque dos de las cuatro cepas, las de cariotipo P2 y P5, estuvieron presentes durante toda la fermentación, llegando a predominar a partir de las 116 horas, alcanzando a las 284 horas porcentajes de 27% y 44% respectivamente, incluyendo dentro de P5 las cepas de cariotipos P5.1 y P5.3. La cepa 313.10 con cariotipo P3 no siempre se detectó, solamente a las 140, 164 y 212 horas y en baja proporción. La

cepa 313.18 (P1) sólo se detectó a las 164 horas también en muy baja proporción, de forma que podríamos decir que tuvo una capacidad de implantación muy baja frente al resto de las cepas inoculadas y a las indígenas que acompañaron al mosto obtenido en esta vendimia (2000).

Además, junto a las cepas inoculadas, se detectaron cepas minoritarias de las cuales algunas presentaron cariotipos ya caracterizados en la vendimia anterior como P4, P7, P16, P17 y P18 y otras presentaron patrones nuevos como P22, P23, P24, P25 P26 y P28. La mayoría de estas cepas fueron detectadas cuando prácticamente finalizó la fermentación a partir de las 140 horas, con un °Be de 0,9956; todos estos patrones, excepto P7, P16 y P18 se detectaron en un 5% lo cual significó que cada uno de ellos fue representativo de una solo aislamiento.

La evolución y el porcentaje de las cepas inoculadas durante la fermentación se muestran en la Figura 34.



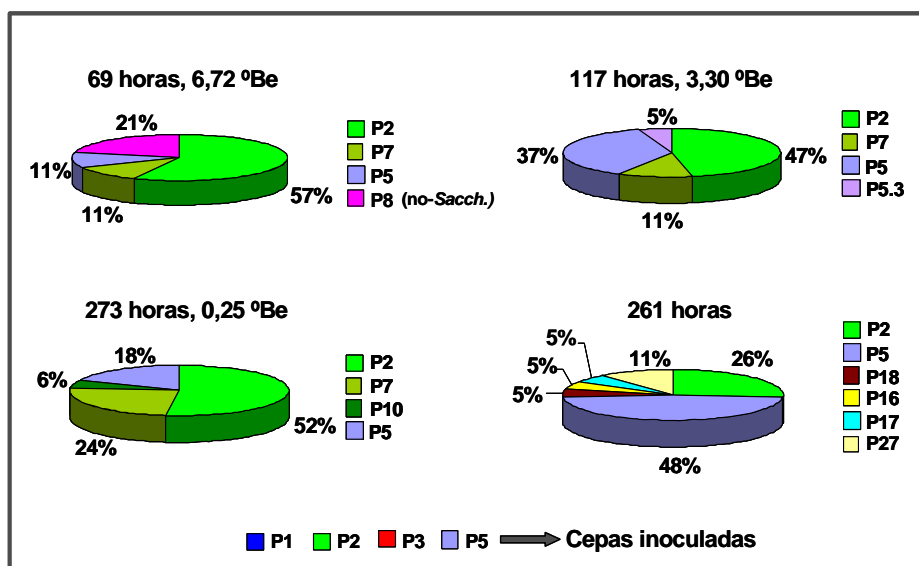
**Figura 34.** Porcentaje de aparición de las cepas inoculadas desde las 44 hasta las 284 horas del comienzo de la fermentación en 100.000 litros en el Experimento 1.

Los análisis sensoriales del vino, realizados por personal de la bodega especializado en catas, indicaron que las características organolépticas del vino obtenido en éste experimento no destacaron especialmente y fueron comparables a las de los vinos obtenidos de las fermentaciones espontáneas en otras vendimias (1999 y 2000).

## Experimento 2

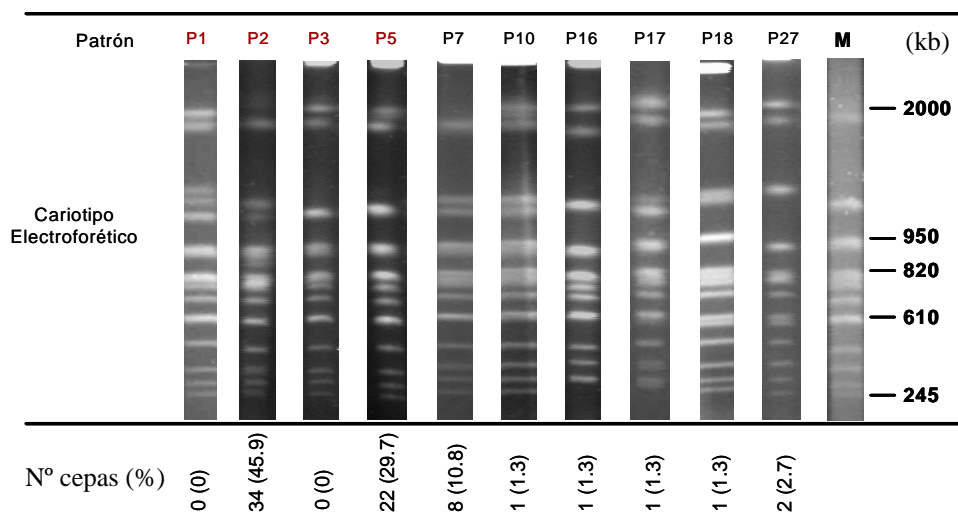
Las muestras que se analizaron fueron tomadas del depósito correspondiente cuando fue completado con 100.000 litros de mosto, a las 69, 117, 273 y 261 horas del comienzo de la fermentación, no haciéndose recargas de mosto fresco hasta que ésta finalizó. De cada muestra se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD y de las más representativas se eligieron al azar 20 colonias aisladas.

En este caso se analizó el cariotipo electroforético de un total de 74 cepas (19 cepas por cada muestra).



**Figura 35.** Resultados de la caracterización molecular del Experimento 2. Se representa el porcentaje de las cepas con distintos cariotipos durante cuatro momentos distintos de la fermentación de 100.000 litros de mosto.

Los resultados (Figura 35) muestran un polimorfismo cromosómico más bajo con respecto a los resultados del Experimento 1. Se detectaron un total de 18 patrones distintos y un polimorfismo del 24%. Igual que en el Experimento 1, los patrones se agruparon en 9, debido a la similitud encontrada entre algunos de ellos, lo que redujo el polimorfismo a la mitad (12%). De los 9 patrones, 8 pertenecieron a cepas *S. cerevisiae* (Figura 36) y 1 a cepas no-*Saccharomyces*.

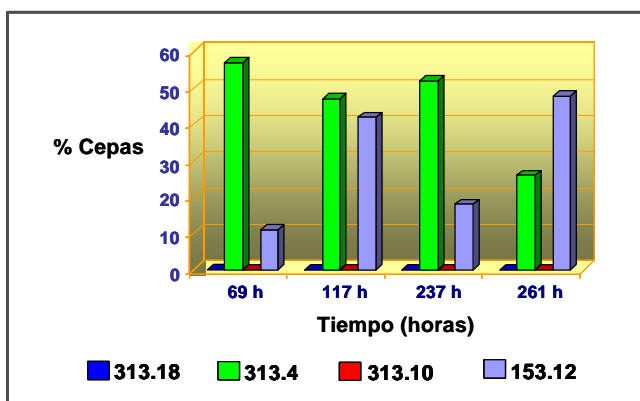


**Figura 36.** Cariotipos electroforéticos encontrados tras la caracterización molecular del Experimento 2. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (74). No se ha incluido el cariotipo de las cepas no-*Saccharomyces*. P1, P2, P3 y P5 corresponden a los patrones de las cepas inoculadas, y M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

Las cepas no-*Saccharomyces* sólo se detectaron al principio de la fermentación (69 horas) cuando el contenido en azúcar fue de 6,72 °Be y como en el caso del Experimento 1 se englobaron dentro del patrón P8. Las levaduras no-*Saccharomyces* fueron desplazadas totalmente por las inoculadas después de las 69 horas, y su presencia pudo ser debida a que la muestra fue tomada tras la adición de 10.000 litros de pie de cuba a los 100.000 litros finales y antes del comienzo de la fermentación. Se discutirá la presencia de estas cepas en el apartado 1.6 de los resultados.

En cuanto a la implantación de las levaduras inoculadas, se detectó una elevada proporción de cepas con patrones P2 y P5, que correspondieron a las inoculadas 313.4 y 153.12 respectivamente, estando presentes durante toda la fermentación como se indica en la Figura 37.

Las otras dos cepas inoculadas, 313.18 (P1) y 313.10 (P3), no se llegaron a detectar en ninguna de las muestras analizadas.



**Figura 37.** Porcentaje de aparición de las cepas inoculadas desde las 69 hasta las 261 horas del comienzo de la fermentación en 100.000 litros en el Experimento 2.

Se observaron, al final de la fermentación a las 261 horas, un conjunto de cepas minoritarias con patrones P16, P17 y P18 en un 5% que no estuvieron presentes en las otras muestras analizadas, lo cual indicó que cada uno de ellos fue representativo de un solo asilamiento. Cabe destacar la presencia en un 11% de cepas con un cariotipo nuevo P27 no detectado en el Experimento 1 ni en la vendimia de 1999.

Los análisis sensoriales del vino obtenido en este experimento y realizados por personal de la bodega especializado en catas, indicaron que los aromas primarios fueron potenciados con respecto al vino obtenido del Experimento 1 y también con respecto al obtenido en otras vendimias cuyos mostos fueron fermentados de manera espontánea (vendimias 1999 y 2000).

De los dos experimentos, el Experimento 2 proporcionó mejores resultados ya que se implantaron dos de las cepas inoculadas durante toda la fermentación y el vino obtenido fue de mayor calidad. Podríamos decir que las cepas 313.4 y 153.12 fueron las principales responsables de la fermentación y a ellas se debió las destacadas características organolépticas del producto final.

Los resultados de ambos experimentos fueron muy distintos pudiendo ser debido a la influencia de muchos factores como por ejemplo, el hecho de realizar las dos fermentaciones con 8 días de diferencia pudo haber causado variaciones en la composición del mosto. También hay que tener en cuenta que se realizaron a finales

del mes de septiembre (ver Tablas 3 y 4) y como consecuencia las uvas puede que no estuviesen en las mismas condiciones fitosanitarias que cuando comenzó la vendimia a finales de agosto. Este hecho podría explicar el alto contenido de cepas no-*Saccharomyces* detectadas e el Experimento 1, aunque el Experimento 2 se realizó más tarde y no se observaron estas levaduras en proporciones tan elevadas. La elaboración del pie de cuba en ambos experimentos también fue distinta, teniendo en el 1 más operaciones de escalamientos que en el 2.

Además se podría decir que cada depósito constituye un ecosistema y cualquier pequeña variación en las condiciones de fermentación (temperatura, composición del mosto, etc.) puede producir cambios en las levaduras, de manera que se seleccionen cepas o poblaciones diferentes.

Cabe destacar que en el Experimento 2 donde se obtuvo un vino con mejores características organolépticas se detectó menos polimorfismo cromosómico y una implantación de las cepas con cariotipos P2 y P5, por tanto podríamos llegar a correlacionar la presencia de determinados patrones con la calidad del producto obtenido (Mesa y col. 2000).

#### 1.4. Selección de cepas de levaduras autóctonas

Para seleccionar las cepas más adecuadas de las cuatro pre-seleccionadas y poder utilizarlas en fermentaciones industriales, se relacionaron los resultados obtenidos del análisis microbiológico (Tabla 22) con los moleculares sobre la implantación de estas cepas en fermentaciones en condiciones semi-industriales.

En principio, teniendo en cuenta la Tabla 22, las cuatro cepas dieron resultados muy similares, aunque las mejores para su selección fueron 313.18 y 313.4, seguidas de 153.12 y 313.10. Pero los resultados del estudio molecular mostraron que, tanto en el experimento 1 como en el 2, la cepa 313.18 se vio desplazada por las inoculadas y por otras silvestres presentes en el mosto, no considerándola, por consiguiente, con una buena capacidad de implantación. El hecho de que esta cepa no se implantara en las fermentaciones llevadas a cabo en

condiciones semi-industriales a pesar de tener buen poder fermentativo y presentar fenotipo killer, nos llevó a descartarla y no seleccionarla.

Cepas	Inhibición por etanol		Poder fermentativo en g/L	Tasa de consumo de azúcares	Factor killer
	5% EtOH	10% EtOH			
313.18 (P1)	27,77	92,46	192,96	4,0643	M+R+ (K)
313.4 (P2)	37,86	91,94	194,6	1,7822	M+R+ (K)
313.10 (P3)	39,37	82,92	187,82	2,1256	M+R+ (K)
153.12 (P5)	28,23	89,8	189,03	3,4273	M+R+ (K)

**Tabla 22.** Resumen de los resultados de los parámetros de interés enológico para las cuatro cepas pre-seleccionadas 313.18, 313.4, 313.10 y 153.12 con patrones moleculares P1, P2, P3 y P5 respectivamente.

La cepa 313.4 tuvo una tasa de consumo de azúcares baja pero fue la de mayor poder fermentativo, además de implantarse y permanecer en proporciones altas al final de la fermentación en ambos experimentos, por lo tanto se consideró una buena candidata para su selección.

En cuanto a la cepa 153.12, tuvo una tasa de consumo intermedia entre las dos cepas anteriores. Su poder fermentativo fue algo mas bajo que el de 313.4, dejando en el medio azúcares sin consumir, pero su capacidad para dirigir fermentaciones en condiciones industriales fue buena, detectándose en ambos experimentos durante todo el proceso, por lo que también se consideró adecuada para su selección.

La cepa 313.10 fue de las cuatro la de menor poder fermentativo y aunque se detectó en porcentajes bajos en el experimento 1 (6%) también se tuvo en cuenta para ser seleccionada.

Para concluir, podríamos decir que para la selección se tuvo en cuenta sobre todo el análisis de la capacidad de implantación de las cepas en fermentaciones inoculadas. El estudio de los parámetros de interés enológico nos sirvió de apoyo para dicha selección ya que los resultados obtenidos para las cuatro levaduras fueron



similares. Por tanto se seleccionaron las cepas 313.4, 153.12 y 313.4, para ser utilizadas como inóculo en las fermentaciones industriales de la siguiente vendimia (2001).

### **1.5. Estudio de la diversidad genética entre las levaduras responsables de las fermentaciones espontáneas durante la vendimia 2000**

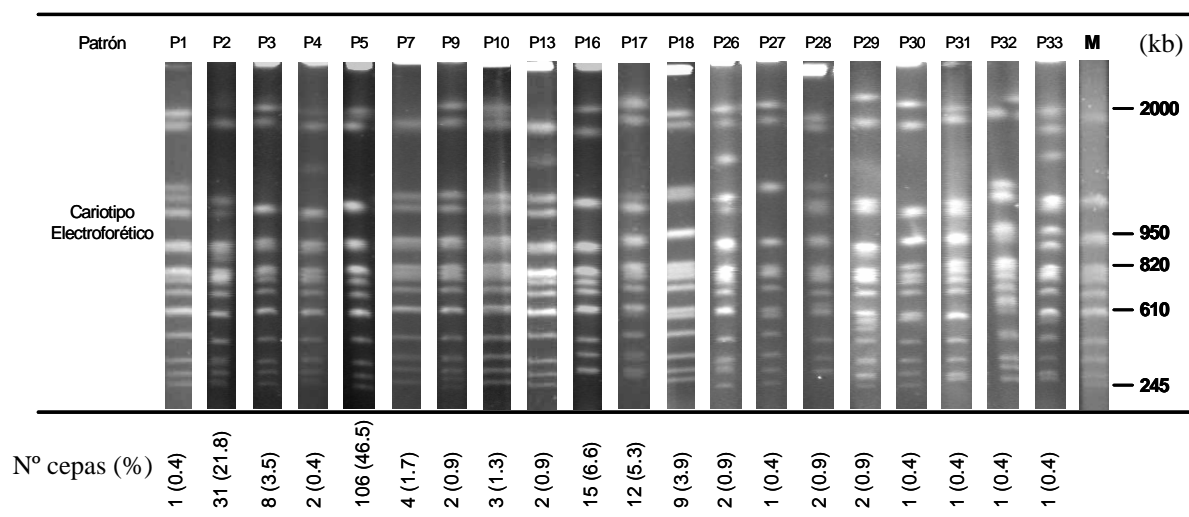
Durante esta vendimia además de realizar los dos experimentos de fermentaciones inoculadas con las cuatro cepas autóctonas, también se analizaron muestras de las fermentaciones espontáneas tomadas de varios depósitos. El objetivo de este estudio fue el de comparar los resultados con los obtenidos en la vendimia de 1999, y comprobar si las cepas que fueron pre-seleccionadas aparecían en proporciones similares o no a las que mostraron en 1999.

Las fermentaciones, igual que en la vendimia 1999, fueron llevadas a cabo en depósitos de 400.000 litros de mosto que se fueron llenando de forma discontinua hasta completar ese volumen. El mosto utilizado procedió de la variedad de uva *Palomino Fino*. Se tomaron muestras diarias de varios fermentadores (Tabla 2), se glicerizaron al 20% y se conservaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento, una vez finalizada la vendimia.

Se analizaron 12 muestras (se indican en amarillo en la Tabla 2) pertenecientes a 7 depósitos, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de Petri con medio YPD. Tras 3-4 días de incubación a 28 °C de las placas más representativas se aislaron 20 colonias. De los 7 depósitos sólo se estudió la evolución de la fermentación en tres de ellos, E, F y H (Figura 39). Las muestras tomadas de los depósitos A y G correspondieron a mosto, dado su elevado contenido en azúcar (9,60 y 11 °Be respectivamente).

Mediante cariotipo electroforético se caracterizaron un total de 228 cepas (19-20 cepas/muestra) con los resultados que se muestran en la Figura 39. De todas las cepas caracterizadas, se detectaron 126 patrones cromosómicos distintos que se

diferenciaron en el número, movilidad e intensidad de las bandas, proporcionando un polimorfismo del 55%. Igual que en casos anteriores, para facilitar el análisis de los resultados, y dada la similitud encontrada entre algunos cariotipos, se agruparon en 21 patrones generales, de los cuales 20 pertenecieron a cepas *S. cerevisiae* (Figura 38) y 1 a cepas de otros géneros no-*Saccharomyces*.



**Figura 38.** Patrones cariotípicos de las cepas detectadas en las fermentaciones espontáneas de la vendimia 2000. Se ha indicado el número de cepas con cada cariotipo y el porcentaje de aparición de estas teniendo en cuenta el total de cepas analizadas (228), incluyendo a las cepas no-*Saccharomyces* implicadas en las fermentaciones, aunque no se muestran sus cariotipos. M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

Los cariotipos P3.1 y P3.2 se han considerado similares a P3 y los cariotipos P5.1, P5.2 y P5.3 similares a P5, no incluyéndose en la Figura 38.

Del análisis de la evolución de las fermentaciones en los depósitos E y F, se deriva que:

En el **depósito E**, en la primera y última muestra analizadas las cepas predominantes fueron las de cariotipo P5, P5.1, y acompañando a éstas se observó un conjunto de cepas minoritarias con cariotipos P7, P17, P16 y P3.

Entre la primera y la segunda muestra es posible que se realizara una recarga de mosto en el depósito, puesto que ambas muestras tuvieron un contenido alto y similar de azúcar (medido en °Be). Esto explicaría el aumento de la variabilidad

genética encontrada entre las cepas de la segunda muestra, llegándose a detectar los cariotipos P18, P26, P27 y P29, que no se vuelven a detectar en la última muestra, cuando la fermentación está más avanzada (2,45 °Be).

Estos resultados sugieren que la adición de mosto fresco a un medio fermentando, con bajo grado alcohólico, aporta en muchos casos cepas nuevas, pudiendo llegar a modificar la dinámica de las poblaciones de las levaduras. En este mismo depósito antes de analizar la última muestra también hubo una recarga de mosto (Tabla 2) que aumentó en 0,7 unidades el °Beaumé. En las condiciones que en el mosto se daban, como por ejemplo alto contenido en alcohol, no parece que esta recarga aportase nuevas cepas y si así fue, éstas fueron desplazadas por las que se encontraban dirigiendo la fermentación.

En el **depósito F** se detectaron cepas que estuvieron presentes en las tres muestras analizadas y fueron las de patrones P2, P5, P5.1 y P18, aunque las proporciones de cada una variaron según el estado de la fermentación. Las cepas predominantes fueron las de cariotipo P5 en la primera y última muestra y las de patrón P2 en la segunda. Acompañando a éstas se detectaron una serie de cepas minoritarias, por ejemplo en la primera muestra fueron las de cariotipo P18, P13, P29 y P8, correspondientes estas últimas a cepas no-*Saccharomyces*. En la segunda muestra fueron P7, P9 y P16; y en la tercera P1, P2, P17, P18 y P16.

Entre la primera muestra (7,25 °Be) y la segunda (6,25 °Be) seguramente se realizó una recarga de mosto, ya que el contenido en azúcar es muy próximo en ambas. En este caso se observó un cambio en las poblaciones de la segunda muestra, pudiendo ser debido, bien a la adición de mosto, o a la propia evolución de la fermentación espontánea.

En los **depósitos A, G y H** que correspondieron a muestras de mosto antes de comenzar la fermentación, se encontraron levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* en proporciones elevadas, por ejemplo, en el depósito A (9,60 °Be) un 22%, en el G (11 °Be) un 10%, en el H (10,7 °Be) un 88%, y en el depósito F después de 24 horas del comienzo de la fermentación (7,25 °Be) un 5%.

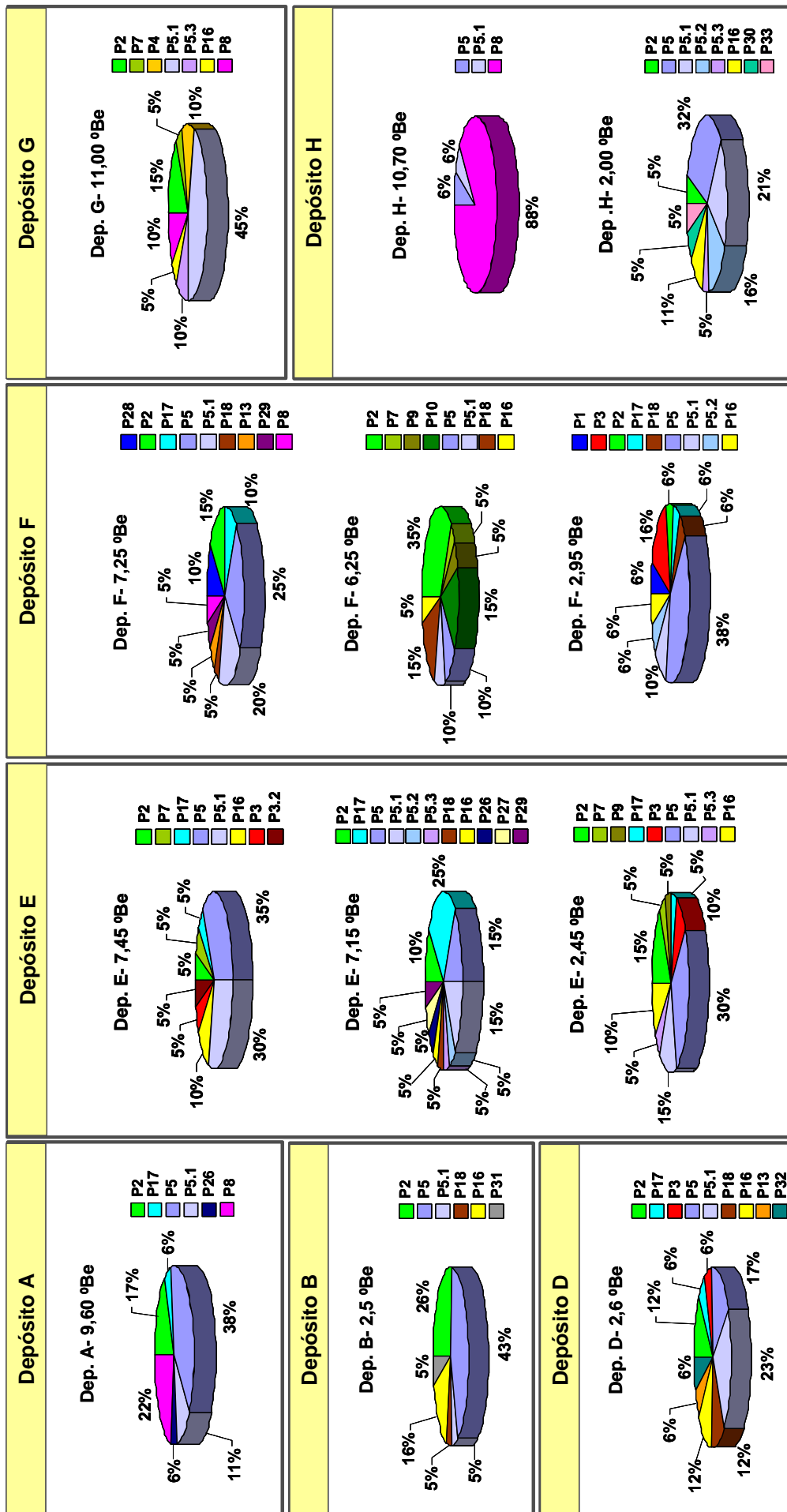
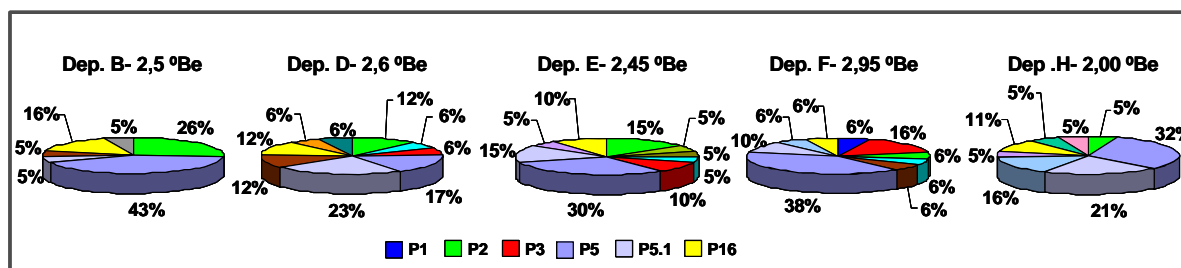


Figura 39. Porcentaje de cepas con distintos cariotipos detectados durante la fermentación espontánea de varios depósitos en la vendimia 2000.

Se discutirá sobre la presencia de las cepas no-*Saccharomyces* en el apartado 1.6 de los resultados.

Comparando los resultados de muestras tomadas de distintos depósitos pero en el mismo momento de la fermentación, con un contenido de azúcar en torno a 2,5 °Be observamos lo siguiente:



**Figura 40.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos presentes hacia el final de las fermentaciones en cinco depósitos. En la parte inferior se indican los patrones cariotípicos de las cepas que fueron predominantes en las muestras indicadas.

En los 5 depósitos, hacia el final de la fermentación, se observa un predominio de cepas con cariotipos P2, P5, P5.1 y P16, aunque las cepas mayoritarias fueron las de cariotipo P5 y las de patrones similares a éstas como P5.1. Estos resultados fueron similares a aquellos obtenidos en la vendimia 1999, cuando se comparó la presencia de determinadas poblaciones de levaduras al final de la fermentación en tres depósitos (Figura 24). Aún así, comprobamos que las poblaciones de levaduras evolucionaron de forma distinta en cada depósito de fermentación.

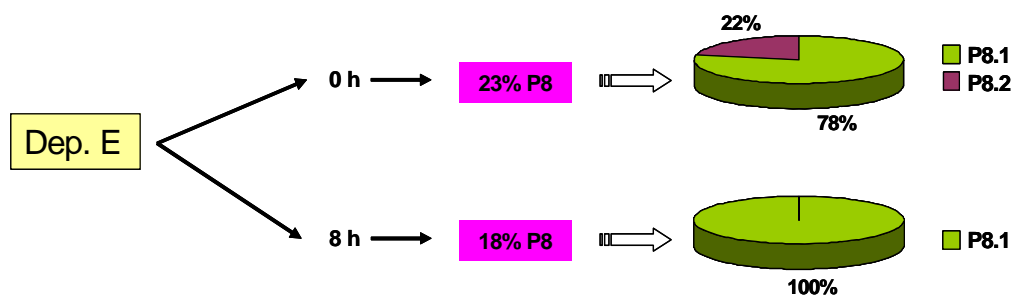
Teniendo en cuenta las cepas que se pre-seleccionaron a partir del estudio de la fermentación espontánea del depósito E en la vendimia 1999 (Figura 22) (las de patrones P1, P2, P3 y P5), en la vendimia 2000 se detectaron de forma mayoritaria al menos dos de estos patrones, P2 y P5, en tres de los depósitos analizados (B, D y E). Sin embargo, las cepas con patrones P1 que se detectaron en 1999 en proporción considerable, ahora sólo aparecieron en un 6% en el depósito F. En cuanto a las cepas con cariotipo P3, se detectaron en tres depósitos de la fermentación en proporciones variables, de forma similar a como se detectó en la vendimia 1999.

Los análisis sensoriales del vino, realizados por personal de la bodega especializado en catas, revelaron que las características organolépticas de éste, obtenido tras las fermentaciones espontáneas, fueron similares a las de los vinos obtenidos en la vendimia 1999 y a los del Experimento 1 (vendimia 2000).

### 1.6. Detección de cepas no-*Saccharomyces* mediante cariotipo electroforético en las vendimias 1999 y 2000

Mediante cariotipo electroforético se pudieron caracterizar también cepas de géneros distintos a *Saccharomyces* ya que no presentaron las cuatro bandas características de este género que aparecen por debajo de 500 kb.

En la **vendimia 1999** en la fermentación espontánea del depósito E, estas cepas estuvieron presentes al comienzo de la fermentación, 0 y 8 horas en un 23 y 18% respectivamente, desapareciendo a medida que fue avanzando la fermentación. Estas cepas fueron agrupadas dentro de un patrón general llamado P8, aunque realmente se detectó una cierta variabilidad genética entre ellas.



**Figura 41.** Se muestra la proporción de las distintas cepas no-*Saccharomyces* incluidas dentro del patrón general P8, a las 0 y 8 horas del comienzo de la fermentación en el depósito E analizado en la vendimia 1999.

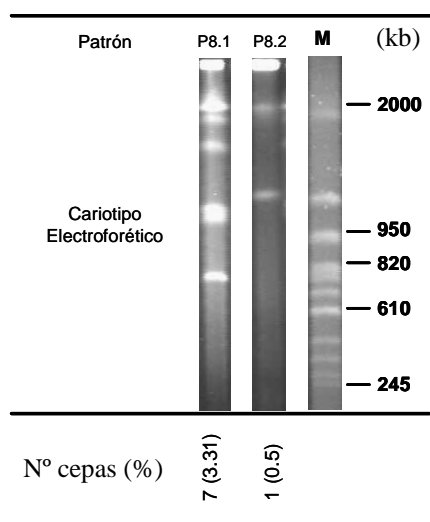
En general al comienzo de la fermentación detectamos sólo dos tipos de cepas no-*Saccharomyces* que denominamos P8.1 y P8.2 en las proporciones que se indican en la Figura 41. Las cepas mayoritarias fueron las que presentaron patrón P8.1, exhibiendo un aroma muy afrutado, olor a pera, cuando fueron crecidas en

medio líquido YPD. Además al microscopio óptico se observaron células gemando (con yemas), con forma de limón o apiculadas.

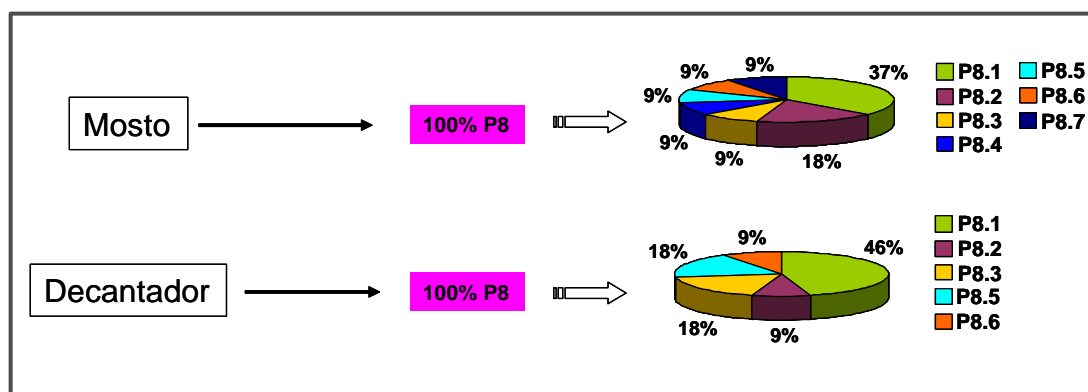
Las mismas cepas (P8.1) se detectaron a las 221 horas en el depósito E (Figura 22) aunque sólo en un 7%, hecho que coincidió con una recarga de mosto en el depósito.

Además se analizó una muestra de mosto (14 cepas) y otra de un decantador (14 cepas). La muestra de mosto fue tomada cuando las uvas fueron recién prensadas (sin centrifugarlo), y la del decantador una vez que el mosto fue introducido en los depósitos para clarificarlo.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Figura 43.

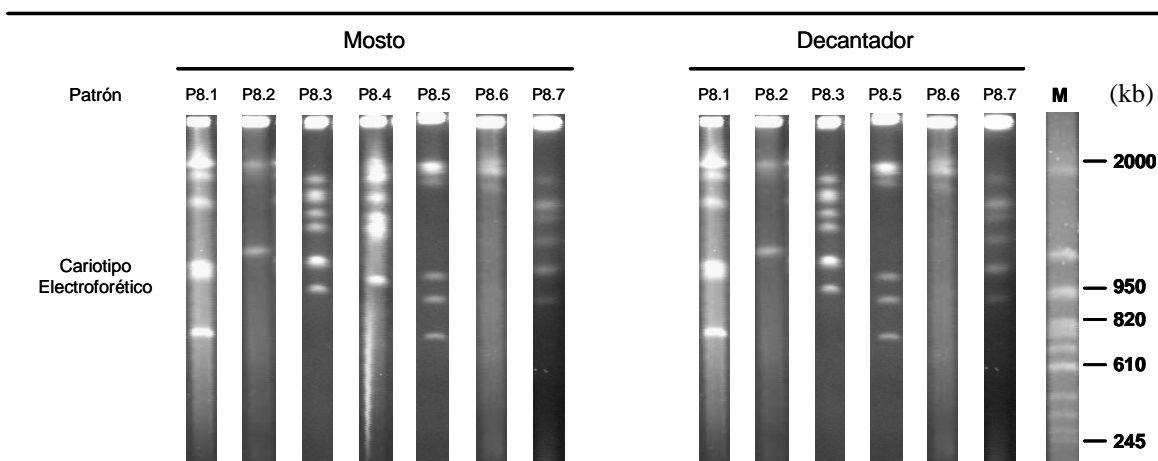


**Figura 42.** Cariotipo electroforético de las cepas con patrones P8.1 y P8.2. Se muestra el número de cepas con cada cariotipo y el porcentaje de aparición teniendo en cuenta el número total de cepas (211) analizadas en el depósito E (vendimia 1999). M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega



**Figura 43.** Porcentaje de las distintas cepas no-*Saccharomyces* incluidas dentro del patrón general P8 presentes en una muestra tomada del mosto recién prensado y de un decantador.

El análisis reveló la existencia de una amplia diversidad genética de cepas cuyos cariotipos se muestran en la Figura 44. Todas las cepas caracterizadas fueron no-*Saccharomyces*, y dentro del conjunto de éstas las mayoritarias fueron aquellas que mostraron el patrón P8.1, las cuales se detectaron en un 37 y 46% en las muestras de mosto y decantador respectivamente (Figura 43).



**Figura 44.** Cariotipo electroforético de las cepas no-*Saccharomyces*, desde P8.1 hasta P8.7, detectadas en una muestra tomada del mosto recién prensado y de un decantador en la vendimia 1999. M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

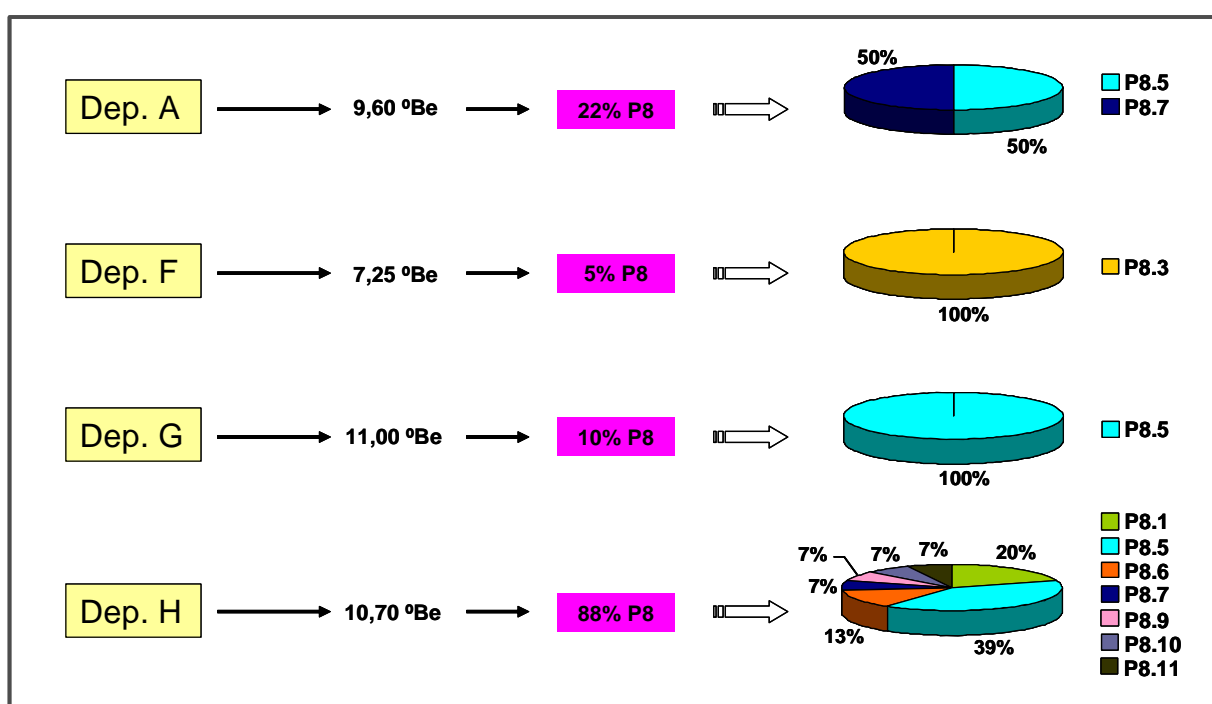
Las cepas con patrón P8.1 fueron levaduras apiculadas y de carácter afrutado, igual que se observó en el caso del depósito E (Figura 22) al inicio de la fermentación. La presencia de este tipo de levaduras en proporciones elevadas en muestras tomadas de mosto fresco, antes del comienzo de la fermentación, también se ha observado en otros estudios (Combina y col. 2005).

El resto de cepas no-*Saccharomyces*, con patrones P8.2, P8.3, P8.4, P8.5, P8.6 y P8.7, y detectadas en proporciones más bajas, no se encontraron al comienzo del proceso de fermentación. La desaparición de estas cepas puede ser debida a la operación del clarificado del mosto, llevada a cabo en el decantador, ya que las prácticas pre-fermentativas disminuyen drásticamente y modifican la composición inicial de la población indígena, compuesta en su mayoría por cepas no-*Saccharomyces* (Ciani & Vincenzo 2002).



Además la presencia de las cepas no-*Saccharomyces* en la muestra de mosto nos sugiere que probablemente estuviesen presentes en las uvas y por tanto en los viñedos (Rementeria y col. 2003).

En las fermentaciones espontáneas de la **vendimia 2000**, las cepas no-*Saccharomyces* con patrón P8 se detectaron en proporciones variables en los distintos depósitos analizados. Dentro de este patrón general, también se detectó en algunos casos una considerable variabilidad genética entre las cepas como se representa en la Figura 45.

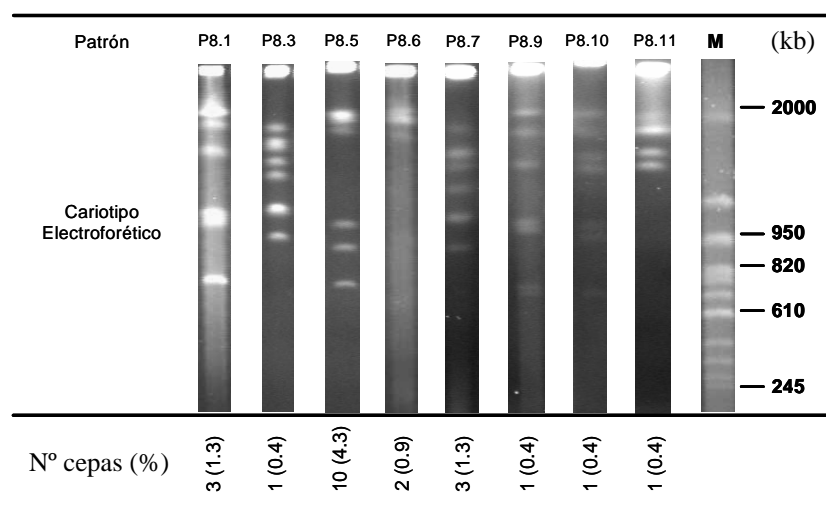


**Figura 45.** Porcentaje de las distintas cepas no-*Saccharomyces* incluidas dentro del patrón general P8, presentes en las fermentaciones espontáneas de algunas de las muestras analizadas en la vendimia 2000, cuando el mosto tenía un contenido en azúcar elevado (medido en °Bé).

En el depósito H se detectó la proporción más alta de estas levaduras, un 88% y por tanto la variabilidad genética entre las cepas fue más alta que la mostrada en el resto de los otros depósitos, llegándose incluso a detectar las cepas con patrón P8.1, que correspondieron a las levaduras apiculadas de carácter afrutado que no estuvieron presentes en el resto de las muestras.

Además se caracterizaron cepas que mostraron nuevos cariotipos como P8.9, P8.10 y P8.11, aunque estuvieron presentes de forma minoritaria, pudiendo ser exclusivas de los mostos obtenidos en la vendimia 2000.

En el resto de los depósitos la variabilidad de cepas no-*Saccharomyces* fue más baja, por ejemplo, en el depósito A el 22% de estas levaduras correspondió a cepas que mostraron sólo dos patrones cariotípicos, P8.5 y P8.7. En los depósitos F y G la presencia de cepas no-*Saccharomyces* fue del 5% y 10%, respectivamente y por tanto la variabilidad genética fue también más baja. En el depósito F el 5% correspondió a un sólo aislamiento que mostró el patrón P8.3. Y en el caso del depósito G el 100% correspondió a cepas que mostraron el mismo patrón, P8.5.

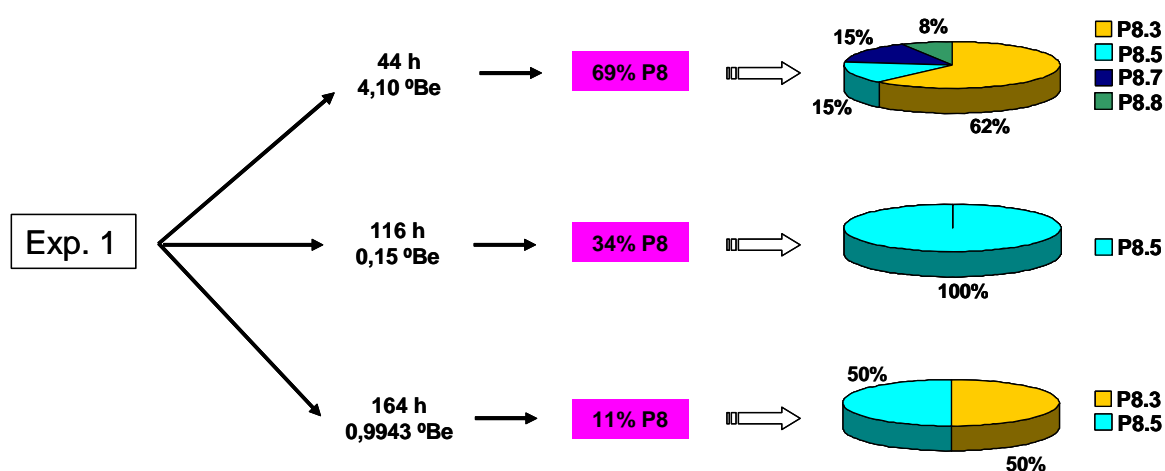


**Figura 46.** Patrones cariotípicos de las cepas no-*Saccharomyces* aisladas de las fermentaciones de la vendimia 2000. Se muestra el número de cepas que presentaron cada cariotipo y el porcentaje de aparición teniendo en cuenta el número total de cepas analizadas (228) en todos los depósitos con fermentación espontánea. M correspondió al marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega

En general, se observaron cepas cuyos patrones ya fueron caracterizados en la vendimia anterior como P8.1, P8.3, P8.5, P8.6, y P8.7, lo que nos llevó a pensar que estas cepas no-*Saccharomyces* pudieran ser características de la zona geográfica estudiada, como se ha puesto de manifiesto en otros estudios (Raspor y col. 2006). En el caso de las cepas con patrón P8.1 que fueron detectadas en mayor proporción en la vendimia 1999 que en la del año 2000, se podría pensar que su presencia pudo

variar de un año a otro, debido quizás a las condiciones climáticas o a las prácticas pre-fermentativas (Longo y col. 1991).

Las fermentaciones inoculadas en condiciones semi-industriales, **Experimento 1** y **Experimento 2**, realizadas durante la vendimia 2000 se han considerado aparte con respecto a las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en la misma vendimia.



**Figura 47.** Porcentaje de las distintas cepas no-*Saccharomyces* incluidas dentro del patrón general P8 presentes en tres de las seis muestras analizadas de la fermentación inoculada del Experimento 1, realizado en la vendimia 2000.



**Figura 48.** Porcentaje de las distintas cepas no-*Saccharomyces* incluidas dentro del patrón general P8 presentes en una de las cuatro muestras analizadas de la fermentación inoculada del Experimento 2, realizado en la vendimia 2000.

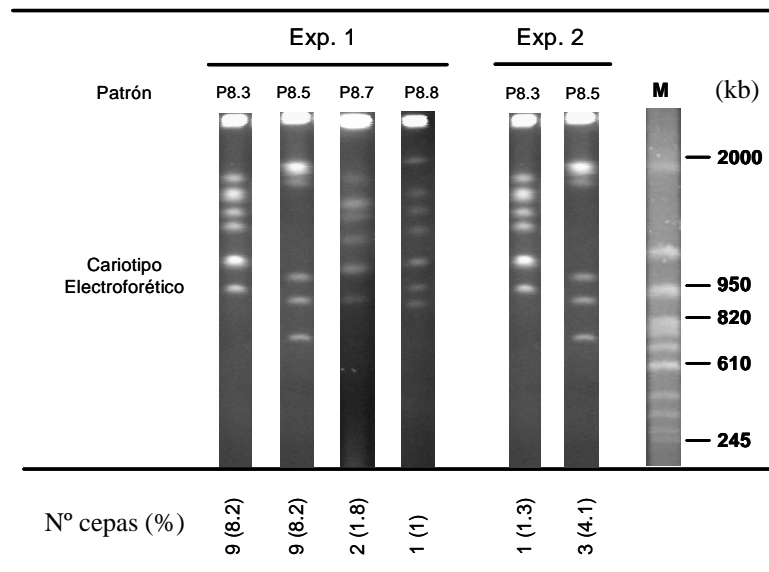
En el Experimento 1 (Figura 47) se detectaron cepas no-*Saccharomyces* en proporciones elevadas en muestras donde el grado Beaumé fue bajo, por ejemplo a las 44 horas con un °Be de 4,10 estuvieron presentes en un 69%. Incluso con la fermentación terminada (0,9943 °Be) se llegaron a detectar cepas que mostraron patrones P8.3 y P8.5 en un 11%.

En el Experimento 2 (Figura 48) se detectaron las mismas cepas pero sólo en una muestra, la de mayor contenido de azúcar.

En el apartado 1.3.2.2 de los resultados se expuso que la presencia de estas cepas en el caso del Experimento 1 en muestras donde el contenido de azúcar era bajo (alto grado alcohólico), por ejemplo, en un 34% a las 116 horas, no eran las condiciones más idóneas para el desarrollo de estas levaduras por lo que las consideramos, en principio, como contaminantes. Pero se ha descrito que existen determinadas especies de levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida stellata* que crece lentamente durante la fermentación de los mostos, llegando a estar presente en proporciones altas incluso cuando el contenido en alcohol es de un 12% (Combina y col. 2005), o llegándose a detectar en muestras sólo de vino (Longo y col. 1991). Por tanto, el hecho de encontrar estas cepas en proporciones tan altas en muestras donde ya existía un cierto grado alcohólico en el Experimento 1 nos sugirió que en el caso de las de patrones P8.3 y P8.5 pudieran pertenecer a esta especie. Además también se ha observado que algunas cepas de *C. stellata* pueden tener una tolerancia al etanol similar a las cepas de *S. cerevisiae*, llegándose a utilizar en cultivos con *S. cerevisiae* para potenciar el contenido en glicerol y otros sabores característicos del vino (Soden y col. 2000; Romano y col. 2003).

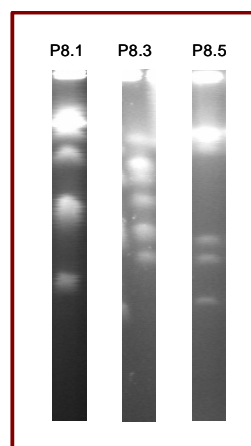
La presencia de cepas no-*Saccharomyces* durante la fermentación en un estado avanzado, aunque no es lo típico, se ha observado también en otros estudios, en los que se asoció la presencia de estas levaduras con las condiciones de elaboración de determinados tipos vinos, como por ejemplo los de contenido alcohólico bajo (8-11% v/v) obtenidos con fermentaciones a bajas temperaturas (Ganga & Martínez 2004; Longo y col. 1991; Rementeria y col 2003).

Las cepas con patrones P8.3 y P8.5 también se detectaron en muestras que tuvieron un contenido alto de azúcar como por ejemplo en el caso de las fermentaciones espontáneas de la vendimia 2000 (Figura 45), y en las muestras de mosto y del decantador (Figura 43) analizadas en la vendimia 1999.



**Figura 49.** Patrones de cepas no-*Saccharomyces* detectados en los experimentos 1 y 2 de fermentaciones inoculadas en condiciones semi-industriales. Se muestra el número de cepas que presentaron cada cariotipo y el porcentaje de aparición teniendo en cuenta el número total de cepas analizadas en cada experimento (110 en Exp. 1, y 74 en Exp. 2).

Curiosamente, en un estudio realizado en muestras tomadas de fermentaciones de mostos procedentes de **uvas tintas**, además de caracterizarse cepas no-*Saccharomyces* propias de estos mostos (no presentes en mostos procedentes variedades blancas), se detectaron cepas que mostraron los patrones P8.1, P8.3 y P8.5, que además fueron los más abundantes al comienzo de las fermentaciones de los vinos tintos en las vendimias 2003 y 2004.



**Figura 50.** Patrones de cepas no-*Saccharomyces* más abundantes detectados al principio de las fermentaciones de mostos tintos en las vendimias 2003 y 2004.

En la caracterización de cepas de levaduras de tintos, las que mostraron patrones P8.1, también presentaron un aroma afrutado cuando fueron crecidas en medio líquido YPD, y fueron, en cuanto a su morfología celular, apiculadas. Esto es indicativo de que se trata de las mismas levaduras detectadas tanto en los mostos blancos como en las primeras horas de la fermentación de los vinos blancos, y que definitivamente son cepas representativas de un área geográfica, y no específicas de la variedad de uva.

### **1.7. Comparación de las fermentaciones espontáneas durante dos años consecutivos. Polimorfismo y sucesión de especies. Discusión**

Los métodos de caracterización genética como por ejemplo, la obtención del cariotipo electroforético mediante *Electroforesis en Campo pulsante* o el análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial, permiten observar las variaciones en el tamaño de los cromosomas o fragmentos de ADN en zonas específicas del genoma cuando se caracterizan cepas de levaduras industriales (Nadal y col. 1996, 1999; Esteve-Zarzoso y col. 2001). Además permiten detectar el alto polimorfismo que existe en la estructura del genoma nuclear y mitocondrial cuando se analizan las poblaciones naturales de las levaduras *S. cerevisiae* y poder así diferenciarlas a nivel de cepa, evaluando también la persistencia de éstas en sucesivas vendimias (Querol y col. 1994; Nadal y col. 1996; Gutiérrez y col. 1999).

En nuestro estudio la obtención del cariotipo electroforético, mediante *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE) en un aparato CHEF DR-II, nos ha permitido analizar la diversidad de cepas involucradas en la fermentación espontánea en la vendimia 1999, poniendo de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo cromosómico entre las poblaciones de las cepas caracterizadas, así como una sucesión de éstas a lo largo de la fermentación. Además este primer estudio ha supuesto el primer paso en la selección de cepas autóctonas. En una segunda vendimia en 2000, el conocimiento de las cepas involucradas en las fermentaciones espontáneas nos sirvió para comprobar que, en cierto modo, se repetía lo observado en la vendimia anterior. Es decir, que en las dos vendimias

analizadas se observó una gran diversidad de cepas y en cada una de ellas al menos dos fueron predominantes, aquéllas que mostraron los patrones cariotípicos P2 y P5. Sin embargo, durante la vendimia 1999 los patrones P1 y P3 también fueron los más abundantes, aunque minoritarios en 2000. Y en este último año acompañando a las cepas con patrones mayoritarios P2 y P5 estuvieron las cepas con patrones P16 y P17 que resultaron ser minoritarios en la vendimia 1999.

Las dos vendimias estudiadas (Figuras 25 y 38) mostraron 12 patrones comunes, P1, P2, P3, P4, P5, P7, P9, P10, P13, P16, P17 y P18, aunque la frecuencia de aparición de estos patrones varió de un año a otro.

En la vendimia 2000 se detectaron cepas con nuevos cariotipos, apareciendo 8 patrones mas que en 1999, llamados P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32 y P33, aunque en baja proporción, en torno al 5-6%, lo cual significó que cada uno de ellos fue representativo de una única cepa.

Aunque en la vendimia de 2000 la variabilidad genética fue algo mayor, podríamos decir que el nivel de **polimorfismo** detectado entre las poblaciones de *S. cerevisiae* en las dos vendimias fue similar (17 patrones generales en 1999 y 20 en 2000), lo cual coincidió con otros estudios realizados (Vezinhet y col. 1992; Querol y col. 1994; Nadal y col. 1996; Sabate y col. 1998; Torija y col. 2001; Lopes y col. 2002, 2005; Granchi y col. 2003; Santamaría y col. 2005; Blanco y col. 2006; Le Jeune y col. 2006).

Se ha determinado que las cepas vínicas no tienen un cariotipo electroforético estable y definido como ocurre entre las poblaciones de las levaduras de velo de flor (Martínez y col. 1995, Mesa y col. 1999), aunque la variabilidad tampoco es tan elevada como entre las levaduras del pan (Benítez y col. 1996; Codón y col. 1997).

El mantenimiento del polimorfismo en una población de levaduras sugiere que se pueden producir cambios en el genoma de estas levaduras que pueden ser el resultado de mecanismos de adaptación de estos organismos a las condiciones de vinificación (Adams y col. 1992; Longo & Vezinhet 1993), lo cual les confiere una ventaja selectiva (Pérez-Ortín y col. 2002). Por ejemplo las aneupoidías, que están

muy extendidas entre las levaduras industriales (Bakalinsky & Snow 1990; Adams y col. 1992), pueden incrementar el número de genes beneficiosos y proteger a las células frente a los alelos letales o deletéreos (Puig y col. 2000).

En nuestro estudio, la alta variabilidad genética, detectada tras analizar el cariotipo en las dos vendimias, sugiere que se pueden dar procesos de reorganizaciones cromosómicas durante el crecimiento vegetativo de las levaduras en la fermentación, y que pueden ser debidas a recombinaciones entre cromosomas homólogos (Longo & Vezinhet 1993) y a recombinaciones entre secuencias homólogas repetidas por todo el genoma tales como elementos Ty, delta, o Y' (Codón y col. 1997; Wolfe & Shields 1997; Nadal y col. 1999; Rachidi y col. 1999; Puig y col. 2000).

Por ejemplo, en el caso particular de las levaduras de velo de flor se ha determinado que estas cepas son aneuploides para todos los cromosomas, detectándose amplificaciones de genes producidas por grandes reorganizaciones cromosómicas mediadas por elementos Ty, LTRs y tRNA en respuesta a una evolución adaptativa de estas levaduras al ambiente tan selectivo en el que se encuentran creciendo (Infante y col. 2003).

En cuanto a la **sucesión de poblaciones**, tanto en el depósito E (Figura 22) de la vendimia 1999 como en los E y F (Figura 39) de la vendimia 2000 se observó que desde el inicio hasta el final de la fermentación las poblaciones de levaduras y la frecuencia de aparición de las distintas cepas fueron variando.

En el depósito E en la vendimia de 1999 se observó que al menos cuatro cepas fueron predominantes durante toda la fermentación, las de cariotipo P1, P2, P3 y P5. Acompañando a éstas existió una amplia diversidad de cepas minoritarias, como por ejemplo las de cariotipos P7, P9, P10, P4, P16, P13 y P17, que fueron sustituyéndose unas por otras a medida que fue avanzando la fermentación y cuyas frecuencias de aparición fueron también variando. Además se observaron cepas características de una determinada fase de la fermentación. Estos hechos fueron indicativos de la sucesión de poblaciones de levaduras que se produjo a lo largo de la fermentación en este depósito.



En la vendimia 2000 en el caso del depósito E las cepas que estuvieron presentes durante la fermentación en proporciones altas fueron las de patrones P5 y P5.1, detectándose también otras de forma minoritaria con patrones P3, P7, P16 y P17. En el depósito F las cepas predominantes durante la fermentación fueron las que mostraron patrones P2 y P5 aunque en porcentajes variables según la muestra que se analizó, detectándose igualmente un conjunto de cepas minoritarias como por ejemplo las de patrones P1, P7, P9, P13, P16 y P29 P23, P24, P25, cuyas frecuencias de aparición fueron variando también junto a las predominantes.

En general, podríamos considerar que las cepas predominantes en cada depósito fueron las responsables principales de la fermentación y las mejores adaptadas a las condiciones de vinificación. Tanto los porcentajes de las cepas mayoritarias como los de las cepas minoritarias fueron variando durante las fermentaciones, comprobándose que al final del proceso la diversidad de las minoritarias no disminuyó y además algunas fueron representativas de un determinado momento de la fermentación. La sucesión de poblaciones observadas en nuestras fermentaciones también se ha observado en otros estudios (Frazier & Dubourdieu 1992; Schutz & Gafner 1993; Querol y col. 1994; Versavaud y col. 1995; Gutiérrez y col. 1997; Sabate y col. 1998, Lopes y col. 2002; Raspor y col. 2002; Martínez y col. 2004; Blanco y col. 2006).

### 1.7.1. Factores que afectaron a la diversidad y dinámica de las poblaciones en las fermentaciones espontáneas

Hemos observado que aunque la dinámica de las poblaciones fue similar en las dos vendimias estudiadas, la diversidad de cepas resultó ser algo mayor en el año 2000 detectándose, por tanto, nuevos patrones. Esto pudo ser debido, por un lado, a las variaciones en las **condiciones climáticas** de un año a otro (Longo y col. 1991) que pudieron provocar que la maduración de las uvas, y por tanto la **composición del mosto** fuese distinta en cada vendimia, desarrollándose, por tanto, durante la fermentación, nuevas cepas de levaduras, como se observó en la vendimia 2000, no detectadas en la vendimia de 1999. Se ha determinado que la variación en las concentraciones de nitrógeno asimilable en el mosto pueden producir un “efecto selectivo” sobre las cepas de *S. cerevisiae* (Granchi y col. 2003).

Sin embargo y coincidiendo con otros estudios realizados (Sabate y col. 1998) no parece que las distintas condiciones climáticas de cada año afectaran a la dinámica de las poblaciones en las dos vendimias analizadas.

Por otro lado, hemos comprobado que las operaciones de **recargas de mosto** en una misma vendimia sí que afectaron a la variabilidad de las cepas como se ha observado en el Depósito E de la vendimia 2000 (Figura 39), ya que éstas aumentaron. Se ha descrito que durante las primeras fases de la vinificación, tanto en el transporte de las uvas a la bodega como en el prensado, existe un aporte de cepas de *S. cerevisiae* nuevas al mosto (Demuyter y col. 2004; Le Jeune y col. 2006), aumentando o variando el número de cepas de levaduras detectadas tras las recargas. Suponemos que las recargas afectaron a la dinámica de las poblaciones, pero en una fermentación espontánea es difícil averiguarlo porque éstas van variando sustituyéndose unas por otras a medida que avanza la fermentación y va cambiando la composición del mosto, para implantarse las más adaptadas a esas condiciones (Martini 2003).

Además, se ha determinado la existencia de cepas indígenas en los ambientes de las bodegas y que llegan a estar presentes durante varios años, llamadas **cepas residentes** (Rosini 1984; Frezier & Dubourdieu 1992; Beltran y col. 2002). Estas cepas pueden encontrarse colonizando las superficies del equipamiento de la bodega (Vaughan-Martini & Martín 1995; Pretorius 2000; Beltran y col. 2002; Sabate y col. 2002; Sangorrin y col. 2002), pasando más tarde a formar parte de las fermentaciones espontáneas (Fleet & Heard 1993; Mortimer & Polsinelli 1999; Le Jeune y col. 2006). En nuestro estudio además de detectar un polimorfismo similar entre las poblaciones de las fermentaciones espontáneas, observamos la presencia de cepas comunes, las de patrones P1, P2, P3, P4, P5, P7, P9, P10, P13, P16, P17 y P18, aunque en distinta proporción en cada vendimia analizada. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que algunas de ellas pudieran ser residentes de la bodega, permaneciendo estables de un año a otro (Frezier & Dubourdieu 1992; Vezinhet y col. 1992). Aunque no descartamos la influencia de la composición del mosto en el aporte de estas cepas, además de otras con patrones nuevos como se ha comentado anteriormente, por lo que serían consideradas como cepas representativas de la zona de producción de vino estudiada.

La predominancia y permanencia de las cepas con patrones P2 y P5 en las fermentaciones espontáneas en los dos años estudiados, puede significar que además de ser cepas residentes del ambiente de la bodega sean cepas que están muy bien adaptadas a las condiciones de vinificación que en ella se dan, además de ser representativas de la zona enológica estudiada. La implicación que se deriva de estas observaciones es muy importante para la utilización de cepas de levaduras autóctonas en biotecnología (Nadal y col. 1996; Martini 2003), de hecho, dos de las cepas elegidas, para su utilización como cultivos iniciadores de las fermentaciones industriales pertenecieron a estos patrones.

## 2. Utilización de las cepas seleccionadas en condiciones industriales

Basándonos en los resultados obtenidos de los estudios microbiológico y molecular del apartado anterior seleccionamos tres cepas, de las cuatro elegidas al principio, para dirigir las fermentaciones en condiciones industriales (depósitos de 400.000 litros) durante cinco vendimias consecutivas, estudiando además la capacidad de implantación de éstas y analizando las características sensoriales del producto final en cada año. El hecho de inocular volúmenes tan grandes de mosto a partir de cepas de levaduras crecidas en placas Petri de medio YPD implicó la elaboración de un pie de cuba que tuvo dos fases de realización, una primera llevada a cabo en el laboratorio de Microbiología (UCA) y otra segunda, en los lagares de elaboración de la bodega, para así conseguir tener un volumen de cultivo iniciador suficiente para inocular los depósitos de fermentación. Tanto la elaboración del pie de cuba como el llenado de los depósitos hasta los 400.000 litros implicaron que se realizaran diversas operaciones de escalamientos u operaciones de recarga a volúmenes mayores de mosto.

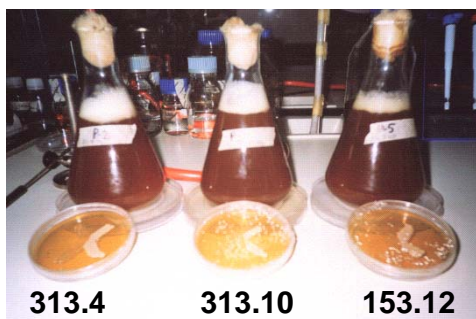
Las cepas autóctonas seleccionadas fueron 313.4 (P2), 313.10 (P3) y 153.12 (P5). El mosto utilizado para llevar a cabo las fermentaciones durante los cinco años fue mosto yema procedente en todo momento de la variedad de uva *Palomino Fino*, el cual fue corregido, una vez prensado, para dejar el pH en torno a 3,3-3,4.

El seguimiento de las cepas inoculadas, en los cinco años estudiados, se realizó una vez finalizadas las vendimias mediante la obtención del cariotipo electroforético de las colonias aisladas.

### 2.1. Vendimia 2001

En esta vendimia las dos fases de elaboración del pie de cuba se describen a continuación: (i) en la primera, cada una de las cepas, crecidas en placa de medio YPD, se inocularon en 500 mL de mosto previamente esterilizado en autoclave (126 °C, 20 minutos) dejándose fermentar durante dos días. Después, se realizó el primer

escalamiento a 2 litros de mosto estéril y posteriormente a 18 litros de mosto no estéril, aunque sí descongelado, utilizando para ello garrafas de 25 litros, teniendo en total 20 litros de pie de cuba de cada cepa.



**Figura 51.** Pie de cuba en 500 mL de cada una de las cepas utilizadas, 313.4, 313.10 y 153.12.

(ii) En la segunda fase, desarrollada en los lagares de elaboración, los tres cultivos puros de cada cepa se agitaron y mezclaron para adicionarlos a un volumen mayor de mosto. Las operaciones de escalamiento se detallan en la Figura 15. Es importante destacar que estas operaciones se realizaron cuando el mosto fermentado alcanzaba un grado Beaumé bajo, de manera que al adicionarlo al mosto fresco este quedaba parcialmente alcoholizado (4-8 % v/v aproximadamente), impidiendo así el desarrollo tanto de cepas no-*Saccharomyces*, como de otras indígenas que pudieran interferir en el desarrollo de las inoculadas. Además se controló la viabilidad de las células del pie de cuba diariamente. Se procuró que el inóculo que iba a ser adicionado al volumen de mosto fresco fuese al menos el 10% del volumen total a fermentar.

Para poder comprobar, una vez finalizada la vendimia, si las cepas inoculadas fueron las que llevaron a cabo el proceso de fermentación o no, se tomaron muestras diariamente (Tablas 5 y 6), tanto en el pie de cuba como de los depósitos de fermentación, que fueron glicerizadas al 20% y conservadas a -80 °C hasta su posterior procesamiento. De las muestras elegidas para analizar (señaladas en amarillo en las tablas) se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD, y de las más representativas se eligieron al azar 40 colonias totalmente aisladas.

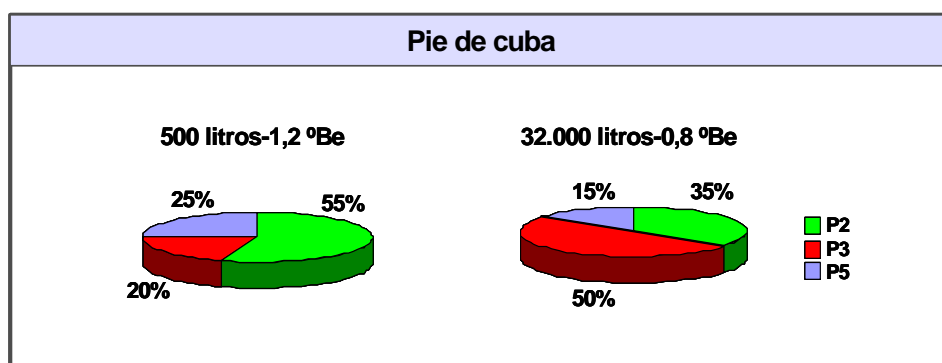
Del pie de cuba se analizaron 2 muestras, correspondientes a dos momentos distintos del escalamiento, y el cariotipo de un total de 40 cepas (20 cepas/muestra);

mientras que de los depósitos de fermentación se estudió la evolución de cuatro de ellos, B, E G y H, y un total de 423 cepas (40 cepas/muestra) mediante cariotipo electroforético. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Pie de cuba**

En la Figura 52 se observa que en los dos volúmenes analizados, 500 litros y 32.000 litros únicamente estuvieron presentes las tres cepas inoculadas, con cariotipos P2, P3 y P5, en distintas proporciones.

Cuando el pie de cuba tuvo un volumen de 32.000 litros y un grado Beaumé de 0,8, se repartió en tres depósitos de fermentación A, B y C que contenían mosto fresco, y después de 24 horas del comienzo de la fermentación se analizó la población de levaduras presente en esos depósitos (Figura 54). Se comprobó de nuevo la presencia de las tres cepas inoculadas, variando las proporciones de éstas en cada depósito. Sólo se detectó en el depósito B un 5% de cepas con un cariotipo distinto, P30, que no se volvieron a detectar tras analizar el resto de las muestras.



**Figura 52.** Resultados del análisis del cariotipo electroforético de 40 cepas (20 cepas/muestra). Se muestra el porcentaje de aparición de las cepas inoculadas 313.4, 313.10 y 153.12 con patrones P2, P3 y P5 respectivamente, en dos volúmenes distintos durante la elaboración del pie de cuba en la fase llevada a cabo en los lagares de elaboración de la bodega.

Cabe destacar que no se detectaron cepas no-*Saccharomyces* a pesar de ser muestras tomadas cuando el grado Beaumé era todavía alto, por ejemplo, 6,80 en el depósito A, 8,20 en el B y 6,20 en el C.

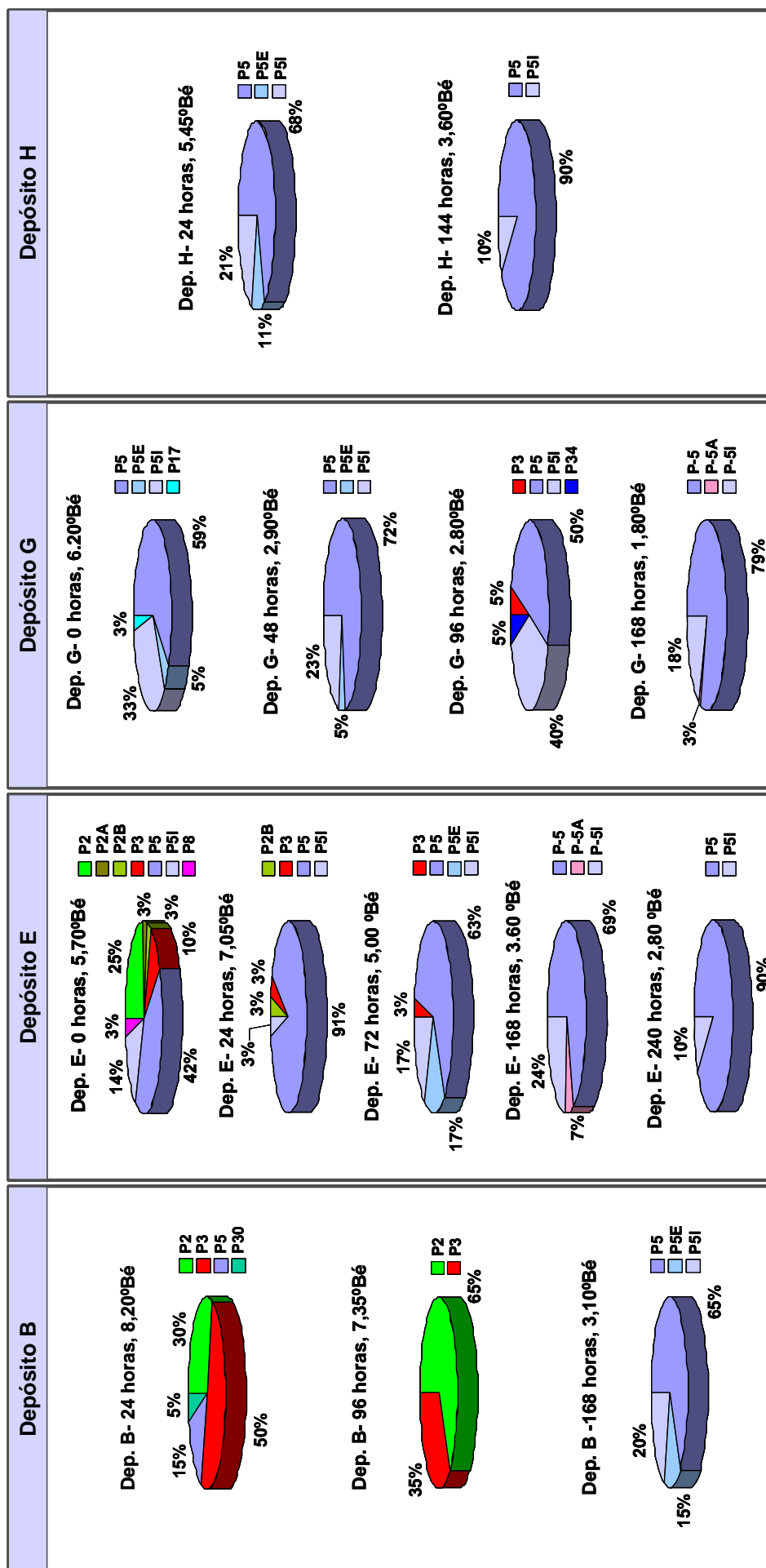
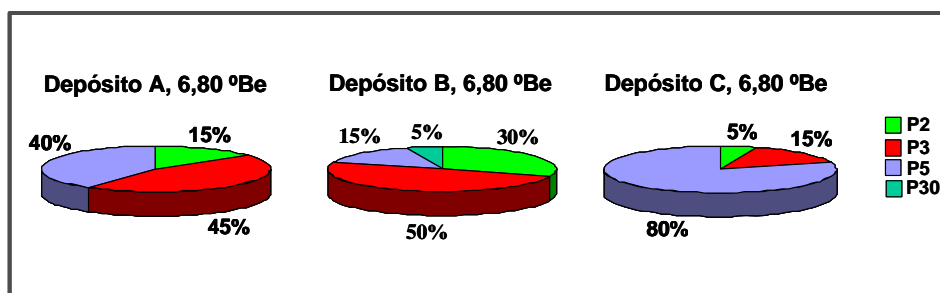


Figura 53. Porcentaje de cepas con distintos cariotipos detectados en las fermentaciones inoculadas con las cepas de patrones P2, P3 y P5 durante la vendimia 2001.



**Figura 54.** Resultados del análisis del cariotipo electroforético de muestras tomadas a las 24 horas después del comienzo de la fermentación, tras la adición del pie de cuba. Se observa la presencia de las cepas inoculadas (P2, P3 y P5) en las tres muestras analizadas, en distintas proporciones en cada depósito.

- **Depósitos de fermentación**

En las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos B, E, G y H se muestra una clara implantación de una de las cepas inoculadas, 153.12 con patrón P5; aunque en E, G y H desde aproximadamente el comienzo del proceso (Figura 53). Junto a ella también predominaron cepas con patrones P5.A, P5.E y P5.I (representadas en las gráficas con colores parecidos), llegándose a detectar las de cariotipo P5.I incluso en proporciones elevadas en algunos depósitos como por ejemplo en el B. En la Tabla 23 se muestran las proporciones de estas cepas hacia el final de la fermentación en los cuatro depósitos analizados.

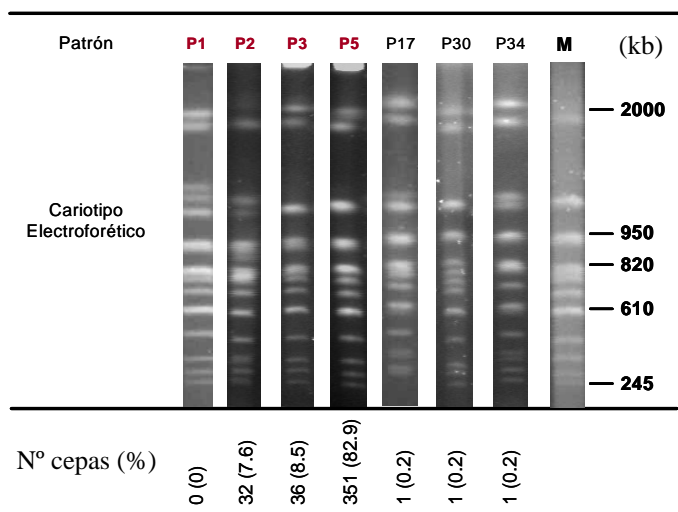
Depósito	Tiempo fermentación	°Be	% Cepas (Cariotipo)
Dep. B	168 horas	3,1	65% (P5)
			15% (P5.E)
			20% (P5.I)
Dep. E	240 horas	2,8	90% (P5)
			10% (P5.I)
Dep. G	168 horas	1,8	79% (P5)
			16% (P5.I)
			3% (P5.A)
Dep. H	144 horas	3,6	90% (P5)
			10% (P5.I)

**Tabla 23.** Porcentaje de cepas con cariotipos P5, P5.A, P5.E, P5.I, que fueron las que predominaron hacia el final de la fermentación en los cuatro depósitos estudiados. Se indica las horas a las que se tomaron las muestras desde el inicio de cada fermentación, así como el °Be.

Debido a la predominancia de una de las cepas inoculadas, el **polimorfismo** disminuyó drásticamente con respecto al detectado en las fermentaciones



espontáneas de las vendimias 1999 y 2000, detectándose un total de tres patrones cromosómicos además de los correspondientes a las cepas inoculadas (Figura 55).



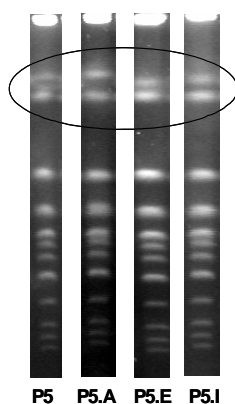
**Figura 55.** Cariotipos electroforéticos encontrados tras la caracterización molecular de las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2001. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (423), aunque no se ha incluido el cariotipo de las cepas no-*Saccharomyces*. P1, P2, P3 y P5 corresponden a los patrones de las cepas inoculadas, y M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

En todos los depósitos se observó una clara inhibición del crecimiento de cepas no-*Saccharomyces*, aunque en el depósito E se detectaron en un 3% (P8), si bien el °Beumé fue de 5,70. Esto pudo ser debido a que la muestra se tomó justo después de adicionar mosto fermentando a un determinado volumen de mosto fresco. De esta forma el contenido de azúcar fue bajo porque el medio quedó parcialmente alcoholizado pero como no había comenzado la fermentación se pudieron detectar estas levaduras, seguramente presentes en el mosto fresco. El 3% detectado correspondió a un solo aislamiento que mostró el patrón P8.5 ya caracterizado en las dos vendimias anteriores. Estas levaduras fueron desplazadas por las cepas inoculadas.

En lo referente a las **recargas de mosto** que se realizaron hasta completar el volumen final de fermentación (400.000 litros), en la Tabla 6 se observa que en el depósito E se hicieron pequeñas recargas después de las 120, 144, 192 y 216 horas del comienzo del proceso, hecho que se pone de manifiesto por el aumento del °Be. Estas operaciones no tuvieron ninguna implicación sobre la predominancia de la cepa inoculada con patrón P5. El hecho de que las operaciones de recarga no afectaran a la permanencia de la cepa 153.12, es indicativo de que esta cepa tiene una buena capacidad de implantación en fermentaciones industriales y que está perfectamente adaptada a las condiciones del proceso.

En el depósito G, aunque predominó la cepa inoculada con patrón P5, a las 96 horas, tras una recarga de mosto se detectó un 5% de cepas con un cariotipo nuevo P34, no detectado en las vendimias anteriores. Observamos en este caso que la adición de mosto fresco puede aportar nuevas cepas indígenas a la población existente. En este caso estas cepas fueron desplazadas por la inoculada predominante, no volviéndose a detectar en la siguiente muestra analizada a las 168 horas.

En cuanto a las cepas con patrones P5.A, P5.E y P5.I, que estuvieron presentes durante las fermentaciones en los cuatro depósitos analizados, cabe destacar que éstos fueron muy similares al patrón P5 de la cepa inoculada 153.12, presentando las diferencias que se muestran en la Figura 56. De manera que el patrón P5.A se diferenció de los demás en que las dos bandas superiores en el gel, tras la electroforesis, aparecieron más separadas que las de P5; las de P5.E estuvieron más próximas y las de P5.I fueron iguales a las de P5, pero ninguno de los tres cariotipos presentó la banda del centro típica de P5.



**Figura 56.** Cariotipo de la cepa inoculada, P5 y los similares a éste P5.A, P5.E y P5.I detectados durante las fermentaciones de la vendimia 2001. Se indica con un círculo la zona del cariotipo donde presentaron las diferencias.

Aunque el cariotipo es un buen indicador del grado de proximidad genética entre cepas, para comprobarlo se analizaron los RFLPs del ADN mitocondrial con tres enzimas, *Hinf I* (H), *Rsa I* (R) y *Alu I* (A), resultando que las 4 cepas tuvieron el mismo patrón de restricción que llamamos H1R1A, siendo por lo tanto cepas estrechamente relacionadas. En el apartado 4 de los resultados de la tesis se hará un estudio más detallado sobre estas observaciones.

Además se observó que ninguno de los clones con cariotipos similares desplazó a la cepa inoculada con cariotipo P5.

En cuanto a las otras dos cepas inoculadas, las de patrones P2 y P3, se detectaron en las muestras tomadas del pie de cuba en proporciones elevadas (Figura 52), en 500 litros 55% de P2 y 20 % de P3, y en 32.000 litros 35% de P2 y 50% de P3. También se detectaron en los depósitos A, B y C a las 24 horas del comienzo de la fermentación (Figura 54), y en menor proporción en el depósito E a las 0 y 24 horas. Pero estas cepas fueron desplazadas para implantarse las de patrón P5, como se ha expuesto anteriormente.

Podemos concluir diciendo que de las tres cepas inoculadas, la que mostró mejor capacidad de implantación en condiciones industriales fue la de patrón P5.

Los análisis sensoriales del vino, realizados por personal de la bodega especializado en catas revelaron que en el depósito G se obtuvo un producto con las mejores características organolépticas, siendo precisamente en este depósito donde hubo una clara implantación de la cepa con cariotipo P5 desde el comienzo de la fermentación. Y en general el vino obtenido de todas las fermentaciones fue calificado como excelente, siendo un vino redondo, muy perfumado, largo y persistente. Es decir, que tuvo unas propiedades organolépticas bastante mejoradas con respecto a los vinos obtenidos tras las fermentaciones espontáneas en vendimias anteriores. Estas características fueron además muy similares a las observadas en el vino del **experimento 2** llevado a cabo en la vendimia anterior (año 2000) donde las cepas que predominaron fueron las de cariotipo P2 y P5.

### 2.1.1. Micro-Fermentaciones puras

Llegados a este punto y observando el comportamiento, desde el punto de vista de la implantación de las cepas seleccionadas en las fermentaciones industriales, así como la detección de otras en porcentajes significativos, nos planteamos hacer una nueva selección de cepas para ser utilizadas en la siguiente vendimia.

De manera que se decidió aplicar un **nuevo criterio de selección** y realizar, mediante micro-fermentaciones puras, un análisis de las propiedades organolépticas de las siguientes cepas: las seleccionadas inicialmente 313.4, 313.10 y 153.12 con cariotipos P2, P3 y P5 respectivamente; dos nuevas, detectadas en esta vendimia que fueron 168.12 y 48.5 con cariotipos P5.A y P5.I, respectivamente; y una comercial llamada Fermivin que nos sirvió de control. El estudio se realizó por duplicado en volúmenes finales de 900 mL de mosto natural esterilizado en condiciones suaves 100 °C, 30 min. Este volumen se inoculó al 4 % con un pie de cuba realizado con cada una de las cepas elegidas, como se detalla en el apartado 5 de materiales y métodos de la Tesis.

Los análisis sensoriales de cada micro-fermentación se realizaron en la primera fase de cada fermentación, pasados tres días tras la inoculación con el pie de cuba, y fueron llevados a cabo por personal de la bodega especializado en catas. Las valoraciones para cada fermentación se muestran en la Tabla 24.

Cepas	°Be	pH	Cracterísticas organolépticas
313.4 (1)	9,35	3,36	Aroma afrutado a manzana. Sabor azucarado a melocotón
313.10 (1)	9,89	3,37	Aroma menos afrutado que recordaba a la masa del pan. Sabor menos afrutado que en el caso anterior
153.12 (1)	7,55	3,31	Aroma característico del vino en estudio, pero con matices más tropicales que los casos anteriores
168.12 (1)	8	3,36	Aroma parecido al caso de la cepa 153.12, pero el carácter afrutado no fue tan intenso
48.5 (1)	7,5	3,32	Aroma también muy parecido al de la cepa 153.12, pero más afrutado, fue el que más gustó
Fermivin (2)	7,2	3,32	Aromas no característicos al los del vino en estudio y no tan afrutados

**Tabla 24.** Valoraciones organolépticas de las micro-fermentaciones puras, llevadas a cabo por personal de la bodega especializado en catas. Se indica entre paréntesis el duplicado de cada micro-fermentación.

Una vez que las fermentaciones finalizaron, cuando el °Be llegó hasta cero y dejó de observarse desprendimiento de CO<sub>2</sub>, se determinó el poder fermentativo que mostró cada una de las cepas en esas condiciones de fermentación.

## Poder fermentativo

Para llevar a cabo las micro-fermentaciones, se partió de mosto natural con un contenido en azúcar de 276 g/L. Tras la finalización de las fermentaciones se midió para cada ensayo y para cada cepa el contenido de azúcar residual según el método oficial de la OIV (Tabla 25).

Haciendo la diferencia entre el contenido de azúcar inicial en el mosto natural y los valores de azúcar residual en cada fermentación, se obtuvo la cantidad de azúcar que llegó a metabolizar cada cepa o poder fermentativo.

Cepas	Azúcar residual (g/L)		Poder fermentativo (g/L)	
	Ensayo (1)	Ensayo (2)	Ensayo (1)	Ensayo (2)
<b>313.4 (P2)</b>	5,76	6,69	270,24	269,04
<b>313.10 (P3)</b>	3,6	8,4	272,4	267,6
<b>153.12 (P5)</b>	3,12	3,6	272,88	272,4
<b>168.12 (P5A)</b>	3,6	5,04	272,4	270,96
<b>48.5 (P5I)</b>	3,6	2,64	272,4	273,36
<b>Fermivin</b>	2,88	2,88	273,12	273,12

**Tabla 25.** Valores del azúcar residual expresados en gramos/litro en cada micro-fermentación pura, y poder fermentativo para cada cepa. Los ensayos 1 y 2 se refieren a los duplicados.

Tomando como referencia la cepa comercial Fermivin, con un poder fermentativo de 273,12 g/L se pudo afirmar que, en general, las 5 cepas autóctonas presentaron un poder fermentativo similar y comparable al de la comercial. La cepa que más azúcar dejó en el mosto fue la 313.4, teniendo 5,76 en el ensayo (1) y 6,96 g/L en el (2).

### 2.1.2. Estudio del factor killer

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las fermentaciones de esta vendimia, en los que se mostró el predominio de la cepa inoculada con patrón P5, se analizó nuevamente el carácter killer de esta cepa, de las otras dos inoculadas con patrones P2 y P3, así como de dos de las detectadas en las fermentaciones de esta vendimia 168.12 y 48.5 con patrones P5.A y P5.I, respectivamente. Además, teniendo en cuenta que, por ejemplo en el depósito G las cepas más abundantes

fueron aquéllas que mostraron el patrón P5, se analizó el fenotipo killer de 5 cepas de las aisladas a las 0, 48, 96 y 168 horas de la fermentación en este depósito y que presentaron este patrón, para comprobar si las cepas derivadas de la inoculada 153.12 seguían manteniendo este carácter.

Para llevar a cabo el estudio, se prepararon 2 placas de Petri con medio MBM; en una se sembró a modo de césped una cepa sensible, 5X47 ( $k_0$ ), y en otra un césped con una cepa matadora 1101 productora de la toxina  $k_1$ . Pero además se sembró en otra placa un césped con la cepa inoculada de patrón P5 (153.12), también con fenotipo matador, para observar el comportamiento de las otras cepas autóctonas frente a ella. Las tres cepas fueron previamente crecidas en medio líquido YPD durante 48 horas antes de ser sembradas a modo de césped.

Las cepas a estudiar se sembraron en forma de estría sobre los céspedes, una vez que estuvieron secos, utilizándose además las cepas 5X47 y 1101 como controles, dejándose las placas en incubación durante 3-4 días a 23 °C.

Con los resultados obtenidos, se comprobó que las cepas 313.4 (P2), 313.10 (P3), 168.12 (P5.A) y 48.5 (P5.I) presentaron carácter killer, ya que sobre el césped de la cepa sensible crecieron y presentaron halo de inhibición; y fueron neutras con respecto a la cepa 153.12 (P5), es decir, que en un césped realizado con la cepa 153.12, las cepas en estudio crecieron pero no formaron halo de inhibición. Esto podría explicar, en parte, que las cepas con patrones P5.I, detectadas en proporciones significativas en los depósitos analizados, no desplazaran a la inoculada durante la fermentación.

En cuanto a las cepas aisladas del depósito G, que fueron sembradas sobre el césped sensible de la cepa 5X47 y sobre el de la cepa 1101, se comprobó que de los 20 aislamientos estudiados el 10% perdieron el carácter matador, siendo 5% neutras y 5% sensibles, manteniendo el 90 % el fenotipo killer.

### 2.1.3. Nueva selección de cepas autóctonas

Teniendo en cuenta (i) los resultados obtenidos de la caracterización molecular de las fermentaciones industriales, (ii) las características sensoriales de las cepas autóctonas obtenidas a partir de los ensayos de micro-fermentaciones puras, y (iii) los resultados del estudio del factor killer, se concluyó que la cepa 48.5 con patrón molecular P5.I era una buena candidata para ser utilizada en fermentaciones inoculadas, ya que se detectó durante las fermentaciones en proporciones altas junto con la inoculada de patrón P5; presentó unas características organolépticas acordes con el vino producido, es decir que presentó matices afrutados, deseados en la elaboración de vinos jóvenes; y mostró fenotipo killer.

Por tanto se realizó una nueva selección de cepas para ser utilizadas en la vendimia siguiente, incluyéndose la cepa 48.5, que además presentó un poder fermentativo comparable al resto de las cepas autóctonas. La cepa 313.10 fue descartada ya que en los análisis sensoriales realizados a partir de las microvinificaciones puras proporcionó un aroma más parecido al pan que al vino, sin presentar matices afrutados.

Por consiguiente las cepas que se utilizaron en la vendimia de 2002 para iniciar y dirigir las fermentaciones industriales fueron: 313.4 (P2), 153.12 (P5) y 48.5 (P5I).

## 2.2. Vendimia 2002

Esta vendimia comenzó también con la elaboración del pie de cuba. En la primera fase, que tuvo lugar en el laboratorio de Microbiología (UCA) en condiciones muy controladas, cada cepa se inoculó primero en 500 mL de mosto esterilizado en autoclave (126 °C, 20 min.) a partir de biomasa crecida en medio sólido YPD. A los dos días, los tres pies de cuba se escalaron a 2 litros, también esterilizados en las mismas condiciones que el volumen anterior; y por último después de tres días se escalaron a 18 litros de mosto no estéril pero sí descongelado para tener un volumen final de 20 litros de cada cepa.

En la segunda fase de elaboración, llevada a cabo en los lagares de elaboración de la bodega, los tres pies de cuba se agitaron y mezclaron llevándose hasta un volumen de 1.000 litros. Posteriormente se realizaron escalamientos a volúmenes mayores de manera que el inóculo constituyó aproximadamente un 10% del volumen total a fermentar. Antes de realizar los escalamientos se procuró que el grado Beaumè fuera lo más bajo posible y se controló el porcentaje de células vivas/mL antes de cada inoculación. Las operaciones de los escalamientos realizados se detallan en la Figura 16. El volumen de pie de cuba final se utilizó para iniciar las fermentaciones en los depósitos, en los cuales se fueron realizando recargas de mosto fresco hasta completar el volumen final a fermentar, 400.000 litros.

Durante la segunda fase de la elaboración del pie de cuba, se observó que hubo un descenso acusado del número de células vivas que se relacionó con una bajada de la temperatura del fermentador (Tabla 7), provocada por el enfriamiento de la camisa de agua que rodea al depósito.

Diariamente se tomaron muestras tanto del pie de cuba como de los depósitos hasta la finalización de todas las fermentaciones (Tablas 7 y 8). Las muestras se glicerizaron al 20% y se conservaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Se analizaron 6 muestras pertenecientes al pie de cuba, y 6 de los fermentadores, haciéndose de cada muestra (señaladas en amarillo en las tablas) diluciones que se sembraron en placas de Petri con medio YPD, eligiéndose de las más representativas 40 colonias al azar totalmente aisladas para su estudio mediante *Electroforesis en Campo Pulsante*.

- **Pie de cuba**

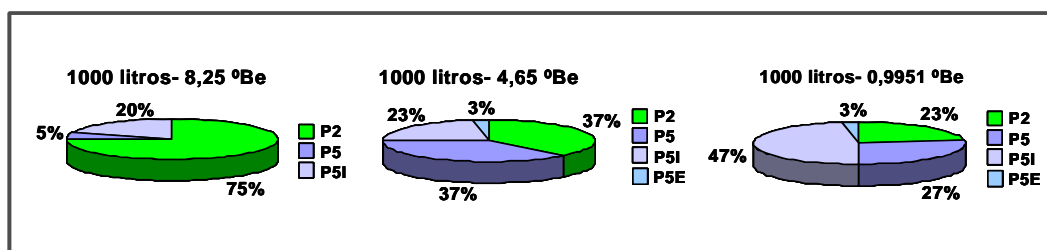
Se analizó el cariotipo electroforético de un total de 174 cepas que pertenecieron a tres momentos distintos del escalamiento, cuando el pie de cuba se encontraba en un volumen de 1.000 litros, en 3.750, y en 18.500 litros.



## (a) Pie de cuba, 1.000 litros

Se estudió el cariotipo de 40 cepas/muestra observándose que durante la fermentación hubo una clara implantación de las tres cepas inoculadas. Estas fueron detectadas en distintas proporciones, de manera que con un contenido de azúcar alto (8,25 °Be) la que predominó fue la de patrón P2 y al finalizar la fermentación las que controlaron el proceso fueron las de patrón P5 y P5.I.

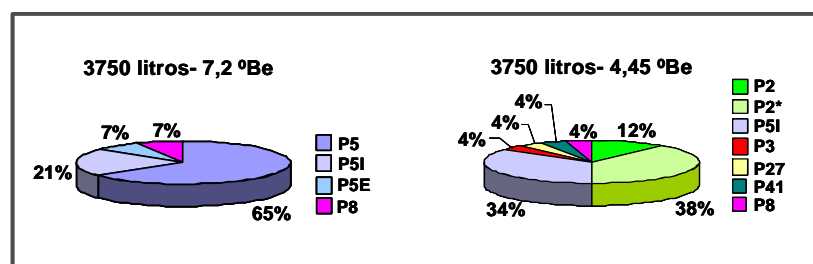
Hay que destacar que en la primera muestra, que fue inoculada con la mezcla de los tres pies de cuba puros cuando se encontraban fermentando en 20 litros, no se detectaron cepas no-*Saccharomyces* lo cual fue indicativo del buen estado de los tres inóculos (alto porcentaje de viabilidad) ya que fueron capaces de adaptarse rápidamente a las condiciones del medio, evitando el desarrollo de otras cepas indígenas presentes en el mosto fresco.



**Figura 57.** Porcentaje de las cepas inoculadas con patrones P2, P5 y P5.I presentes durante la fermentación del pie de cuba en 1.000 litros. No se realizaron recargas de mosto fresco entre la primera y última muestra. Se analizó el cariotipo de 40 cepas/muestra.

## (b) Pie de cuba, 3.750 litros

En la primera muestra analizada, cuando el pie de cuba tuvo un °Be de 7,2 se observó una clara implantación de dos de las cepas inoculadas, las de patrón P5 y P5.I, no detectándose las de patrón P2. Se observó un 7% de cepas con patrón P5.E similar a P5 y P5.I. Además, se detectaron cepas no-*Saccharomyces*, P8, aunque en baja proporción (7%), que en cierto modo pudo ser normal ya que la muestra analizada fue tomada tras la realización de un escalamiento a mosto fresco. El patrón específico que mostraron estas levaduras fue P8.3, observado en la vendimia 2000.



**Figura 58.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos de dos muestras tomadas del pie de cuba en distintos estados de la fermentación. En la primera muestra se analizó el cariotipo electroforético de 26 aislamientos y en la segunda muestra de 14. P2, P5 y P5.I correspondieron a los cariotipos de las cepas inoculadas.

Entre estas dos muestras fue cuando se detectó una disminución de la temperatura del fermentador. Este hecho se puso de manifiesto tras el análisis de la muestra siguiente, con 4,45 °Be, en la cual ya no se observó el predominio de las cepas inoculadas como en la muestra anterior, apareciendo cepas minoritarias como las de patrón P3 y P27 caracterizadas en la vendimia 2000, además de las de patrón P41 nuevas de esta vendimia. Todas ellas estuvieron presentes en un 4%, lo cual significó que cada uno de estos patrones fue representativo de un único aislamiento realizado en ésta muestra. Además se detectó en un 38% cepas con un cariotipo similar al de la cepa inoculada con patrón P2 que llamamos P2\* tampoco detectado anteriormente.

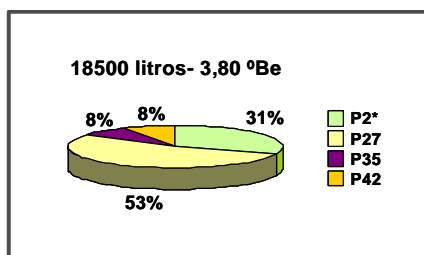
En cuanto a las cepas no-*Saccharomyces* (P8), fueron detectadas también en una proporción baja, y correspondieron a un patrón específico nuevo, P8.12. La presencia de estas levaduras en esta segunda muestra posiblemente fue debida a la baja temperatura la cual favoreció su desarrollo.

A partir de la muestra con 4,45 °Be se realizó el siguiente escalamiento a un volumen mayor de mosto, 18.500 litros.

(c) Pie de cuba, 18.500 litros

En este volumen del pie de cuba se observó que hubo un cambio en la población de levaduras, siendo las cepas predominantes aquéllas con patrón P27

(53%). No se detectaron las cepas inoculadas, aunque siguió habiendo un 31% de cepas con cariotipo P2\*.



**Figura 59.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos detectadas en la fermentación de 18.500 litros de pie de cuba. Se analizó el cariotipo electroforético de 14 aislamientos.

Es probable que la disminución de la temperatura provocase la disminución en la viabilidad de las levaduras inoculadas favoreciendo el desarrollo de otras cepas indígenas como las de patrón P27. Además la adición de mosto fresco, para realizar el escalamiento, pudo haber contribuido al cambio observado en las poblaciones de levaduras.

- **Depósitos de fermentación**

Se analizaron un total de 174 cepas mediante cariotipo electroforético aisladas de 6 muestras tomadas de tres depósitos, A y E, cuando tuvieron un grado Baumé entorno a 4; y B, en distintos momentos de la fermentación desde el inicio hasta que ésta hubo finalizado.

En general, en los tres depósitos estudiados (Figuras 60 y 61) se observó un claro predominio de cepas con patrón P27 seguidas de las de patrón P35. En pequeña proporción se detectó una de las cepas inoculadas, la de cariotipo P5.I en la última muestra analizada del depósito B (0,9932 °Be), y cepas que mostraron el patrón P2\*, similar a P2. Se observó también que junto a las predominantes existía una población de cepas minoritarias con patrones P38, P41, P42, P18, P1, P36, P40, P37 y P39, de las cuales las de cariotipos P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41 y P42 no fueron detectadas en vendimias anteriores.

El hecho de no detectar a las cepas inoculadas no significó que no estuvieran presentes, y posiblemente tuvieron una cierta influencia a la hora de que se

seleccionaran las cepas que detectamos de forma mayoritaria. Además las cepas que se implantaron fueron capaces de desplazar a las cepas no-*Saccharomyces* que no se detectaron en ninguno de los depósitos analizados.

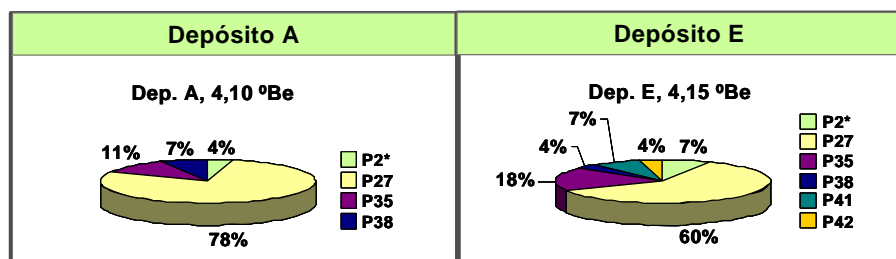


Figura 60. Porcentaje de cepas con distintos cariotipos presentes en dos muestras de distintos depósitos que presentaron un °Be similar.

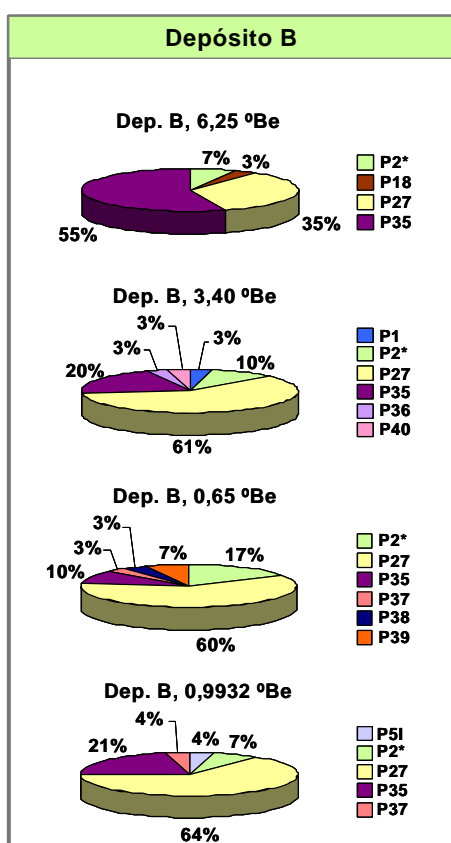
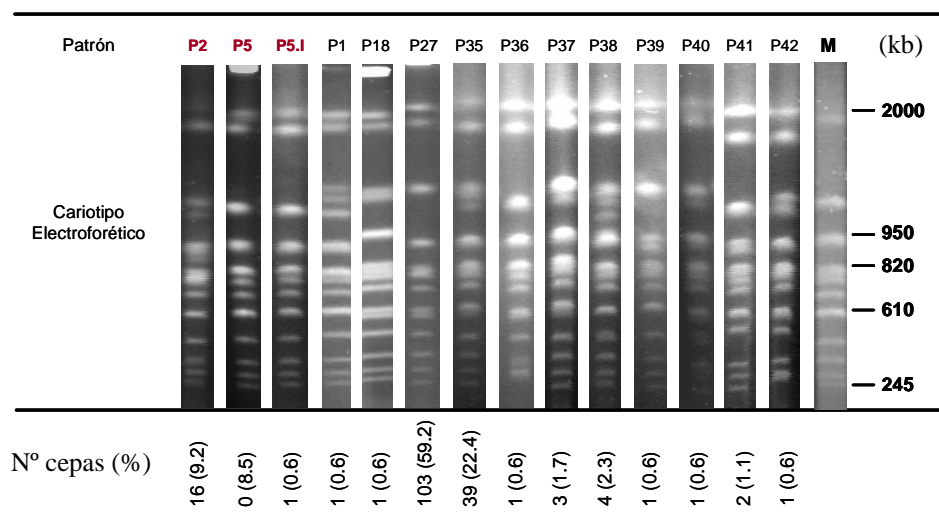


Figura 61. Porcentaje de cepas con distintos cariotipos presentes durante la fermentación llevada a cabo en el depósito B.

Aunque en las fermentaciones se implantaron otras cepas autóctonas distintas a las inoculadas, el **polimorfismo cromosómico** fue más bajo que en el caso de las fermentaciones espontáneas, detectándose un total de 11 patrones distintos además de los pertenecientes a las cepas inoculadas (Figura 62).

En cuanto al efecto de las **recargas de mosto** en los depósitos, en el B se realizaron dos recargas entre las muestras analizadas (Tabla 8), una cuando el °Be fue de 0,9979 y otra cuando fue de 0,65. Ninguna de estas operaciones afectó a la predominancia de las cepas con cariotipos P27 y P35 como se observa en las dos últimas muestras analizadas (Figura 61), pero sí se observó que a partir de la primera recarga aparecieron cepas con dos de los cariotipos nuevos, P37 y P39.

Los análisis del cariotipo electroforético, realizados durante todo el proceso de fermentación tanto en el pie de cuba como en los depósitos, fueron relevantes para mostrar cómo la variación de la temperatura en un momento determinado hizo cambiar la dinámica de las poblaciones de levaduras, observándose que las cepas que predominaban hasta ese momento fueron desplazadas por otras que posteriormente fueron las que llevaron a cabo el control del proceso de fermentación, es decir las de patrones P27 y P35. Además se podría pensar que la cepa con patrón P27, que fue minoritaria en la vendimia 1999 y 2000, estuviera mejor adaptada a las condiciones del mosto (composición química) en esta vendimia.



**Figura 62.** Cariotipos electroforéticos encontrados tras la caracterización molecular de las fermentaciones realizadas en los depósitos. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (174). P2, P5 y P5.I corresponden a los patrones de las cepas inoculadas, y M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

Los análisis organolépticos, llevados a cabo por personal de la bodega especializado en catas, revelaron que el vino producido en esta vendimia tuvo unas características sensoriales buenas, aunque no tan destacadas como en la vendimia de 2001. El vino fue suave, fresco, delicado, con aromas de flor de eucalipto y laurel.

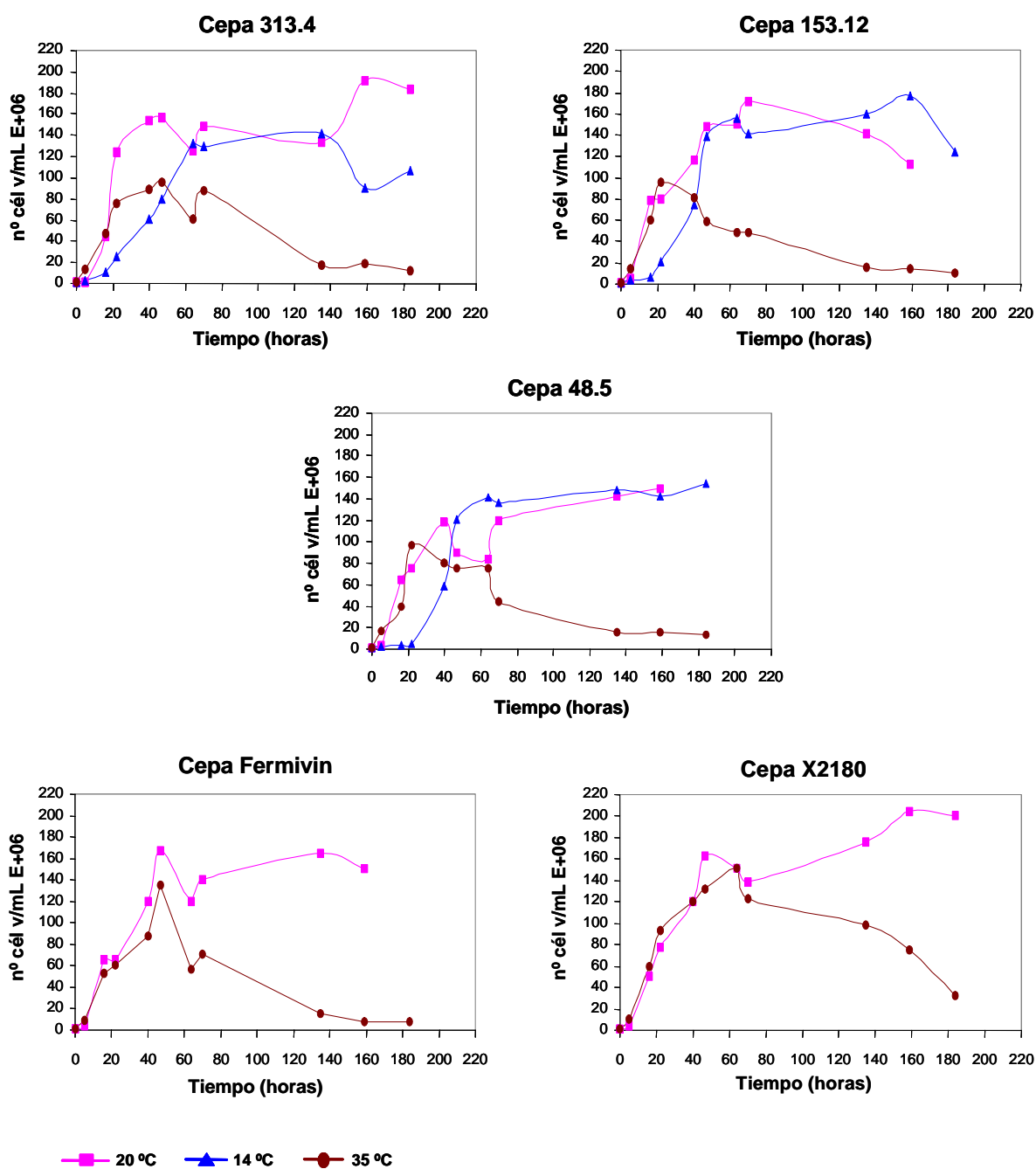
### **2.2.1. Estudio de la influencia de la temperatura en las cepas autóctonas seleccionadas**

En esta vendimia se ha puesto de manifiesto que la bajada de la temperatura puede influir directamente sobre las poblaciones de las levaduras que están llevando a cabo la fermentación, provocando con ello un cambio en la dinámica de éstas y haciendo que sean otras cepas autóctonas las que finalmente lleven a cabo el control del proceso.

Para comprobar cómo afecta la temperatura a las cepas seleccionadas, se llevaron a cabo, por triplicado, micro-fermentaciones en 250 mL de mosto sintético con cada una de las cepas seleccionadas a distintas temperaturas, 14, 20 y 35 °C. Para iniciar las fermentaciones se inoculó de cada cepa  $1 \times 10^6$  células vivas/mL, midiéndose el °Be cada cierto tiempo para controlar el avance de las fermentaciones. Para determinar la curva de crecimiento, se midió el número de células vivas/mL, desde la inoculación hasta casi la finalización de cada fermentación, utilizando el método del “*azul de metileno*”. Se estudió por tanto el efecto de estas temperaturas sobre la curva de crecimiento de las cepas autóctonas 313.4, 153.12 y 48.5. Además se analizó también el efecto de dos temperaturas, 20 y 35 °, sobre dicha curva para la cepa comercial Fermivin y otra de laboratorio diploide, X2180. Al finalizar las fermentaciones también se midió el grado alcohólico (% v/v).

En la Figura 63, se representan las curvas de crecimiento para cada cepa con las tres temperaturas estudiadas, observándose que en todas las cepas las curvas presentaron las fases típicas de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte y que la duración de éstas varió según la temperatura. En las gráficas, cada valor representado corresponde a la media de las determinaciones realizadas de las tres fermentaciones llevadas a cabo en paralelo, excepto para el caso de las cepas 313.4, 153.12 y 48.5 a 20 °C que se hicieron por duplicado.

Las medias así como las desviaciones típicas, tanto de las determinaciones del número de células vivas/mL como del °Be se representan en las Tablas 27 y 28.



**Figura 63.** Curvas de crecimiento para cada cepa a distintas temperaturas. En cada una se representa el número de células vivas/mL frente al tiempo (horas).

En las curvas de crecimiento de la Figura 63 se observa que existen valores que se desvían de la curva teórica, lo cual fue debido al error que conlleva el método utilizado para medir la viabilidad celular.

En general, en el caso de las cepas 313.4, 153.12 y 48.5, para la temperatura de 14 °C la fase de latencia fue más larga que para 20 °C. En el caso de las cepas 153.12 y 48.5 se observó a las 16 y 22 horas, tras el comienzo de la fermentación, que el número de células muertas fue mucho mayor que en el caso de la cepa 313.4, sin embargo cuando se alcanzó la fase estacionaria, a las 64 horas en el caso de la cepa 313.4 el número máximo de células vivas/mL que se llegó a alcanzar ( $132 \times 10^6$ ) fue menor que para las cepas 153.12 ( $156 \times 10^6$ ) y 48.5 ( $141 \times 10^6$ ).

Por tanto podemos decir que la temperatura de 14 °C sí que afectó a la viabilidad de las cepas seleccionadas al comienzo de la fermentación. Con lo cual consideramos el inicio de la fermentación como un momento crítico que hay que controlar sobre todo en un proceso industrial llevado a cabo a esta temperatura o inferior, ya que el mosto no está estéril y supone una fuente en el aporte de cepas silvestres. En general la fase estacionaria fue similar a 14 °C y a 20 °C.

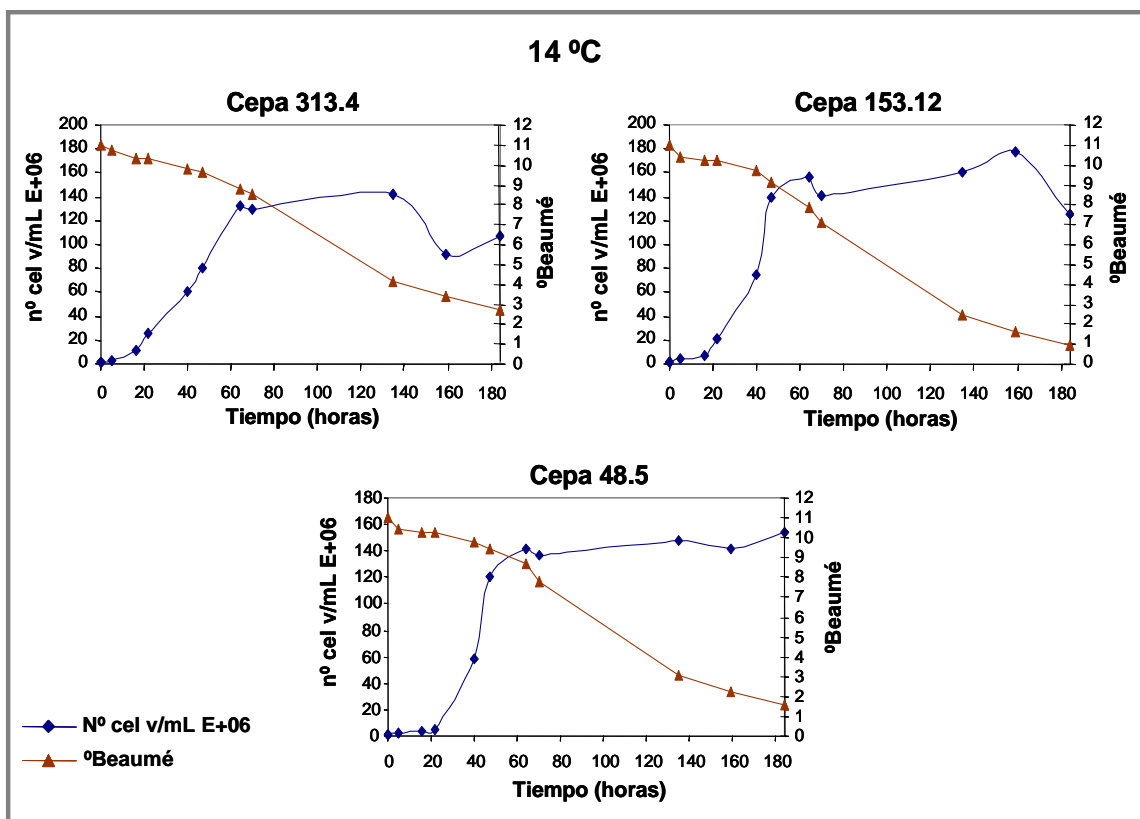
A 35 °C las cepas comenzaron a fermentar rápidamente siendo la fase de latencia más corta que incluso a 20 °C, pero la fase estacionaria en todos los casos fue muy corta presentando un pico de máxima población que no llegó a superar a la población que se alcanzó a 20 y 14 °C; después las células entraron en la fase de muerte, comenzando a morir a las 80 horas del inicio de las fermentaciones. Se observó que a 35 °C la cepa de laboratorio X2180 mantuvo una población celular viva más alta durante más tiempo que el resto de las cepas, lo cual se refleja en el grado alcohólico obtenido que fue mayor que en los otros casos (Tabla 26).

Además, se analizaron las curvas de crecimiento independientemente para cada cepa y temperatura teniendo en cuenta los azúcares consumidos, es decir que se representó el número de células vivas/mL frente al grado Beaumé del mosto utilizado. En el caso de las fermentaciones a 14 ° y 35 °C se partió de mosto sintético que contenía 11 °Be, y en el caso de 20 °C de un mosto con 10,5 °Be. Los resultados se muestran en las Figuras 64, 65 y 66.

A 14 °C se observó que a las 184 horas del comienzo de las fermentaciones, ninguna de las tres cepas estudiadas llegó a consumir totalmente los azúcares, siendo por tanto fermentaciones más largas que en el caso de 20 °C. El grado alcohólico que



se alcanzó para las cepas 153.12 y 48.5 fue mayor que para la cepa 313.4 debido a que el número de células vivas en el caso de estas cepas a las 184 horas fue mayor que para 313.4.



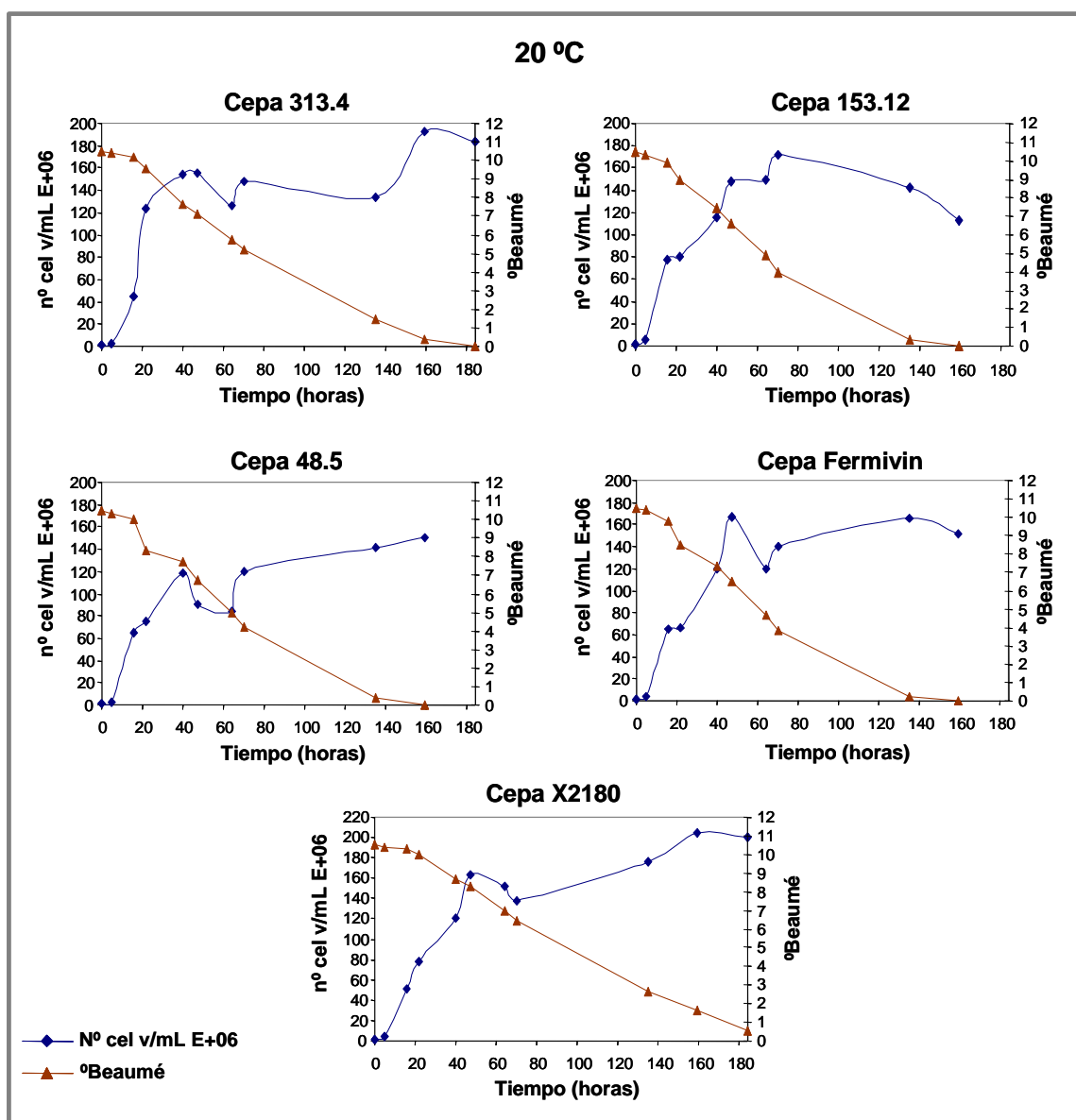
**Figura 64.** Curvas de crecimiento a 14 °C, obtenidas de las micro- fermentaciones llevadas a cabo en 250 mL de mosto sintético para las cepas autóctonas 313.4, 153.12 y 48.5. Se representa la evolución de cada fermentación mediante el consumo de azúcar medido en °Be.

Cepas	Grado Alcohólico % v/v		
	14 °C	20 °C	35 °C
313.4	8	10,45	7,8
153.12	9,2	10,45	7,2
48.5	8,6	9,6	7,1
Fermivin		9,45	7,3
X2180		10,4	8

**Tabla 26.** Grado alcohólico obtenido tras las fermentaciones realizadas con cada cepa a las temperaturas ensayadas.

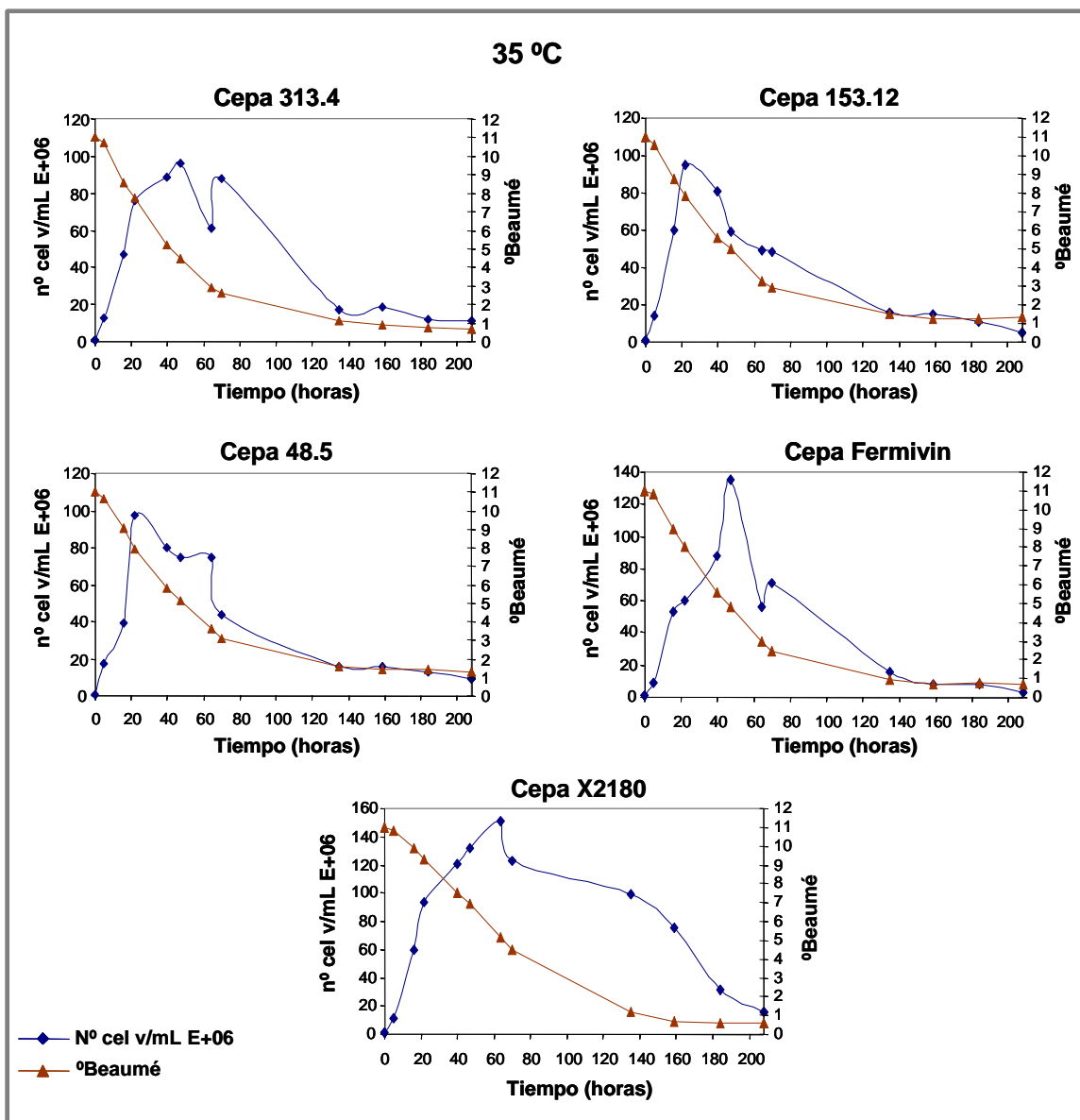
En el caso de las fermentaciones a 20 °C, las cepas 153.12, 48.5 y la comercial Fermivin finalizaron el proceso a las 160 horas, llegando el °Beaumé a

cero. La fermentación más larga fue para la cepa 313.4 que a las 184 horas fue cuando alcanzó 0 °Beaumé. La cepa de laboratorio X2180 fue la que presentó la fermentación más larga y a las 184 horas todavía no llegó a consumir los azúcares, además mantuvo el número de células vivas más alto que para el resto de las cepas. El grado alcohólico que se alcanzó a 20 °C para todas las cepas fue mayor que a 14 °C, y las cepas que más alcohol generaron fueron las autóctonas seleccionadas 313.4 y 153.12 seguidas de la cepa de laboratorio.



**Figura 65.** Curvas de crecimiento a 20 °C obtenidas de las micro-fermentaciones llevadas a cabo en 250 mL de mosto sintético para las tres cepas autóctonas 313.4, 153.12 y 48.5, la comercial Fermivin y la de laboratorio X2180. Se representa la evolución de cada fermentación mediante el consumo de azúcar medido en °Be.

A 35 °C, a las 200 horas del comienzo de la fermentación, en ninguno de los casos se llegaron a consumir los azúcares totalmente estando la población celular prácticamente muerta. El grado alcohólico alcanzado por cada cepa fue menor que para 14 y 20 °C. Parece evidente el efecto tóxico producido por la temperatura y el alcohol sobre las levaduras estudiadas.



**Figura 66.** Curvas de crecimiento a 35 °C obtenidas de las micro-fermentaciones llevadas a cabo en 250 mL de mosto sintético para las tres cepas autóctonas, la comercial Fremivin y la de laboratorio X2180. Se representa la evolución de cada fermentación mediante el consumo de azúcar medido en °Be.

Comprobamos que la temperatura en torno a 20 °C es la idónea para fermentar con las cepas de levaduras autóctonas seleccionadas. También se ha

comprobado que son capaces de fermentar a temperaturas más bajas como a 14 °C, pero con ciertos riesgos porque presentan fases de latencia algo más largas.

Comparando las cepas autóctonas seleccionadas con la comercial, podríamos decir que presentaron un patrón de fermentación similar a las distintas temperaturas ensayadas.

	313.4	153.12	48.5	Fermivin	X2180
<b>14 °C</b>					
0 h	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0		
5 h	3 ± 0,3	3,4 ± 0,9	1,4 ± 0,4		
16 h	10,5 ± 4	6,5 ± 0,6	4,4 ± 0,4		
22 h	26,3 ± 5,7	21 ± 2,4	4,7 ± 1,6		
40 h	61,1 ± 13,1	73,6 ± 9,4	58 ± 5,2		
47 h	79,6 ± 32,2	138,5 ± 31	121,2 ± 62,5		
64 h	132 ± 10	156 ± 16	141,3 ± 30,3		
70 h	129,3 ± 18,5	141,3 ± 42,4	136 ± 31,7		
135 h	142,7 ± 43,9	160 ± 24,3	148 ± 44,5		
159 h	90,7 ± 20,5	177,3 ± 52,2	141,3 ± 28,4		
184 h	106,7 ± 47,7	125,3 ± 19	154,7 ± 37,2		
<b>20 °C</b>					
0 h	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
5 h	2 ± 0	4,8 ± 2,3	2,7 ± 0,1	4 ± 0,7	4 ± 0,2
16 h	45 ± 1,4	38,8 ± 5,1	65 ± 42,1	65,3 ± 19,6	50,7 ± 4
22 h	123,8 ± 2,2	79,8 ± 8,2	74,6 ± 2,5	65,2 ± 9,8	77,7 ± 8,6
40 h	154 ± 6	116 ± 17	118 ± 2,8	120 ± 14,4	121,3 ± 6,1
47 h	156 ± 72	148 ± 51	90 ± 19,8	166,7 ± 33,3	162,7 ± 52,2
64 h	126 ± 2	150 ± 2,8	84 ± 5,6	120 ± 26,2	152 ± 18,3
70 h	148 ± 28	172 ± 28,3	120 ± 22,6	140 ± 41,6	138,7 ± 30,3
135 h	134 ± 14	142 ± 59,4	142 ± 14,1	165,3 ± 32,6	176 ± 46,1
159 h	192 ± 64	112 ± 39,6	150 ± 42,4	150,7 ± 20,5	204 ± 74,1
184 h	184 ± 8				200 ± 34,2
<b>35 °C</b>					
0 h	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
5 h	13,4 ± 3	14 ± 5	16,8 ± 3,3	9,6 ± 1,2	10,6 ± 1,2
16 h	46,7 ± 8,3	60 ± 7	38,7 ± 2,3	53,3 ± 9,2	60 ± 17,4
22 h	76 ± 25	94,7 ± 25,7	97,3 ± 19,7	60 ± 17,4	93,3 ± 20,5
40 h	89,3 ± 20,5	81,3 ± 12,8	80 ± 8	88 ± 32,7	121,3 ± 10,1
47 h	96 ± 50	58,7 ± 8,3	74,7 ± 45	134,7 ± 36,1	132 ± 34,2
64 h	61,3 ± 34	49,3 ± 10,1	74,7 ± 16,2	56 ± 24	150,7 ± 16,6
70 h	88 ± 47,1	48 ± 13,8	44 ± 12	70,7 ± 30,3	122,7 ± 25,7
135 h	17,3 ± 2,3	16 ± 7	16 ± 4	16 ± 10,6	98,7 ± 19,7
159 h	18,7 ± 6,1	14,7 ± 2,3	16 ± 4	8 ± 0	74,7 ± 14
184 h	12 ± 4	10,7 ± 4,6	13,3 ± 2,3	2,7 ± 4,6	32 ± 8

**Tabla. 27.** Número de células vivas/mL ( $E + 06$ ) para cada cepa medido durante las micro-fermentaciones, llevadas a cabo a 14, 20 y 35 °C. Cada valor representa la media  $\pm$  desviación típica de las determinaciones realizadas de las fermentaciones llevadas a cabo en paralelo, de los duplicados para el caso de las cepas 313.4, 153.12 y 48.5 a 20 °C; y de los triplicados para el resto de los casos.

	313.4	153.12	48.5	Fermivin	X2180
<b>14 °C</b>					
0 h	11 ± 0,00	11 ± 0,00	11 ± 0,00		
5 h	10,73 ± 0,15	10,40 ± 0,17	10,33 ± 0,19		
16 h	10,23 ± 0,05	10,23 ± 0,06	10,35 ± 0,09		
22 h	10,30 ± 0,10	10,22 ± 0,15	10,48 ± 0,06		
40 h	9,83 ± 0,11	9,73 ± 0,15	9,82 ± 0,27		
47 h	9,60 ± 0,15	9,08 ± 0,15	9,43 ± 0,51		
64 h	8,78 ± 0,03	7,85 ± 0,50	8,67 ± 0,03		
70 h	8,48 ± 0,06	7,13 ± 0,11	7,80 ± 0,22		
135 h	4,06 ± 0,25	2,45 ± 0,58	3,08 ± 0,27		
159 h	3,35 ± 0,15	1,60 ± 0,58	2,27 ± 0,28		
184 h	2,67 ± 0,19	0,90 ± 0,63	1,57 ± 0,28		
<b>20 °C</b>					
0 h	10,50 ± 0,00	10,50 ± 0,00	10,50 ± 0,00	10,50 ± 0,00	10,50 ± 0,00
5 h	10,40 ± 0,14	10,35 ± 0,07	10,30 ± 0,00	10,36 ± 0,57	10,36 ± 0,57
16 h	10,20 ± 0,14	9,85 ± 0,07	9,95 ± 0,21	9,80 ± 0,10	10,31 ± 0,17
22 h	9,55 ± 0,14	9,00 ± 0,21	8,30 ± 0,00	8,55 ± 0,56	9,95 ± 0,87
40 h	7,65 ± 0,07	7,37 ± 0,03	7,75 ± 0,00	7,33 ± 0,19	8,72 ± 0,03
47 h	7,07 ± 0,18	6,60 ± 0,14	6,70 ± 0,07	6,47 ± 0,76	8,27 ± 0,08
64 h	5,70 ± 0,21	4,90 ± 0,21	5,00 ± 0,07	4,68 ± 0,11	6,98 ± 0,06
70 h	5,17 ± 0,18	4,00 ± 0,28	4,17 ± 0,11	3,82 ± 0,21	6,40 ± 0,10
135 h	1,45 ± 0,07	0,30 ± 0,14	0,35 ± 0,07	0,17 ± 0,11	2,63 ± 0,11
159 h	0,40 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,60 ± 0,17
184 h	0,00 ± 0,00				0,57 ± 0,20
<b>35 °C</b>					
0 h	11 ± 0,00	11 ± 0,00	11 ± 0,00	11 ± 0,00	11 ± 0,00
5 h	10,75 ± 0,18	10,57 ± 0,58	10,67 ± 0,58	10,90 ± 0,43	10,83 ± 0,21
16 h	8,57 ± 0,06	8,73 ± 0,15	9,03 ± 0,11	8,97 ± 0,14	9,87 ± 0,03
22 h	7,77 ± 0,15	7,87 ± 0,03	7,97 ± 0,21	8,02 ± 0,21	9,28 ± 0,06
40 h	5,20 ± 0,17	5,57 ± 0,23	5,78 ± 0,23	5,63 ± 0,25	7,55 ± 0,00
47 h	4,48 ± 0,19	4,97 ± 0,58	5,15 ± 0,15	4,80 ± 0,35	6,93 ± 0,08
64 h	3,03 ± 0,24	3,25 ± 0,17	3,65 ± 0,10	2,92 ± 0,40	5,13 ± 0,03
70 h	2,62 ± 0,29	2,88 ± 0,15	3,12 ± 0,06	2,28 ± 0,72	4,53 ± 0,08
135 h	1,15 ± 0,28	1,50 ± 0,10	1,57 ± 0,12	0,93 ± 0,25	1,18 ± 0,08
159 h	0,87 ± 0,24	1,28 ± 0,11	1,45 ± 0,05	0,67 ± 0,14	0,73 ± 0,11
184 h	0,77 ± 0,24	1,25 ± 0,10	1,43 ± 0,15	0,80 ± 0,30	0,60 ± 0,00

**Tabla 28.** Grado Beaumé (°Be) que indica la evolución de cada una de las micro-fermentaciones por consumo de azúcar para cada una de las cepas a las distintas temperaturas ensayadas. Cada valor indica la media ± desviación típica de las determinaciones realizadas de las fermentaciones llevadas a cabo en paralelo, de los duplicados para el caso de las cepas 313.4, 153.12 y 48.5 a 20 °C; y de los triplicados para el resto de los casos.

Una vez conocido el comportamiento de las cepas autóctonas fermentando a distintas temperaturas, se pudo relacionar con los resultados obtenidos durante la fermentación del pie de cuba en la vendimia 2002. Durante este proceso se analizaron dos muestras (Figura 39) entre las cuales se produjo una disminución de la temperatura que resultó en un cambio en la dinámica de las poblaciones. Debido a la bajada de la temperatura, la viabilidad disminuyó, siendo de un 21, 5 % en la muestra de 4,45 °Be. En ese momento aunque se detectó un 46% de las cepas inoculadas (34% de cepas con patrón P5I y 12% de cepas con cariotipo P2), existía una población de cepas minoritarias de *S. cerevisiae* con patrones P3, P27 y P41, además de un 4% de cepas no-*Saccharomyces*. Posteriormente se realizó un

escalamiento y si en ese momento la temperatura fue menor de 14 °C seguramente afectó a las cepas inoculadas, ya que hemos comprobado que a 14°C las cepas seleccionadas en micro-fermentaciones puras y en condiciones de laboratorio fueron capaces de fermentar pero con fases de latencia más largas que cuando fermentaron a 20 °C. Pero en condiciones industriales donde el mosto no está estéril, si la temperatura llega a ser más baja de 14 °C, en el caso de realizar operaciones de escalamiento, estas cepas, debido a las fases de latencia largas, pueden llegar a ser desplazadas por otras autóctonas más adaptadas a esas condiciones puntuales del proceso, como ocurrió con las de cariotipo P27.

La presencia de cepas no-*Saccharomyces* también pudo contribuir a que no se desarrollaran adecuadamente las inoculadas. Se ha determinado que cuando una fermentación se lleva a cabo a una temperatura baja las cepas no-*Saccharomyces* pueden estar presentes e incluso pueden llegar a predominar (Sharf & Margalith 1983; Heard & Fleet 1988).

La modificación en la ecología de las fermentaciones observada en nuestro estudio (Figura 58) debido a una disminución en la temperatura también se ha puesto de manifiesto en otros trabajos (Torija y col. 2002). De manera que, aunque fermentar a bajas temperaturas tiene interesantes aplicaciones en la industria enológica debido a que se conservan mejor los aromas afrutados, también tiene un efecto adverso en el crecimiento celular, porque incrementa el estrés de las levaduras durante el proceso de fermentación del vino (Bauer & Pretorius 2000).

### 2.3. Vendimia 2003

Para inocular las fermentaciones industriales se realizó también un pie de cuba aunque en esta vendimia se hizo por duplicado, con tres días de diferencia cada uno, a los que se llamó **Pie de cuba A** y **Pie de cuba B**. Se utilizaron las mismas cepas seleccionadas que en la vendimia 2002, es decir, 313.4, 153.12 y 48.5 cuyos patrones cromosómicos fueron P2, P5 y P5.I respectivamente.

La elaboración de cada pie de cuba se realizó en dos fases, igual que en 2001 y 2002, una primera en el laboratorio de Microbiología (UCA) y otra segunda en los lagares de elaboración de la bodega. Pero la diferencia con respecto a las vendimias anteriores fue que en el laboratorio se inoculó cada cepa directamente en 2 litros de mosto natural estéril (126 °C, 20 minutos). De manera que de cada una de ellas, previamente crecidas en placas de medio YPD, se recogió suficiente biomasa (3 millones células vivas/mL) que se inoculó en los dos litros de mosto, manteniéndose después a 20 °C. Cuando el grado Beaumé de cada pie de cuba estuvo en torno a 2, se hizo el escalamiento a los 18 litros de mosto descongelado y corregido, para tener un volumen final de pie de cuba de 20 litros.

La segunda fase de elaboración también tuvo algunas variaciones con respecto a años anteriores, ya que para continuar con los escalamientos en la bodega, de cada levadura fermentando en 20 litros se tomó la cantidad necesaria para tener en el siguiente volumen  $1 \times 10^6$  células vivas/mL de cada cepa. Los tres volúmenes tomados se mezclaron y se inocularon en 200 litros (Figura 17). Además el Pie de cuba A se dividió en dos depósitos para luego unirlos de nuevo y adicionarlo a un volumen mayor. Esta operación se realizó en varios pasos durante el escalamiento hasta llegar al volumen final de 12.500 litros. En cuanto a la elaboración del Pie de cuba B, se hizo igual que el A en la fase de laboratorio, pero en la fase de bodega no se dividió como se hizo con el A, y se fue escalando hasta llegar a un volumen final de 5.000 litros.

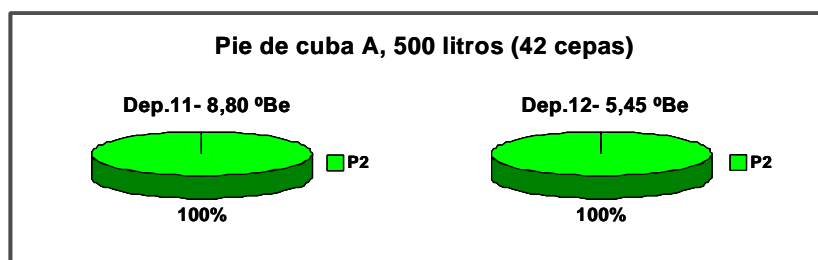
Para poder realizar el seguimiento de las cepas inoculadas, diariamente se tomaron muestras tanto de los pies de cuba A y B como de los depósitos de fermentación (Tablas 9 y 10), que fueron glicerizadas al 20% y conservadas a -80 °C hasta su análisis posterior, una vez finalizada la vendimia.

Se analizaron 5 muestras del Pie de cuba A, 1 del Pie de cuba B y 8 de los depósitos de fermentación (se indican en amarillo en las tablas); de cada una se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD, y de las más representativas se eligieron al azar 40 colonias completamente aisladas.

- **Pie de cuba A**

Las 5 muestras analizadas correspondieron a distintos momentos del escalamiento del Pie de cuba A. Se obtuvo el cariotipo electroforético de un total de 126 cepas.

Tras la mezcla de los tres cultivos puros de 20 litros hechos con las cepas seleccionadas y realizar dos escalamientos mas, se observó en 500 litros (Figura 67) un predominio del 100% de una de las cepas inoculadas, la de patrón P2.



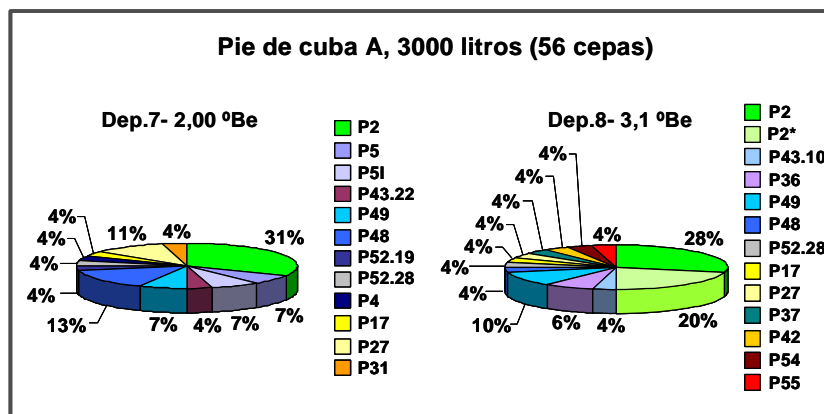
**Figura 67.** Cada gráfica corresponde a muestras tomadas en días distintos de los depósitos 11 y 12, en los que se dividió el Pie de cuba A, cada uno con 500 litros. Se observa que en las dos muestras hubo un predominio del 100% de una de las cepas inoculadas, la de patrón P2. Se analizó el cariotipo electroforético de 14 cepas para el depósito 11 y de 28 para el 12.

En el siguiente volumen analizado, 3.000 litros (Figura 68) se detectó un polimorfismo cromosómico muy acusado, mostrándose en el depósito 7 la existencia de un total de 12 patrones moleculares distintos, y en el depósito 8, un total de 13. Las cepas con patrón P2 fueron las predominantes en las dos muestras, aunque no al 100%, siendo desplazadas por otras autóctonas.

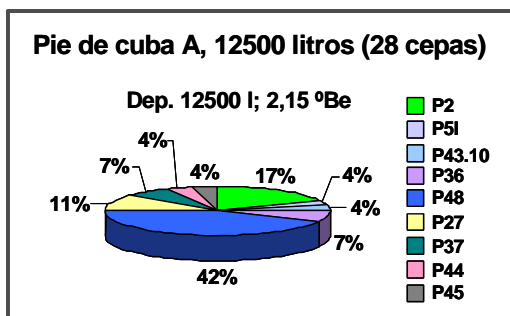
En el depósito 7, cuando el °Be fue de 2, se detectó un 14% de las otras dos cepas inoculadas, las de patrones P5 y P5.I. En el depósito 8 se detectó un 20% de cepas con patrón P2\*, muy similar al de la cepa inoculada con patrón P2, también detectado en la vendimia 2002. En ambos depósitos se detectaron un conjunto de cepas que mostraron cariotipos similares a P5 y P5.I, siendo estos patrones P43.10, P43.22, P48, P49, P52.19 y P52.28 no detectados en vendimias anteriores, y P36 que



fue detectado en la vendimia 2002 en proporción muy baja. Estos patrones similares se han representado en las gráficas con colores parecidos a los de las cepas inoculadas P5 y P5.I para facilitar su identificación en el resto de las muestras analizadas. También se detectaron cepas con otros patrones nuevos P54 y P55 en un 4%, lo cual significó que cada patrón fue representativo de un solo aislamiento, no volviéndose a observar en las demás muestras analizadas.



**Figura 68.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos presentes en dos muestras tomadas el mismo día del Pie de cuba A, de los depósitos 7 y 8 fermentando en 3.000 litros cada uno. Se analizó el cariotipo electroforético de 28 cepas/muestra.



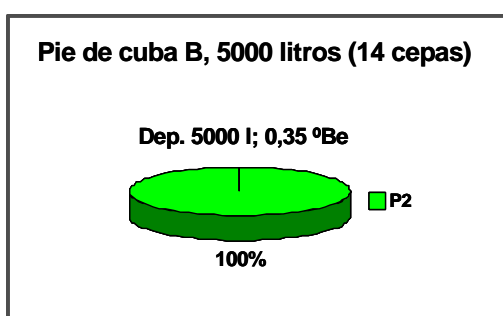
**Figura 69.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos presentes en la muestra tomada del Pie de cuba A que correspondió al volumen final de 12.500 litros. A partir de este momento el pie de cuba se adicionó a los depósitos de fermentación. Se analizó el cariotipo de 28 cepas.

En la Figura 69 se representa la población de levaduras presente en 12.500 litros del pie de cuba antes de ser adicionado a los depósitos de fermentación. En ese momento las cepas mayoritarias fueron las que mostraron el patrón P48. Observamos que sólo se encontraron dos de las cepas inoculadas, las de patrón P2 en un 17% y las de patrón P5.I sólo presentes de forma minoritaria en un 4%. También se observaron en baja proporción cepas con los patrones P43.10 y P36, similares a P5 y P5.I. Además se encontraron cepas con cariotipos nuevos, P44 y P45 en 4%, y

cepas ya detectadas anteriormente en otras vendimias como las de cariotipo P27 y P37.

- **Pie de cuba B**

Sólo se analizó una muestra, la correspondiente al volumen final de 5.000 litros. Después este pie de cuba fue adicionado a los depósitos de fermentación (Figura 17). Se analizó el cariotipo electroforético de un total de 14 cepas.



**Figura 70.** Gráfica correspondiente a la muestra tomada del volumen final del Pie de cuba B en la que hubo un predominio del 100% de una de las cepas inoculadas, la de patrón P2.

A diferencia de lo que ocurrió en el Pie de cuba A, en el B se observó, antes de ser adicionados a los depósitos grandes, un claro predominio de cepas con patrón P2 que correspondió a una de las inoculadas (Figura 70). La explicación a estos resultados pudo ser debida a que en el caso del Pie de cuba B los escalamientos que se hicieron en bodega fueron distintos a los del Pie de cuba A, ya que fueron menos numerosos y no se hicieron divisiones del mosto. Comprobamos que la forma de realizar las operaciones de escalamiento durante la elaboración del pie de cuba fue decisiva para el establecimiento de determinadas poblaciones de levaduras, y que no es fácil en condiciones industriales reproducir los resultados aunque el comienzo del proceso se haya hecho de forma similar.

➤ ¿Por qué la implantación de la cepa con cariotipo P2 en el Pie de cuba B?

Esta cepa presenta una particularidad, y es que se ha observado que en los recipientes con mosto donde se inocula, sus células tienden a agregarse para formar una torta en el fondo de éstos a medida que empieza a aumentar el grado alcohólico. Es probable que cuando los pies de cuba, tanto el A como el B, estaban en 20 litros

seguramente la mayor parte de la biomasa se encontraba en el fondo del recipiente y la viabilidad se midió tomando una muestra de las células en suspensión, que en el caso de esta cepa habría pocas, con lo cual el volumen a inocular para tener los 200 litros de mosto tuvo que ser mayor que en el caso de las otras cepas inoculadas, las de cariotipos P5 y P5I, que no mostraron tendencia a agregarse y depositarse. Por tanto, al tomar el volumen de los 20 litros de la cepa P2, es probable que se tomaran más células de lo previsto, implantándose éstas sobre las otras dos inoculadas, como se ha observado al comienzo de la elaboración del Pie de cuba A.

En el Pie de cuba B se hicieron menos divisiones y escalamientos. El primer escalamiento se hizo igual que para el Pie de cuba A, inoculando 1 millón de células/mL de cada pie de cuba de 20 litros y por los mismos motivos al final sólo detectamos cepas con cariotipo P2, pero lo curioso fue que en el último depósito se detectaron al 100% con 0.35 °Be. Esto pudo ser debido a que en el Pie de cuba B, además de que se hicieron menos escalamientos, cuando se realizaron, el ° Be fue más bajo que en el caso de Pie de cuba A.

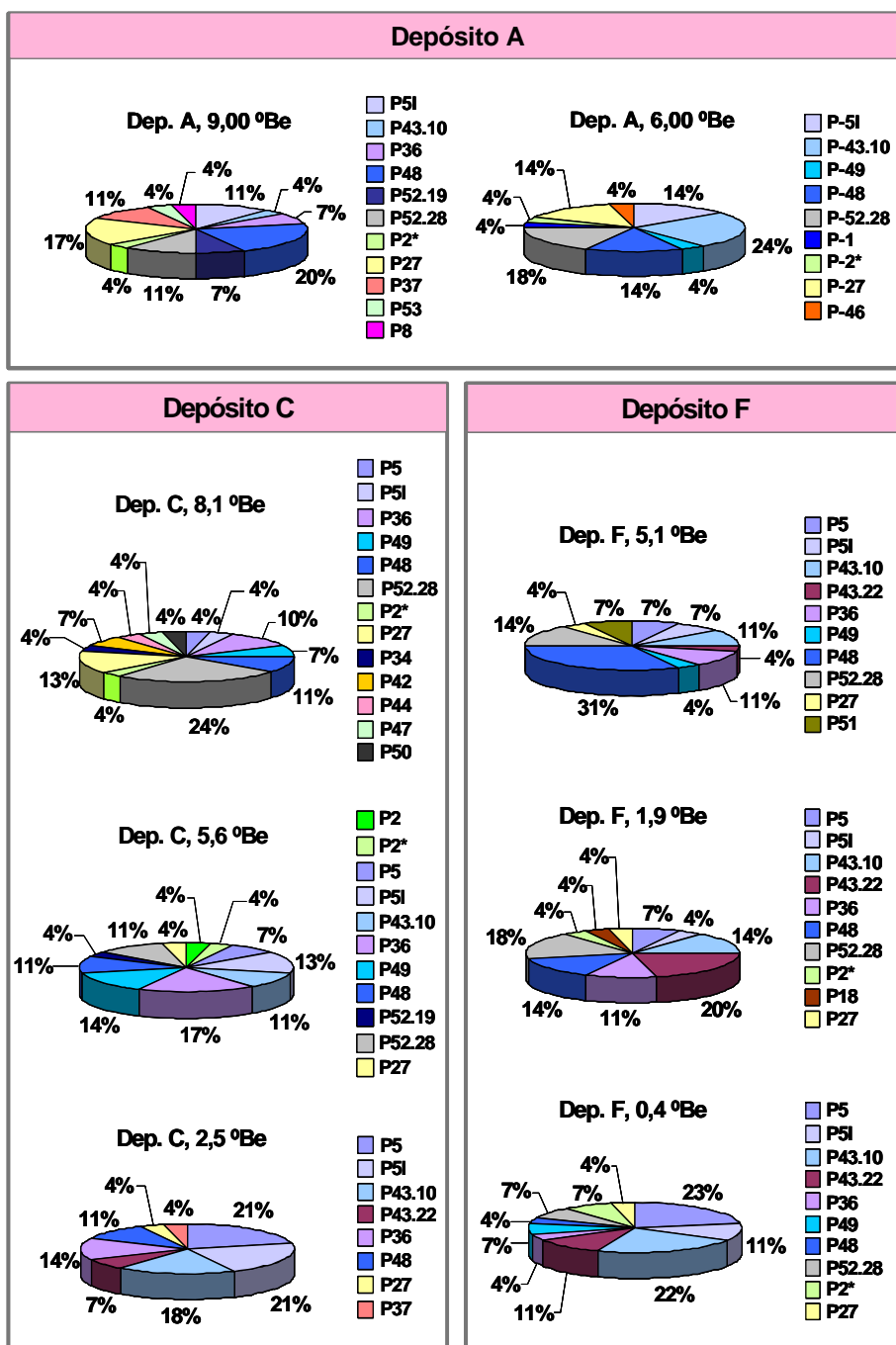
- **Depósitos de fermentación**

Se analizaron 8 muestras de tres depósitos, A, C y F en distintas fases de la fermentación. El número total de cepas analizadas mediante cariotipo electroforético fue de 223.

Los resultados de la Figura 71 revelan, a priori, que las cepas inoculadas no fueron las que predominaron al 100% existiendo en todas las muestras analizadas una alta variabilidad genética de cepas. Por tanto el **polimorfismo cromosómico** fue elevado llegándose a determinar 19 patrones cromosómicos distintos, además de los correspondientes a las cepas inoculadas (Figura 72). Cabe destacar que 7 de estos patrones fueron muy similares a los de las cepas inoculadas con patrones P5 y P5.I, y fueron detectados anteriormente en las muestras analizadas del Pie de cuba A. Los cariotipos de estos patrones se han destacado en la Figura 72 con un recuadro.

De estos 7 patrones los más abundantes detectados durante las fermentaciones fueron P36, P43.10, P43.22, P48 y P49. De todos, el que se encontró

en mayor proporción fue el patrón P43.10 sobre todo en dos de los depósitos estudiados al final de la fermentación como fueron el C, en el cual con un 2,5 °Be se observó un 18% de cepas con este patrón, y el F que con un 0,4 °Be estuvieron presentes en un 22%. En el depósito A este patrón (P43.10) fue mayoritario cuando se analizó una muestra con un contenido de azúcar elevado (6,00 °Be), detectándose en un 24% (Figura 71).

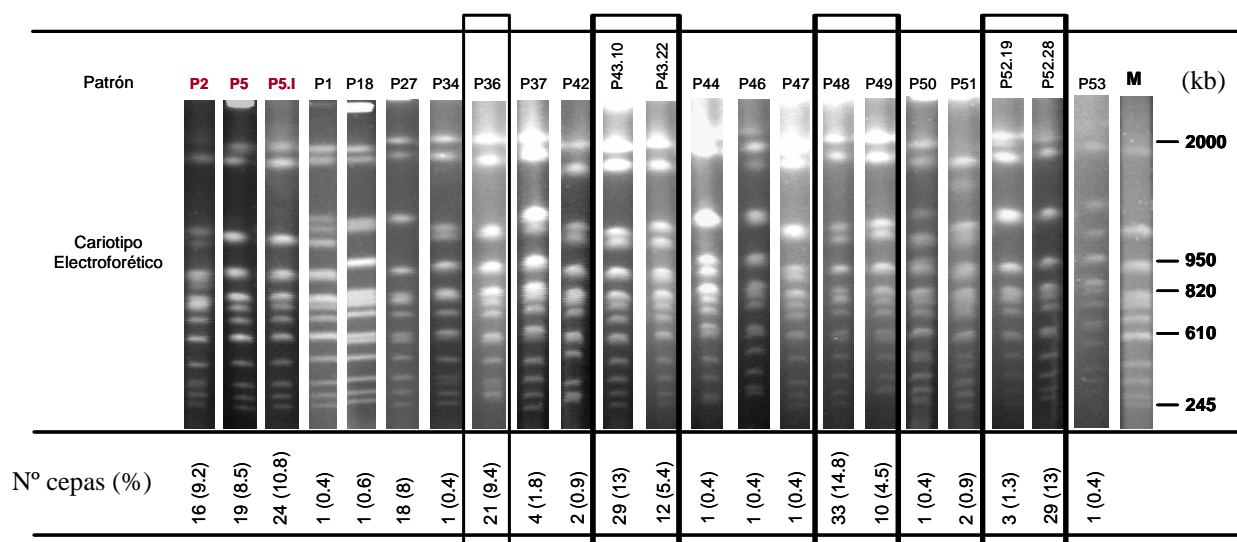


**Figura 71.** Porcentaje de cepas con distintos cariotipos detectadas en las fermentaciones en tres depósitos. Las cepas con patrones P2, P5 y P5.I correspondieron a las inoculadas.

En cuanto a las cepas con patrón P48, se detectaron en proporciones elevadas en el depósito A al inicio y mitad de la fermentación en un 20% y 14% respectivamente, mientras que en el depósito F la proporción fue mayor a mitad del proceso, detectándose un 31% con un 5,1 °Be, disminuyendo su presencia hasta un 4% a medida que fue aumentando el grado alcohólico.

En cuanto a las cepas con cariotipo P36, detectadas sobre todo en el depósito C y F, se observaron en proporción más baja al final de las fermentaciones que en las fases anteriores, estando en un 14% en el depósito C y en un 4% en el F.

Se hará un especial hincapié en las cepas que presentaron cariotipos similares a P5 y P5.I y serán objeto de estudio en el apartado 4 de los resultados de la Tesis.



**Figura 72.** Cariotipos electroforéticos de cepas *S. cerevisiae* encontrados tras la caracterización molecular de las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos durante la vendimia 2003. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (223, incluyéndose a las no-*Saccharomyces*, aunque no se ha incluido el cariotipo de éstas). P2, P5 y P5.I corresponden a los patrones de las cepas inoculadas, y en un recuadro se muestran los cariotipos que se consideraron similares a P5 y P5.I. M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

Aunque las cepas inoculadas con patrones P5 y P5.I se detectaron en baja proporción en el pie de cuba, durante la fermentación en los depósitos analizados sí existió una participación importante de éstas, llegando a tener un 42% entre las dos en el depósito C casi al finalizar la fermentación, y un 34% en el F. Asimismo, no

fueron desplazadas por las cepas que mostraron patrones similares a ellas, como por ejemplo P43.10, P48 ó P36.

Por tanto (Figura 71), en general, las cepas que llevaron el control de las fermentaciones en los tres depósitos fueron tanto las inoculadas con patrones P5 y P5.I, como las de patrones parecidos a éstas, P36, P43.10, P43.22, P48 y P49 seguidas de P52.28 y P27. Además junto a estas cepas se observó la presencia de otras, de forma minoritaria, como por ejemplo las de patrones P1, P18, P34, P44, P46, P47, P50 y P53 detectadas en un 4%; o las de patrones P37, P42 y P51 detectadas en un 7-11%.

En cuanto a la otra cepa inoculada, con patrón P2, se detectó en una proporción muy baja (4%) sólo en una de las muestras analizadas del depósito C (5,6 °Be), aunque sí se detectaron otras que presentaron un patrón muy similar, P2\*, ocasionalmente y en baja proporción (4-7%). Es posible que estas cepas comenzaran a ser desplazadas desde el pie de cuba, y a medida que fue aumentando el volumen en los escalamientos, éstas se quedaron en el fondo de los depósitos debido a su tendencia a formar agregados celulares y depositarse como se ha comentado anteriormente. De esta forma seguramente, estas cepas llegaron a estar presentes de forma minoritaria en suspensión, con lo cual difícilmente pudieron ser detectadas al analizar las muestras tomadas de los depósitos. Y aunque no se hayan implantado, seguramente tuvieron una influencia importante tanto en el establecimiento de las cepas que predominaron en esta vendimia como en las cualidades del producto final obtenido.

Cabe destacar que la presencia de cepas no-*Saccharomyces* fue minoritaria, detectándose sólo en el depósito A al inicio de la fermentación (9,00 °Be) en un 4%, es decir que sólo un asilamiento perteneció a este tipo de levaduras.

En relación a las **recargas de mosto**, en el depósito F fue donde se realizaron mayor número de éstas (Tabla 10). Desde la primera muestra analizada hasta la última se hicieron cuatro recargas. Suponemos que estas operaciones tuvieron un cierta influencia sobre las fermentaciones aportando nuevas levaduras, aunque este hecho, en este caso, no lo podemos asegurar porque las poblaciones de levaduras

presentes en la primera muestra analizada fueron muy similares a las observadas en segunda y última muestra, existiendo una variabilidad de patrones cromosómicos parecida.

En el depósito C, en el que no se realizaron recargas de mosto fresco entre las muestras analizadas, se pudo apreciar que existió una **dinámica en las poblaciones** de las levaduras, ya que se observaron cepas exclusivas de cada fase estudiada durante la fermentación. Por ejemplo, las cepas con patrones P34, P42, P47 y P50 sólo se detectaron en la primera muestra analizada, y cepas con patrón P37 en la última. Además, las proporciones de estas cepas así como de las que dirigieron el proceso fueron variando a lo largo de la fermentación.

Para concluir podemos decir que en esta vendimia, la forma en la que se realizó la elaboración del pie de cuba seguramente condicionó que no se diera una implantación del 100% de las cepas inoculadas. Aunque hay que matizar que la no detección de las cepas inoculadas durante la elaboración del pie de cuba no significó que no estuvieran presentes, ya que posteriormente fueron detectadas en las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos.

Los análisis sensoriales del vino obtenido en esta vendimia, realizados por personal de la bodega especializado en catas, indicaron que las propiedades organolépticas del producto fueron buenas, considerándose el vino como gustoso y persistente, con aromas de fruta madura, de flores silvestres en verano y con un punto balsámico.

#### 2.4. Vendimia 2004

Para inocular las fermentaciones industriales (400.000 litros), en esta vendimia se utilizaron dos de las levaduras autóctonas seleccionadas 313.4 y 153.12, con patrones cromosómicos P2 y P5 respectivamente. El proceso se inició con la elaboración del pie de cuba realizado por duplicado aunque con tres días de diferencia llamándose, igual que en la vendimia anterior, **Pie de cuba A** y **Pie de cuba B**. En la primera fase de elaboración, que se hizo en condiciones muy

controladas, se inoculó cada cepa, previamente crecidas en placas de medio YPD, en 500 mL de mosto esterilizado en autoclave (126 °C, 20 minutos). A los tres días se realizó el escalamiento a dos litros de mosto también esterilizado en las mismas condiciones que el volumen anterior, suponiendo el inóculo el 25% de los 2 litros. En ambos pies de cuba, para hacer el escalamiento a los 20 litros de mosto, se esperó a que el contenido en azúcar de los 2 litros fuese de 1 °Be. Los 18 litros de mosto utilizados no se esterilizaron sino que fueron descongelados y se corrigió la acidez antes de ser inoculados.

En la segunda fase de elaboración cuando cada pie de cuba en 20 litros alcanzó también un contenido en azúcar bajo, se agitaron bien y se unieron para adicionarlos a un volumen mayor (Figura 18). En el caso del Pie de cuba A se realizaron 7 escalamientos y en el caso del B solamente 5. Tanto en el Pie de cuba A como en el B, antes de hacer cada escalamiento se procuró que el grado Beaumé fuese bajo, de manera que al inocularlo en volúmenes mayores el medio quedase parcialmente alcoholizado (fermentación súper 4 o súper 8) para evitar el desarrollo de levaduras poco tolerantes al etanol como muchas de las no-*Saccharomyces* y de otras indígenas *Saccharomyces*, presentes normalmente en el mosto, que pudieran interferir en el desarrollo de las inoculadas.

Para poder comprobar si las cepas inoculadas fueron las que llevaron a cabo el control del proceso, se tomaron muestras diariamente, tanto de los pies de cuba como de los depósitos de fermentación (Tablas 11 y 12), que fueron glicerizadas al 20% y conservadas a -80 °C para ser procesadas tras la finalización de la vendimia.

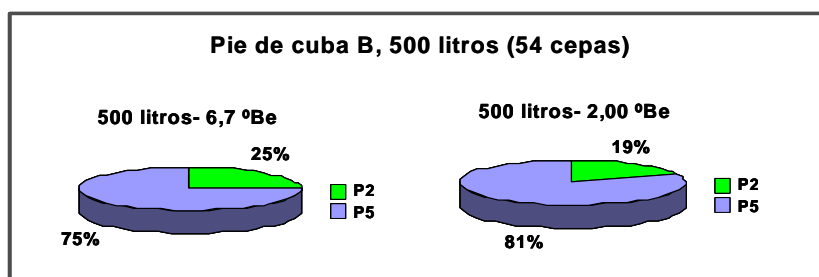
Se analizaron 4 muestras sólo del Pie de cuba B y 12 pertenecientes a cuatro depósitos de fermentación (señaladas en amarillo en las tablas); de cada una se hicieron diluciones, se sembraron a modo de césped en placas de Petri con medio YPD y de la más representativa se eligieron 30 colonias al azar totalmente aisladas.

- **Pie de cuba B**

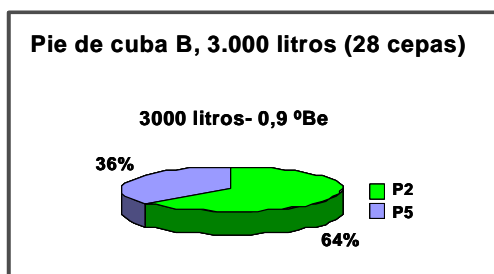
Se analizó el cariotipo de un total de 110 cepas aisladas de las 4 muestras. Dos de ellas pertenecieron a un volumen de 500 litros, la primera, con 6,7 °Be, una



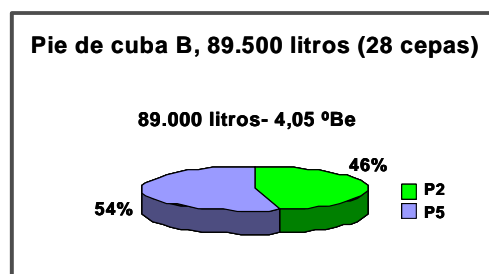
vez inoculado, y la segunda antes del escalamiento al volumen siguiente, determinándose la proporción de cepas que predominaron en cada momento (Figura 73). La siguiente muestra analizada fue tomada de un volumen de 3.000 litros, también antes de realizarse otro escalamiento (Figura 74), y finalmente la última muestra que se estudió se tomó de un volumen de 89.500 litros antes de ser repartido a los depósitos de fermentación (Figura 75).



**Figura 73.** Se muestra la proporción de las cepas inoculadas con patrones P2 y P5 presentes en las dos muestras tomadas del Pie de cuba B fermentando en 500 litros. Se analizó el cariotipo electroforético de 27 cepas/muestra.



**Figura 74.** Proporción de las cepas inoculadas con patrones P2 y P5 en la muestra tomada del Pie de cuba B fermentando en 3.000 litros, antes de realizarse el escalamiento al siguiente volumen de 7.000 litros. Se analizó el cariotipo de 28 cepas.

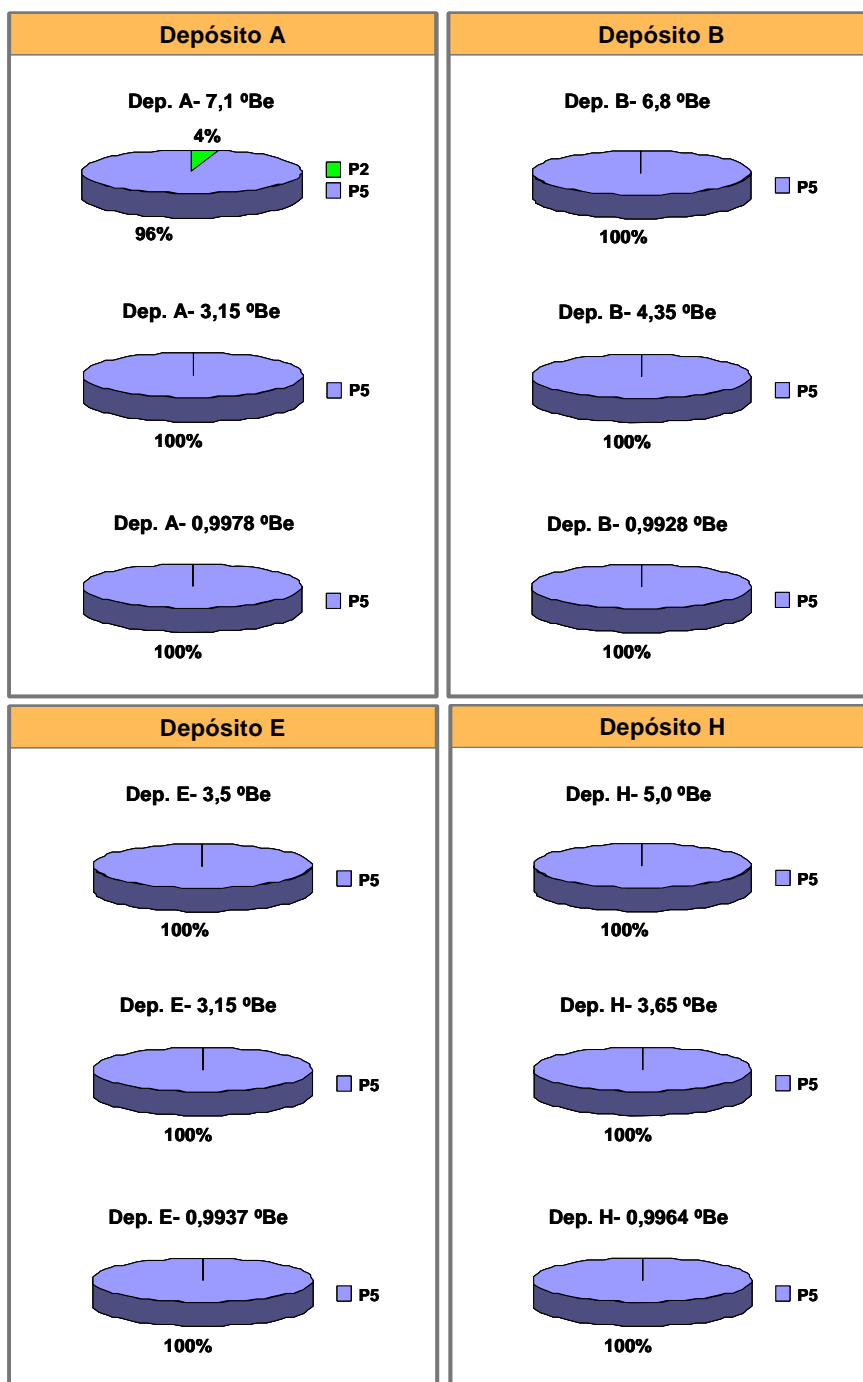


**Figura 75.** Proporción de las cepas inoculadas con patrones P2 y P5 en la muestra tomada del Pie de Cuba B fermentando en 89.500 litros, antes de ser repartido a los depósitos de fermentación. Se analizó el cariotipo de 28 cepas.

Los resultados representados en las gráficas mostraron una clara implantación de las dos cepas inoculadas en los distintos pasos del escalamiento durante la realización del pie de cuba. Las dos cepas coexistieron en distintas proporciones

antes de la inoculación del pie de cuba a los depósitos de fermentación. No se llegaron a detectar cepas no-*Saccharomyces*.

- **Depósitos de fermentación**



**Figura 76.** Se muestra la implantación del 100%, en las fermentaciones de los cuatro depósitos analizados, de una de las cepas inoculadas, la de patrón P5.

Se analizaron tres muestras pertenecientes a tres estados distintos de la fermentación en cuatro depósitos, A, B, E y H. Mediante cariotipo electroforético se caracterizó un total de 235 cepas con los resultados que se muestran en la Figura 76, observándose una clara implantación del 100% en todas las muestras analizadas de una de las cepas inoculadas, la de cariotipo P5. Esta cepa fue capaz de desplazar a otras levaduras, tanto a cepas no-*Saccharomyces*, como a otras de la misma especie que normalmente están presentes en el mosto y que muchas veces consiguen desarrollarse detectándose después en las fermentaciones de forma minoritaria, o incluso en proporciones considerables, como por ejemplo se observó con la cepa de patrón P27 en la vendimia 2002.

Las **recargas de mosto** realizadas en los depósitos A, B y E entre las muestras analizadas (Tabla 12) no afectaron a la predominancia de la cepa inoculada con cariotipo P5. En cuanto a la otra cepa inoculada, de patrón P2, sólo se detectó al comienzo de la fermentación en un 4% en el depósito A.

El personal de la bodega especializado en catas calificó al vino obtenido en esta vendimia como muy bueno, considerándose un vino elegante, suave, con aromas de flores blancas y manzana, sutil y delicado.

## 2.5. Vendimia 2005

Tras los resultados obtenidos en las vendimias anteriores, en relación a la implantación de las cepas inoculadas, se decidió utilizar en ésta solamente una de las levaduras seleccionadas, aquella con cariotipo P5 ya que la de patrón P2, aunque sí llegó a detectarse durante el proceso de elaboración del pie de cuba, realmente no fue la que finalizó las fermentaciones en los depósitos.

Para iniciar el proceso se comenzó elaborando, igual que en años anteriores, dos pies de cuba en el laboratorio de Microbiología con dos días de diferencia y que llamamos **Pie de cuba A** y **Pie de cuba B**, haciéndose además cada uno por duplicado (a y b) con la cepa elegida. Primero se inoculó la cepa, previamente crecida en medio sólido YPD, en 500 mL de mosto esterilizado en autoclave (126

°C, 20 min.), arrancando las fermentaciones en menos de 24 horas. A los dos días se realizó el escalamiento a 2 litros de mosto esterilizado en las mismas condiciones y pasados tres días a 18 litros de mosto descongelado para tener en total 20 litros de pie de cuba de cada duplicado.

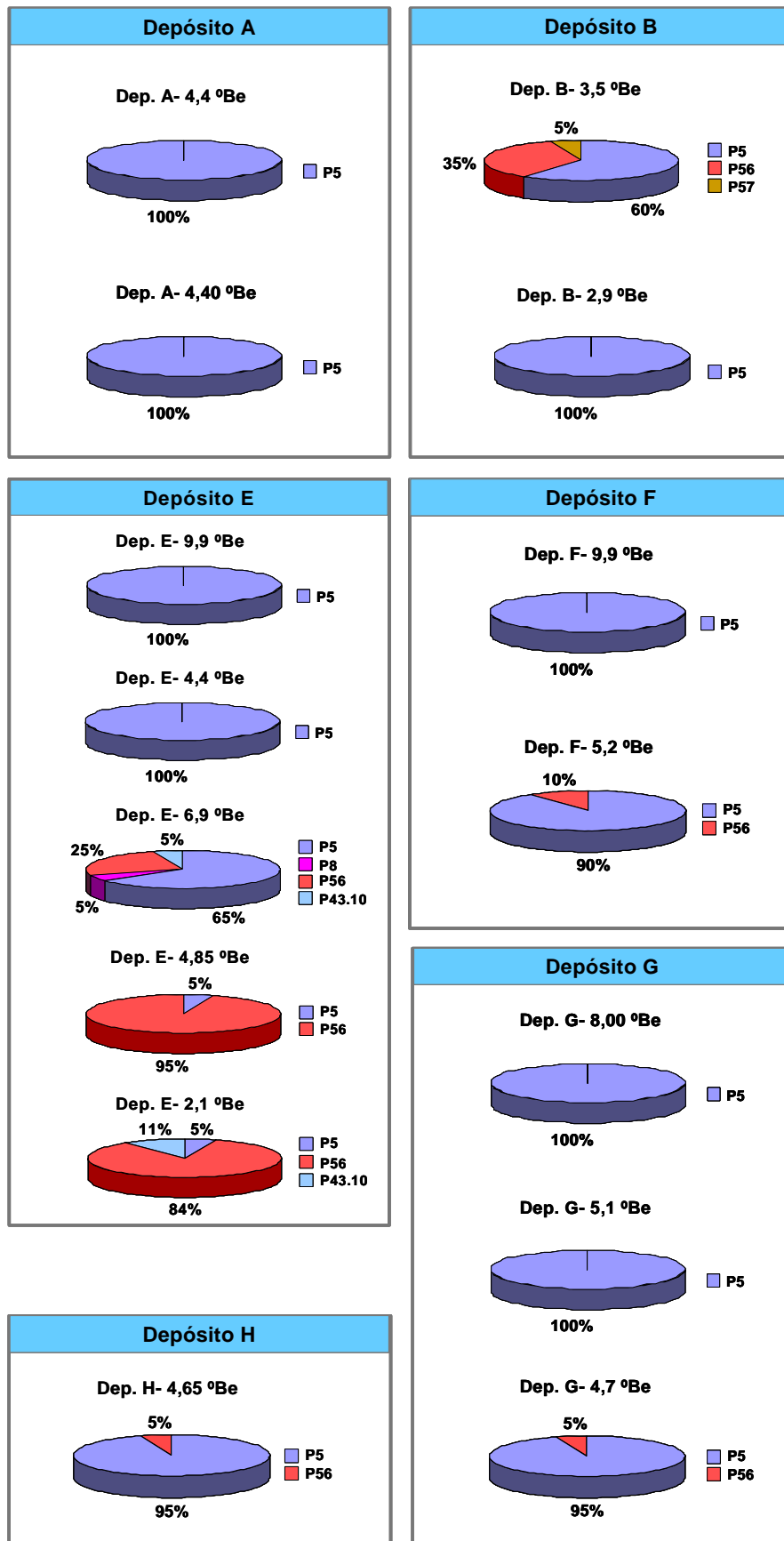
A partir de los 20 litros de cultivo, los escalamientos a volúmenes mayores de mosto se llevaron a cabo en los lagares de elaboración de la bodega (Figura 19). Una vez allí, los 20 litros de cada duplicado se agitaron muy bien y se mezclaron adicionándose a 660 litros de mosto fresco. Después se continuó hasta llegar a un volumen final de 69.500 litros que sirvieron para inocular los depósitos de fermentación.

Los escalamientos del pie de cuba fueron realizados cuando el volumen fermentado alcanzaba un grado Beaumé bajo, de 3-4 aproximadamente, y suponiendo como mínimo el inóculo un 5% del volumen total a fermentar. Tanto en el pie de cuba A como en el B se hicieron menos escalamientos que en las vendimias anteriores

Para poder comprobar la implantación o no de la cepa inoculada, se tomaron muestras diariamente de los dos pies de cuba y de los depósitos de fermentación (Tablas 13 y 14), que fueron glicerizadas al 20% y conservadas a -80 °C hasta su posterior procesamiento, tras la finalización de la vendimia.

Se analizaron 15 muestras de 6 depósitos de fermentación (se indican en color amarillo en las tablas) y ninguna del pie de cuba. De cada muestra se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD y de la más representativa se eligieron 30 colonias totalmente aisladas. Se analizó el cariotipo electroforético de un total de 278 aislamientos.

Se analizaron los resultados de forma independiente para cada depósito observándose lo siguiente:



**Figura 77.** Porcentaje de cepas detectadas en las fermentaciones de 6 depósitos. El patrón P5 correspondió al de la cepa inoculada.

En el **depósito A**, en las dos muestras analizadas, hubo una clara implantación (100%) de la cepa inoculada con patrón P5. En la tabla de la toma de muestras (Tabla 14) se observa que entre estas dos muestras se realizó una recarga de mosto fresco en el depósito, ya que el °Be aumentó hasta 6,00, sin que esta operación afectase a la implantación de la cepa inoculada.

En el **depósito B** aunque la cepa inoculada predominó en un 60% en la primera muestra analizada (3,5 °Be), se detectaron otras cepas que mostraron nuevos cariotipos, P56 y P57, estando las cepas con patrón P56 presentes en un 35%. Pero a medida que avanzó la fermentación estas fueron desplazadas por la inoculada que finalmente se implantó al 100%. Las cepas con patrón P57 estuvieron presentes de forma minoritaria (5%) no volviéndose a detectar en el resto de muestras analizadas, lo que significó que este patrón fue representativo de un único aislamiento. Antes de analizar la segunda muestra, se realizó una recarga de mosto fresco, aumentando con ello el °Be hasta 2,9, sin que la operación afectase a la implantación de la cepa inoculada.

En el **depósito E** se analizaron 5 muestras en total (Figura 77) que dividimos en dos grupos para facilitar la interpretación de los resultados. El primer grupo estuvo formado por las dos primeras muestras tomadas de un volumen determinado y en distintos momentos de la fermentación, cuando el °Beaumé fue de 9,90 y cuando disminuyó hasta 5,2. El segundo grupo de muestras correspondió a las tomadas cuando comenzó una nueva fermentación tras una recarga grande de mosto que hizo aumentar el °Be hasta 11,7 (Tabla 14).

En las dos primeras muestras analizadas, aquéllas con 9,90 y 4,00 °Be, la levadura que controló el proceso fue la inoculada de patrón P5 implantándose al 100%. Después de realizar la recarga de mosto, en la tercera muestra analizada con un °Be de 6,9 se detectaron levaduras no-*Saccharomyces* (P8) en baja proporción (5%), que correspondieron a cepas ya caracterizadas con patrón P8.1, mayoritarias en la vendimia 1999. También se detectaron cepas con patrón P56 (25%), presentes también en el depósito B, y las de patrón P43.10, detectadas en la vendimia 2003 en alta proporción. La cepa inoculada no predominó al 100% sino que estuvo presente en un 65%, y a medida que fue avanzando la fermentación fue sustituida por la de

patrón P56 aunque no totalmente y se detectó en las dos últimas muestras en un 5%. Podríamos decir que en este depósito, el **aporte de mosto** fresco sí afectó a la población de levaduras que predominaba antes de realizar la recarga, induciendo un cambio en la dinámica de éstas. Es posible que se produjera un efecto de dilución grande sobre las células de la levadura inoculada ya que el °Be aumentó hasta 11,7, provocando que las cepas con patrón P56 compitieran con la inoculada y se implantaran en un 84% hacia el final de la fermentación. Es posible también que las cepas con este patrón estuvieran muy bien adaptadas a las condiciones del mosto de esta vendimia.

En el **depósito F**, en las dos muestras analizadas, se observó una clara implantación de la cepa inoculada, aunque del 90% ya que se volvieron a detectar cepas con patrón P56 en menor proporción, 10%.

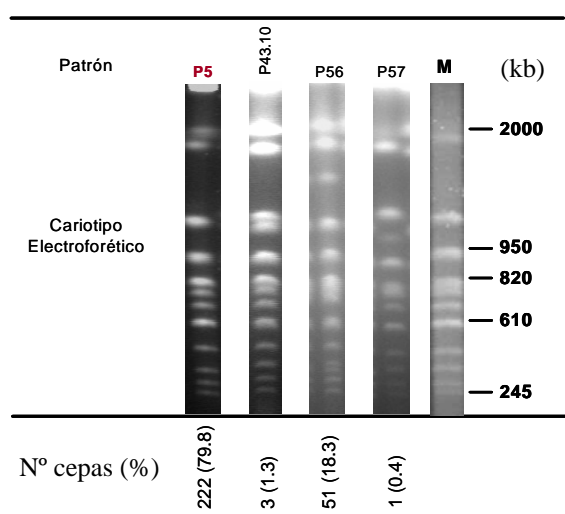
En el **depósito G** se analizaron tres muestras. En las dos primeras hubo una implantación del 100% de la cepa inoculada, y aunque entre la segunda y tercera muestra se realizaron varias recargas de mosto (Tabla 14), la cepa inoculada siguió predominando en un 95% en la última muestra analizada, correspondiendo el 5% restante a cepas con patrón P56.

Por último, en el **depósito H** de nuevo se implantó la cepa inoculada en un 95%, correspondiendo el 5% a cepas con patrón P56.

En general, los resultados obtenidos en esta vendimia pusieron de manifiesto varios hechos ya comentados anteriormente como: (i) la buena capacidad de implantación de la cepa autóctona seleccionada con patrón P5, que fue capaz de desplazar al resto de cepas indígenas que pudieran estar presentes en el mosto, reduciéndose con ello el polimorfismo cromosómico dentro de las poblaciones de levaduras *S. cerevisiae*. De hecho, se detectaron solamente tres patrones además del correspondiente a la cepa inoculada (Figura 78). (ii) Se hizo patente el hecho de que el mosto siempre supone una fuente de cepas de levaduras, nuevas, no detectadas en otros años estudiados como las de patrón P56 y P57, u otras ya caracterizadas como la de patrón P43.10 en el caso de esta vendimia. Si alguna de las cepas presentes en el mosto está mejor adaptada a las condiciones de éste, como por ejemplo la de

patrón P56 puede llegar a implantarse en proporciones elevadas. En el depósito E (Figura 77) la cepa con patrón P56 se detectó en un 85% hacia el final de la fermentación, y, aunque la cepa inoculada se detectó sólo en un 5% casi al final de la fermentación, no llegó a ser desplazada totalmente por la de patrón P56, teniendo seguramente una importante aportación en la fermentación en el sentido de que, en el momento en que se realizó la recarga grande de mosto, pudo haber favorecido el desarrollo de las cepas con patrón P56, evitando la proliferación de otras autóctonas, y en consecuencia no aumentando el polimorfismo cromosómico.

Los análisis sensoriales del vino, realizados por personal de la bodega especializado en catas volvieron a poner de manifiesto las buenas características del producto obtenido en esta vendimia. El vino presentó notas de fruta madura, de flores de verano y de pastelería y un punto balsámico. En boca tuvo una entrada suave, fue redondo, con buen cuerpo y amplio; la evolución fue buena manteniéndose en el tiempo.



**Figura 78.** Cariotipos electroforéticos encontrados tras la caracterización molecular de las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos en la vendimia 2005. El porcentaje de cepas se calculó teniendo en cuenta el total de aislamientos analizados (278), aunque no se ha incluido el cariotipo de las cepas no-*Saccharomyces*. P5 corresponde al patrón de la cepa inoculada, y M representa el marcador de pesos moleculares, en kilobases, de Promega.

## 2.6. Factores que afectaron a la implantación de las levaduras autóctonas seleccionadas en las fermentaciones inoculadas

Con la utilización de la técnica de *Electroforesis en Campo Pulsante* hemos sido capaces de realizar el seguimiento de las cepas inoculadas y determinar el comportamiento de éstas en las fermentaciones llevadas a cabo en condiciones



industriales así como los posibles factores que pudieron influir en el buen desarrollo de estas cepas.

En general, los resultados variaron de un año a otro, en parte lógico porque el comienzo del proceso en cada vendimia se modificó en función de los resultados que se fueron obteniendo a partir de la primera vendimia inoculada en 2001.

Por ejemplo, en cuanto a las cepas autóctonas seleccionadas, en las 5 vendimias estudiadas no siempre se utilizaron las mismas, sino que estas fueron cambiando, así como el número. De todas ellas, la que tuvo mejor capacidad de implantación fue 153.12 con patrón P5, ya que en tres de las vendimias estudiadas, 2001, 2004 y 2005, se implantó de forma mayoritaria y en menor medida en 2003. La cepa 313.4 con patrón P2 cuando se inoculó junto con la de patrón P5, mostró buena capacidad de implantación pero sólo durante el proceso de elaboración del pie de cuba, detectándose ocasionalmente en los depósitos de fermentación. La cepa con patrón P5.I utilizada en dos vendimias, 2002 y 2003 junto con las dos anteriores, mostró una capacidad de implantación similar a la de patrón P5, hecho que se hizo más patente en la vendimia 2003.

En lo referente a la duración de la elaboración del pie de cuba también fue distinta en cada año, es decir, que hubo años en los que el proceso fue más largo que en otros (Tabla 29).

Este hecho junto con el anterior no parece que hayan influido en la implantación de las levaduras seleccionadas durante las fermentaciones, ya que, por ejemplo, en dos de las vendimias en las que la elaboración fue larga, años 2004 y 2005, y el número de levaduras utilizadas variable, hubo una implantación del 100% de una de las cepas inoculadas, la de patrón P5.

En cuanto a la forma de realizar los escalamientos en la elaboración del pie de cuba (más numerosos, divisiones, grado Beaumé, etc.), en algunos casos fue decisiva para el establecimiento de determinadas poblaciones de levaduras como se observó en la vendimia 2003.

2ª Fase de Elaboración del Pie de Cuba (Lagares Bodega)			
Vendimia	Cepas utilizadas	Nº escalamientos	Duración aproximada
2001	P2, P3 y P5	3	20 días
2002	P2, P5 y P5.I	4	27 días
2003	P2, P5 y P5.I	4 en P. Cuba A, con subdivisiones	17 días
		3 en P. Cuba B, sin subdivisiones	14 días
2004	P2 y P5	7 en P. Cuba A	31 días
		5 en P. Cuba B	26 días
2005	P5	4 en P. Cuba A	25 días
		3 en P. Cuba B	20 días

**Tabla 29.** Resumen de la segunda fase de elaboración del Pie de Cuba en las 5 vendimias inoculadas, llevada a cabo en los lagares de elaboración de la Bodega. Se muestra las cepas utilizadas en cada vendimia (patrón cromosómico), el número de escalamientos y la duración del proceso.

Según los resultados obtenidos en cada vendimia, podemos afirmar que la elaboración del pie de cuba es el paso inicial del proceso de vinificación que más hay que controlar para asegurar la implantación de las cepas que se utilicen como iniciadoras de las fermentaciones. Los factores que en este paso pueden afectar al desarrollo de las cepas inoculadas durante las fermentaciones son principalmente: (i) escalamientos; (ii) temperatura y (iii) recargas de mosto fresco.

### (i) Escalamientos

Durante este proceso es importante:

- (a) Dejar que en el mosto se agoten los azúcares antes de realizar los escalamientos a volúmenes mayores de mosto fresco, lo cual:
- Favorece el desarrollo de las cepas inoculadas ya que éstas fueron aisladas de la última fase de la fermentación y por tanto son tolerantes al etanol.
  - Al adicionar el inóculo al mosto fresco, evita que se desarrollen otras poblaciones de levaduras *S. cerevisiae* indígenas que acompañan al mosto y que pueden, en algunos casos, cambiar la dinámica de las poblaciones no dejando que se implanten las inoculadas en su totalidad, pudiendo con ello aportar características distintas al producto final.

- Evita el desarrollo de levaduras no-*Saccharomyces* normalmente presentes en el mosto y en las primeras horas de la fermentación. Cuando se realizan los escalamientos y se adiciona el pie de cuba al mosto fresco, si el contenido en azúcar es bajo, el medio queda parcialmente alcoholizado (fermentación súper 4 o súper 8), no siendo adecuado para la propagación de la mayoría de las especies no-*Saccharomyces*.

(b) Homogeneizar bien los recipientes donde se encuentra fermentando el pie de cuba antes de realizar los escalamientos, durante la primera fase de elaboración; y durante la segunda fase, en bodega, en la medida de lo posible.

## (ii) Temperatura

El control de la temperatura tanto durante la elaboración del pie de cuba, y durante las fermentaciones en los depósitos es muy importante porque afecta directamente a la viabilidad celular y además puede cambiar la dinámica de las poblaciones de las levaduras como observamos en la vendimia 2002 (Figura 58). Hemos comprobado (apartado 2.2.1 de los resultados), que a 14 °C, en cultivos puros, la fase de latencia de las cepas seleccionadas es más larga porque la viabilidad de las células es más baja que a 20 °C. Si en el caso del pie de cuba la temperatura es inferior a 14 °C puede ocurrir que, si la viabilidad de las cepas seleccionadas disminuye, sean otras cepas indígenas presentes en el mosto las que se desarrollen desplazando a las inoculadas. Además cuando se realizan los escalamientos, si las cepas seleccionadas tienen fases de latencia algo más largas que a 20 °C, tardan más en adecuarse al medio, con lo cual estas cepas indígenas, mejor acondicionadas a esas condiciones puntuales del mosto, se pueden desarrollar mejor. El control de la temperatura en los inicios del proceso de fermentación es tan importante que en determinados tipos de vinificaciones llevadas a cabo a bajas temperaturas se ha propuesto la pre-adaptación de las cepas de levaduras a esas temperaturas para mejorar el desarrollo de las fermentaciones (Llauradó y col. 2005).

### **(iii) Recargas de mosto**

El mosto utilizado, aunque procedió de la variedad de uva *Palomino Fino*, constituye una materia prima no homogénea en la cual la composición química y microbiológica varía de un año a otro en función de determinados factores como las condiciones climáticas, maduración de las uvas, etc.

Se ha comprobado que el mosto fresco implica una fuente de nuevas cepas de levaduras, bien pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* o bien de otros géneros distintos. Además el hecho de que la composición química del mosto varíe de un año a otro, hace que puedan existir determinadas cepas de levaduras que estén mejor adaptadas a dichas condiciones que las cepas seleccionadas, que fueron aisladas bajo otras condiciones del mosto, aunque sí muy similares. Asimismo, la variación en las concentraciones de nitrógeno asimilable en el mosto puede producir un “efecto selectivo” sobre las cepas de *S. cerevisiae* (Granchi y col. 2003).

Como es imposible esterilizar el mosto, si no se controlan los pasos de los escalamientos y la temperatura como se ha comentado anteriormente, es posible que otras cepas indígenas se desarrollen mejor que las cepas inoculadas llegando incluso a detectarse en altas proporciones las fermentaciones, como se ha mostrado para la cepa con patrón P27 en la vendimia 2002.

## **2.7. Fermentaciones inoculadas con levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) frente a fermentaciones espontáneas y a las inoculadas con levadura comercial (LSA)**

Existe una considerable controversia sobre la utilización de cepas seleccionadas en las fermentaciones del vino. En las fermentaciones espontáneas participan una gran diversidad de cepas de levaduras y se da una sucesión de poblaciones durante todo el proceso, predominando al final cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se piensa que esta variabilidad de cepas es la que aporta al vino la complejidad y cualidades sensoriales típicas de una región enológica determinada.

Algunos autores sugieren que la utilización de cepas seleccionadas representa un inconveniente porque pueden suprimir significativamente el desarrollo de estas cepas indígenas durante la fermentación (Lambrechts & Pretorius 2000), y sin embargo otros aseguran que inocular con cepas seleccionadas favorece el desarrollo de otras cepas silvestres porque se inhibe el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* (Heard & Fleet 1985).

Por otro lado, existen ciertos riesgos cuando en la industria se fermenta de manera espontánea porque, pueden darse inicios tardíos de las fermentaciones, procesos lentos o incluso pargas fermentativas no llegándose a agotar todos los azúcares del medio y no alcanzando el grado alcohólico deseado. Además, las características del mosto utilizado pueden variar de un año a otro dependiendo de la calidad de la cosecha, variando por tanto las características del producto final. En este sentido en los últimos años se tiende a utilizar cada vez más levaduras seleccionadas liofilizadas (LSA: levadura seca activa), disponibles en el mercado, que aseguran el inicio de la fermentación, el curso y la finalización de esta con el agotamiento total de los azúcares. El inconveniente que presenta utilizar estas levaduras es que como normalmente no son aisladas de la región productora en la que se utilizan, se tiende a perder la tipicidad de los vinos y a obtener productos más homogéneos. Además se ha comprobado que en algunos casos no llegan a predominar de forma mayoritaria durante las fermentaciones llevadas a cabo en condiciones industriales, compitiendo con otras indígenas (Esteve-Zarzoso y col. 2000; Florido 2000; Lopes y col. 2007) lo cual demuestra que las cepas autóctonas están mejor adaptadas a las condiciones de la fermentación que las cepas comerciales.

En muchas regiones productoras de vino, como solución a los riesgos que lleva implícito fermentar de manera espontánea y para no utilizar levaduras comerciales foráneas, se han aislado y seleccionado cepas autóctonas para utilizarlas como iniciadoras de las fermentaciones en condiciones industriales (Querol y col. 1992c; Esteve-Zarzoso y col. 2000; Lopes y col. 2007;). De esta forma se pueden conservar las propiedades sensoriales típicas de cada región productora de vino.

Además las cepas autóctonas están dotadas de propiedades enológicas totalmente comparables a las levaduras comerciales (Martini 2003), produciendo compuestos volátiles que contribuyen a las características sensoriales específicas de los vinos locales (Egli y col. 1998; Guerra y col. 1999; Martini 2003). En relación a las levaduras comerciales, en el apartado 2.1.1 de los resultados de la Tesis, (Tabla 25) se comprobó que la cepa comercial llamada Fermivin mostró un poder fermentativo similar al de las cepas autóctonas seleccionadas, además de un comportamiento análogo en las curvas de crecimiento celular bajo distintas temperaturas (apartado 2.2.1). No obstante, cabe destacar que en los análisis sensoriales realizados no presentó los aromas y sabores característicos del vino en estudio, mientras que las cepas autóctonas sí los mostraron (Tabla 24).

En otros estudios, en los que se han comparado fermentaciones inoculadas con cepas autóctonas y las inoculadas con cepas comerciales, los resultados indicaron que los vinos obtenidos en el primer caso tuvieron unas características sensoriales mejores que los segundos, obtenidos tras las fermentaciones inoculadas con levaduras comerciales (LSA) (Querol y col. 1992b; Lopes y col. 2007).

En nuestro estudio se ha llevado a cabo una caracterización genética y selección de cepas autóctonas como se describe en el apartado 1 de los resultados. De las cepas seleccionadas inicialmente, la de cariotipo P5 fue la que mostró mejor capacidad de implantación en las fermentaciones inoculadas en condiciones industriales (Tabla 30). En la vendimia 2001, aunque se detectaron las cepas inoculadas con patrones P2 y P3 al comienzo de las fermentaciones en los depósitos, la cepa que se implantó de forma mayoritaria fue la de patrón P5. En la vendimia 2004 de las dos inoculadas con patrones P2 y P5 se implantó al 100% la de patrón P5. Y en la última vendimia, en 2005, la cepa inoculada predominó de forma mayoritaria en todos los depósitos analizados excepto en uno, el E (Figura 77). En estas tres vendimias se obtuvo un producto final que fue calificado como excelente con respecto al obtenido en vendimias con fermentaciones espontáneas (1999 y 2000), siendo la cepa de patrón P5 la responsable de las buenas características del vino obtenido. En estas tres vendimias, cuando esta cepa predominó, lo hizo desde el comienzo de las fermentaciones en los depósitos, desplazando a otras cepas indígenas presentes en el mosto, disminuyendo la variabilidad de cepas, no

detectándose por tanto polimorfismo cromosómico entre la población de levaduras. En estas vendimias además la maduración de las uvas y la calidad de las cosechas fueron muy buenas. En las vendimias donde no hubo un claro predominio de las cepas inoculadas (2002 y 2003) el vino obtenido presentó también buenas características sensoriales, aunque no tan destacadas como en las tres vendimias anteriores. En general podemos afirmar que el vino obtenido de las fermentaciones inoculadas con cepas autóctonas tuvo unas propiedades organolépticas mejoradas con respecto al obtenido de las fermentaciones espontáneas.

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en otros trabajos. Por ejemplo Querol y colaboradores (Querol y col. 1992b) cuando inocularon con una cepa autóctona seleccionada las fermentaciones en condiciones industriales (15.000 litros), observaron alta variabilidad de cepas al comienzo de las fermentaciones siendo al final del proceso cuando se implantó la cepa inoculada, aunque no al 100%, existiendo por tanto una competición entre ésta y otras indígenas.

Por otro lado Lopes y colaboradores (Lopes y col. 2007) cuando estudian fermentaciones inoculadas también en condiciones industriales (10.000 litros) con una cepa autóctona de La Patagonia (Argentina) ponen de manifiesto que la dominancia de la cepa autóctona, en una bodega, en la que nunca se utilizaron levaduras comerciales, fue más baja que en otra donde sí lo hacían, siendo en la primera del 40% y en la segunda del 80%. Detectaron que al comienzo de la fermentación en la primera bodega hubo una variabilidad alta de otras cepas indígenas de *S. cerevisiae*.

En nuestro estudio, en la bodega donde se llevaron a cabo las fermentaciones, en años anteriores a 2001 no se utilizaron cepas comerciales para llevar a cabo las fermentaciones del vino estudiado. Pensamos que el éxito de la implantación de nuestra cepa seleccionada con patrón P5 en las tres vendimias mencionadas anteriormente, está en la forma de inocular las fermentaciones, es decir, en la elaboración del pie de cuba, que en nuestro trabajo fue necesario debido al sistema industrial tan complejo por los volúmenes tan elevados a fermentar, 400.000 litros.

Vendimias	2001	<p><b>Climatología:</b> Temperaturas no excesivas, permitiendo una maduración de las uvas eficaz</p> <p><b>Cosecha:</b> Excelente, con una sanidad de las uvas y estado de maduración en condiciones óptimas</p> <p><b>Cariotipo cepas inoculadas:</b> P2, P3 y P5</p> <p><b>Calidad producto final:</b> Vino calificado como excelente. Redondo, muy perfumado, largo y persistente</p> <p><b>Implantación cepas:</b> P5 y P5.I (100% aprox.)</p>
	2002	<p><b>Climatología:</b> Año con escasas lluvias durante el crecimiento vegetativo de las vides. Maduración de las uvas con temperaturas suaves que hicieron retrasar 10 días la vendimia</p> <p><b>Cosecha:</b> Considerada muy buena</p> <p><b>Cariotipo cepas inoculadas:</b> P2, P5 y P5.I</p> <p><b>Calidad producto final:</b> Vino con buena calificación, suave, fresco, delicado, con aromas de flor de eucalipto y laurel</p> <p><b>Implantación cepas:</b> No las inoculadas sino otras con cariotipos P27 (60%) y P35 (20% aprox.)</p>
	2003	<p><b>Climatología:</b> Altas temperaturas durante el periodo de maduración de las uvas debido a vientos de levante</p> <p><b>Cosecha:</b> Muy buena, con una rápida maduración de las uvas debido a las altas temperaturas</p> <p><b>Cariotipo cepas inoculadas:</b> P2, P5 y P5.I</p> <p><b>Calidad producto final:</b> Vino con buena calificación. Presentó aromas de fruta madura, de flores silvestres en verano, un punto balsámico, gustoso y persistente</p> <p><b>Implantación cepas:</b> P5 parcialmente, alta variabilidad de otras cepas con cariotipos similares a P5</p>
	2004	<p><b>Climatología:</b> Año con temperaturas moderadas, donde la pluviometría superó con creces a la media</p> <p><b>Cosecha:</b> Considerada muy buena, con maduración de las uvas lenta y progresiva</p> <p><b>Cariotipo cepas inoculadas:</b> P2 y P5</p> <p><b>Calidad producto final:</b> Vino con una calificación muy alta. Resultó elegante, suave, con aromas de flores blancas y de manzana. Sutil y delicado</p> <p><b>Implantación cepas:</b> P5 (100%)</p>
	2005	<p><b>Climatología:</b> Año con pluviometría muy baja, llegando a la mitad del promedio. Temperaturas adecuadas durante la maduración de las uvas</p> <p><b>Cosecha:</b> Considerada excelente, con una buena maduración de las uvas</p> <p><b>Cariotipo cepas inoculadas:</b> P5</p> <p><b>Calidad producto final:</b> Vino calificado como excelente. Presentó notas de fruta madura, flores de verano, pastelería, un punto balsámico. En boca tuvo entrada suave con buena evolución, manteniéndose en el tiempo. Fue redondo, con buen cuerpo y amplio</p> <p><b>Implantación cepas:</b> P5 (90-95%, excepto en un depósito, el E)</p>

**Tabla 30.** Resumen de las 5 vendimias que fueron inoculadas, se muestra las condiciones climatológicas, calidad de las cosechas, cepas utilizadas en las fermentaciones y calificación, por parte del personal de la bodega especializado en catas, del producto final. Se indica también las cepas que predominaron en las fermentaciones en cada año estudiado.

Nuestros resultados, aunque no hicimos controles paralelos con cepas comerciales, apoyan la hipótesis de que las cepas autóctonas seleccionadas están mejor adaptadas a las características particulares de una determinada región



productora de vino que las cepas comerciales foráneas (Romano y col. 2003; Esteve-Zaroso y col. 2000; Versavaud y col. 1995).

### 3. Análisis global de la diversidad genética de las cepas detectadas en las fermentaciones durante 7 vendimias consecutivas en una misma zona geográfica

Mediante la técnica de *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE) se han caracterizado durante siete años consecutivos un total de 1.955 cepas aisladas de las fermentaciones llevadas a cabo en los depósitos, sin tener en cuenta las cepas aisladas del pie de cuba, tanto en procesos espontáneos como inoculados con levaduras autóctonas seleccionadas. Tras la caracterización, los cariotipos obtenidos se agruparon en 57 patrones cromosómicos distintos. La distribución y proporción de estos patrones en cada año estudiado se muestra en la Tabla 31. Por tanto en la tabla no se han incluido las proporciones de patrones detectados en los pies de cuba analizados tanto en la vendimia espontánea como en las inoculadas. Por ejemplo, en 1999 se detectó el patón P18 que correspondió a un solo aislamiento el cual no se representa en la tabla. Y en la vendimia inoculada 2003, donde hubo mayor variabilidad de cepas con respecto al resto de las inoculadas en condiciones industriales, se detectaron los patrones P4, P31, P54, P55 (Figura 68) y P45 (Figura 69), los tres últimos exclusivos de esta vendimia. Los porcentajes de estos patrones en 2003 tampoco se exponen en la tabla.

La tabla nos da una idea de la distribución de las cepas implicadas en las fermentaciones realizadas en la zona de vinificación estudiada durante los siete años estudiados, de la permanencia de algunas de ellas y de la variación de otras de un año a otro tanto en fermentaciones espontáneas como inoculadas.

Observamos que a medida que se fueron analizando las vendimias en años sucesivos se fueron detectando **cepas nuevas**, tanto en las fermentaciones espontáneas como en las inoculadas. En las vendimias espontáneas de 1999 y 2000 además de observarse una variabilidad de cepas muy elevada, en 2000 se detectaron cepas que no estuvieron presentes el año anterior y que mostraron cariotipos nuevos que fueron P26 hasta P33, siendo los patrones P29, P31, P32 y P33 exclusivos de las fermentaciones espontáneas de esta vendimia. En la vendimia 1999 como patrones exclusivos se tuvieron a P6, P11, P12, P14 y P15. En trabajos previos se ha determinado que las poblaciones de levaduras pueden variar de un año a otro dentro

de una misma zona enológica (Naumov y col. 2000; Torija y col. 2001) los cual está de acuerdo con nuestros resultados.

En el año 2000 también se realizaron dos experimentos de fermentaciones inoculadas con cepas autóctonas en condiciones semi-industriales, observándose que en el Experimento 1, donde hubo una variabilidad genética más elevada que en el Experimento 2, se detectaron cepas exclusivas de forma minoritaria como las de patrón P22, P23, P24 y P25, no detectadas en las fermentaciones espontáneas analizadas este mismo año. Este hecho pudo ser debido a que el mosto utilizado procedió de uvas más maduras, ya que los experimentos 1 y 2 fueron realizados prácticamente al final de la vendimia, pudiendo condicionar este hecho la presencia de estas cepas.

En cuanto a las vendimias inoculadas con las cepas autóctonas seleccionadas en condiciones industriales, en las vendimias 2002 y 2003, en las cuales no hubo un claro predominio de las cepas inoculadas, se detectaron también cepas con patrones nuevos, no observados en otras vendimias. Por ejemplo en 2002 fueron las de patrones P35, P38, P39, P40 y P41; y en el año 2003 fueron las que mostraron los patrones P43.22, P44, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52.19, P52.28 y P53 además de los detectados en el pie de cuba cuyas proporciones no se muestran en la tabla y que fueron P45, P54 y P55.

En relación a las otras vendimias inoculadas en las que se observó una buena implantación de una de las cepas, la de patrón P5, también se detectaron levaduras nuevas. Por ejemplo en la vendimia 2001 sólo se detectó un patrón nuevo, P34, con respecto a las vendimias anteriores; y en 2005 fueron las cepas con patrones P56 y P57 que sí fueron exclusivos de esta vendimia. En el año 2004 no se encontraron cepas nuevas y sólo se detectaron las inoculadas con patrones P2 y P5.

Cariotipos	Fermentaciones Espontáneas		Fermentaciones Inoculadas						
	1999	2000	2000 Exp. 1	2000 Exp. 2	2001	2002	2003	2004	2005
P1	17 (8,1%)	1 (0,4%)	1 (0,9%)	-	-	1 (0,6%)	1 (0,4%)	-	-
P2	46 (21,8%)	31 (21,8%)	17 (15,4%)	34 (45,9%)	32 (7,6%)	16 (9,2%)*	8 (3,6%)	1 (0,4%)	-
P3	16 (7,6%)	8 (3,5%)	4 (3,6%)	-	36 (8,5%)	-	-	-	-
P4	7 (3,3%)	2 (0,9%)	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P5	69 (32,7%)	106 (46,5%)	39 (35,4%)	22 (29,7%)	351 (82,9%)	1 (0,6%)	43 (19,3%)	234 (99,6%)	222 (79,8%)
P6	1 (0,5%)	-	-	-	-	-	-	-	-
P7	11 (5,2%)	4 (1,7%)	2 (1,8%)	8 (10,8%)	-	-	-	-	-
P8 (N.S)	8 (3,8%)	22 (9,6%)	21 (19,6%)	4 (5,4%)	1 (0,2%)	-	1 (0,4%)	-	1 (0,4%)
P9	12 (5,7%)	2 (0,9%)	-	-	-	-	-	-	-
P10	4 (1,9%)	3 (1,3%)	-	1 (1,3%)	-	-	-	-	-
P11	2 (1%)	-	-	-	-	-	-	-	0
P12	1 (0,5%)	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	2 (1%)	2 (0,9%)	-	-	-	-	-	-	-
P14	2 (1%)	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	1 (0,5%)	-	-	-	-	-	-	-	-
P16	4 (1,9%)	15 (6,6%)	7 (6,4%)	1 (1,3%)	-	-	-	-	-
P17	7 (3,3%)	12 (5,3%)	1 (0,9%)	1 (1,3%)	1 (0,2%)	-	-	-	-
P18	-	9 (3,9%)	11 (10%)	1 (1,3%)	-	1 (0,6%)	1 (0,4%)	-	-
P22	-	-	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P23	-	-	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P24	-	-	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P25	-	-	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P26	-	2 (0,9%)	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P27	-	1 (0,4%)	-	2 (2,7%)	-	103 (59,2%)	18 (8%)	-	-
P28	-	2 (0,9%)	1 (0,9%)	-	-	-	-	-	-
P29	-	2 (0,9%)	-	-	-	-	-	-	-
P30	-	1 (0,4%)	-	-	1 (0,2%)	-	-	-	-
P31	-	1 (0,4%)	-	-	-	-	-	-	-
P32	-	1 (0,4%)	-	-	-	-	-	-	-
P33	-	1 (0,4%)	-	-	-	-	-	-	-
P34	-	-	-	-	1 (0,2%)	-	1 (0,4%)	-	-
P35	-	-	-	-	-	39 (22,4%)	-	-	-
P36	-	-	-	-	-	1 (0,6%)	21 (9,4%)	-	-
P37	-	-	-	-	-	3 (1,7%)	4 (1,8%)	-	-
P38	-	-	-	-	-	4 (2,3%)	-	-	-
P39	-	-	-	-	-	1 (0,6%)	-	-	-
P40	-	-	-	-	-	1 (0,6%)	-	-	-
P41	-	-	-	-	-	2 (1,1%)	-	-	-
P42	-	-	-	-	-	1 (0,6%)	2 (0,9%)	-	-
P43,10	-	-	-	-	-	-	29 (13%)	-	3 (1,3%)
P43,22	-	-	-	-	-	-	12 (5,4%)	-	-
P44	-	-	-	-	-	-	1 (0,4%)	-	-
P45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P46	-	-	-	-	-	-	1 (0,4%)	-	-
P47	-	-	-	-	-	-	1 (0,4%)	-	-
P48	-	-	-	-	-	-	33 (14,8%)	-	-
P49	-	-	-	-	-	-	10 (4,5%)	-	-
P50	-	-	-	-	-	-	1 (0,4%)	-	-
P51	-	-	-	-	-	-	2 (0,9%)	-	-
P52,19	-	-	-	-	-	-	3 (1,3%)	-	-
P52,28	-	-	-	-	-	-	29 (13%)	-	-
P53	-	-	-	-	-	-	1 (0,4%)	-	-
P56	-	-	-	-	-	-	-	-	51 (18,3%)
P57	-	-	-	-	-	-	-	-	1(0,4%)
<b>Nº total de cepas</b>	210	228	110	74	423	174	223	235	278

**Tabla 31.** Distribución de patrones cromosómicos de las cepas de levaduras aisladas de las fermentaciones llevadas a cabo en condiciones industriales en las 7 vendimias estudiadas. (\*) en la Vendimia 2002 corresponde al porcentaje de cepas con un patrón similar a P2.

En las vendimias inoculadas, es posible que la detección de cepas nuevas sea debida en gran medida al mosto, porque supone una fuente de microorganismos como se ha comentado anteriormente, y también a la adición del inóculo iniciador,

ya que se ha descrito que en algunos casos la inoculación no sólo modifica la población por dominancia de la cepa inoculada, sino que también modifica a las cepas indígenas de *S. cerevisiae* permitiendo el desarrollo de éstas que a veces no se pueden desarrollar en una fermentación espontánea (Lopes y col. 2007).

Santamaría y colaboradores (2005) afirman que la diversidad de levaduras presentes en el ecosistema de una bodega puede depender de las condiciones de cada cosecha (composición del mosto, adición de anhídrido sulfuroso, proceso de elaboración, temperatura, etc.) pudiendo éstas determinar el desarrollo de cepas específicas durante la fermentación.

Por lo tanto podríamos decir que la presencia y frecuencia de aparición de determinadas cepas, identificadas mediante el perfil cromosómico, variaron de un año a otro dentro de la misma zona geográfica estudiada. Esta variación pudo haber sido debida a las características del mosto obtenido en cada vendimia, que también fueron variables, o bien debido a la práctica de inocular con cepas seleccionadas. Asimismo no descartamos que la aparición de las cepas nuevas pueda ser debida a la existencia de una alta diversidad de cepas residentes de la bodega, como se ha determinado en otros estudios (Torija y col. 2001).

Sin embargo, además de la aparición de cepas nuevas en las sucesivas vendimias, en la tabla también se pone de manifiesto la **permanencia** de algunas de ellas de un año a otro, tanto entre las vendimias espontáneas, entre las espontáneas y las inoculadas, y entre las inoculadas en condiciones industriales.

En el apartado 1.6 de los resultados de la tesis discutíamos la posibilidad de que determinadas cepas fueran residentes de la bodega pasando más tarde a formar parte de las fermentaciones del mosto ya que detectamos 12 patrones comunes entre las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en 1999 y 2000. Después, tras obtener los resultados en las siguientes vendimias comprobamos la presencia de más cepas comunes entre ellas. Por ejemplo algunas cepas presentes en al menos tres vendimias fueron las de patrón P17 detectadas en las fermentaciones espontáneas en 1999 y 2000, y de forma minoritaria en las inoculadas en 2000 (Exp. 1 y Exp. 2) y en 2001; cepas con patrón P18 detectadas en las vendimias 1999, en el pie de cuba

(no se muestra en la tabla), en 2000 tanto en las fermentaciones espontáneas como en las dos inoculadas, y en 2002 y 2003; las de patrón P27 detectadas en la vendimia de 2000, tanto en las fermentaciones espontáneas como en la fermentación inoculada del Exp. 2, y en las vendimias inoculadas en 2002 (de forma mayoritaria) y en 2003. La detección de estas cepas en varios años apoya la idea sugerida en el apartado 1.6. de que se trate de levaduras residentes de la bodega, pudiendo estar asociadas a los depósitos de fermentación o a las superficies del equipamiento de la bodega (Beltran y col. 2002; Martini 2003; Pretorius 2000; Sabate y col. 2002; Sangorri y col. 2002; Torija y col. 2001; Vaughan-Martini & Martini 1995), entrando posteriormente a formar parte de las fermentaciones (Le Jeune y col. 2006; Ciani y col. 2004). Estas cepas no se detectaron en las vendimias 2004 y 2005 en las que el predominio de una de las cepas inoculadas fue del 100 y 80% respectivamente, lo cual no significó que no estuvieran presentes, sino que al predominar la cepa inoculada no se detectaron.

Otras cepas comunes pero presentes en sólo dos vendimias fueron las de patrones, P4, P7, P10 y P16 detectadas en 1999 y en 2000; y predominando se detectaron las cepas con patrones P2 y P5 en un 21,8% y 32,7% respectivamente en 1999, y en un 21,8% y 46,5% en la vendimia 2000. Esta predominancia podría ser interpretada como una consecuencia de su prevalencia entre la microbiota local y de su buen estado fisiológico (tecnológico) (Versavaud y col. 1995). Además, la persistencia de estas cepas en las dos vendimias espontáneas indica que se trate de cepas representativas de esta zona geográfica, como se ha observado en otros estudios (Vezinhet y col. 1992; Sabate y col. 1998; Martínez y col. 2004; Le Jeune y col. 2006). Incluso se ha llegado a establecer la relación de determinadas especies de levaduras con zonas específicas de producción, como por ejemplo es el caso de la especie *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* asociada a los vinos de Tokaj (Naumov y col. 2002).

Entre las vendimias inoculadas en condiciones industriales las cepas comunes (sin tener en cuenta las inoculadas de patrones P2, P3 y P5), en al menos dos vendimias, fueron las de patrones P34 en 2001 y 2003; P36, P37 y P42 en las vendimias 2002 y 2003; y P43.10 en 2003 y 2005. Estas cepas podríamos pensar que estuvieron presentes en el mosto de cada vendimia y que al menos permanecieron

estables de un año a otro (Frezier & Dubordieu 1992; Vezinhet y col. 1992), ya que no tenemos la certeza de que sean residentes de la bodega.

## 4. Estudio de la estabilidad de los cariotipos

### 4.1. Polimorfismo detectado entre las cepas caracterizadas en la Vendimia 2001

En el apartado 1 de los resultados se llevó a cabo en la vendimia de 1999 un estudio de caracterización de las levaduras silvestres implicadas en las fermentaciones espontáneas de los mostos obtenidos a partir de la variedad de uva *Palomino Fino*. La caracterización de las cepas se realizó utilizando la técnica molecular de *Electroforesis en Campo Pulsante* (PFGE). Se analizó un depósito exhaustivamente en distintos momentos de la fermentación desde el inicio hasta su finalización. Los resultados revelaron la existencia de una elevada variabilidad genética entre los aislamientos analizados, similar a la encontrada en otras regiones del mundo productoras de vino, como ya se comentó en el mismo apartado de los resultados.

A partir de esta caracterización se planteó un esquema de selección para elegir aquellas cepas de levaduras más apropiadas para conducir las fermentaciones en un proceso industrial. El primer paso en este esquema fue reducir el número de aislamientos a estudiar de manera que se eligieron cuatro cepas al azar de entre aquéllas que mostraron patrones cariotípicos mayoritarios, siendo además alcohol-tolerantes porque se eligieron de la última fase de la fermentación en el depósito estudiado.

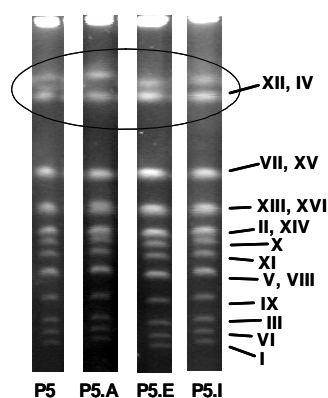
El segundo paso fue analizar algunos parámetros de interés enológico con las cepas elegidas, haciéndose dos tipos de análisis: (i) microbiológicos, estudiándose propiedades como poder fermentativo, inhibición por etanol, y el factor killer; y (ii) moleculares, estudiando la capacidad de implantación de las cuatro cepas en fermentaciones en condiciones semi-industriales en la siguiente vendimia (2000). El seguimiento de las cepas inoculadas se hizo mediante la técnica de PFGE, una vez finalizadas las fermentaciones.

Tras estos estudios se seleccionaron tres cepas autóctonas 313.4, 313.10 y 153.12 para ser inoculadas en condiciones industriales y ser ellas las que dirigieran



la fermentación en varios depósitos en la vendimia siguiente, 2001. Para este fin fue necesaria la realización de un pie de cuba (cultivo iniciador) con cada una de las cepas. La elaboración del pie de cuba tuvo dos fases, una primera, llevada a cabo en el laboratorio de Microbiología (UCA) donde se hizo en condiciones muy controladas, es decir, utilizando pequeños volúmenes de mosto estéril que fueron inoculados a partir de las cepas crecidas en medio sólido YPD y haciendo escalamientos hasta llegar a 20 litros; y otra segunda fase que tuvo lugar en los lagares de elaboración donde los pies de cuba de las tres cepas se mezclaron para adicionarlos a volúmenes mayores de mosto en sucesivos escalamientos. El volumen de pie de cuba final se utilizó para iniciar las fermentaciones en los depósitos, en los cuales se fueron realizando recargas de mosto fresco hasta completar el volumen final a fermentar (400.000 litros).

El control microbiológico para comprobar la implantación de las cepas seleccionadas se realizó mediante PFGE, una vez finalizada la vendimia. Para ello, durante la fermentación se fueron recogiendo muestras a diario, que se conservaron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento. Se analizaron muestras de las distintas fases de la fermentación, inicio, mitad y final, en distintos depósitos. Los resultados del análisis de los cariotipos electroforéticos revelaron la implantación del 100 % de una de las cepas inoculadas, 153.12 con patrón P5, en todos los depósitos estudiados. Las otras dos cepas sólo se detectaron durante la elaboración del pie de cuba. Junto a la cepa con patrón P5 se detectaron otras con cariotipos muy similares a ésta y además en porcentajes significativos. Los patrones de estas cepas fueron P5.A, P5.E y P5.I y se diferenciaron con respecto al de la cepa inoculada sólo en variaciones de las bandas presentes en la parte superior del gel (indicado con un círculo azul en la (Figura 79), zona correspondiente a la de los cromosomas de mayor tamaño, IV y XII, y por tanto de baja movilidad electroforética.



**Figura 79.** Cariotipo electroforético de la cepa inoculada, P5 y de las que mostraron patrones similares, P5.A, P5.E y P5.I, detectados durante las fermentaciones en la vendimia 2001.

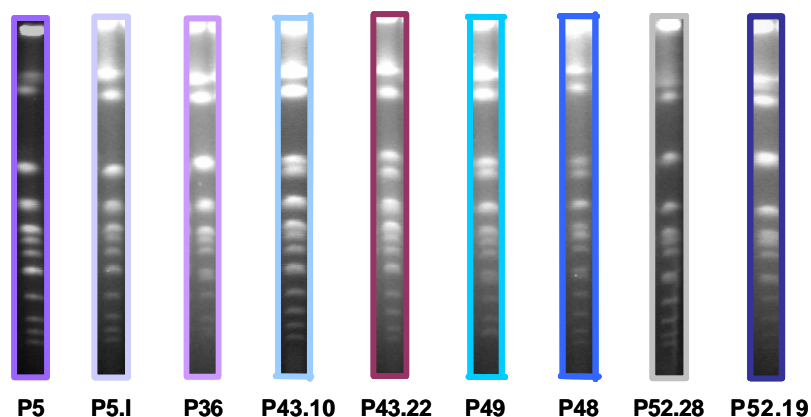
Estas variaciones, también observadas en otras cepas de levaduras silvestres, parece que están relacionadas con reorganizaciones de las repeticiones de los genes ribosómicos (rDNA) presentes en el cromosoma XII (Carro & Piña 2001). En el apartado 4.4.1 de los resultados se comprobó que las cepas con cariotipos P5 y P5.I tras 300 generaciones en crecimiento vegetativo presentaron estas variaciones y fueron debidas a estos genes.

Por otro lado, apoyándonos en la hipótesis de que cepas con el mismo patrón de restricción mitocondrial e idéntico cariotipo, exceptuando las variaciones en el cromosoma XII, están muy relacionadas genéticamente (Nadal y col. 1996), se analizó el *Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción* para el ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) para estas cepas con tres enzimas, *Hinf I* (H), *Rsa I* (*Afa I*) (R) y *Alu I* (A). Los resultados revelaron que las 4 cepas tuvieron el mismo patrón de restricción que llamamos H1R1A1, considerándolas por lo tanto cepas estrechamente relacionadas.

Durante el estudio de caracterización de esta vendimia se vio que ninguno de los clones reorganizados, aislados de la fermentación, desplazaba a la cepa inoculada con cariotipo P5, de manera que no parece que hubiese una ventaja selectiva en estas posibles reorganizaciones observadas para la cepa con cariotipo P5.

#### **4.2. Polimorfismo detectado entre las cepas caracterizadas en la Vendimia 2003**

En la vendimia 2003 para inocular las fermentaciones se utilizaron las cepas 313.4, 153.12 y 48.5 con patrones cromosómicos P2, P5 y P5.I respectivamente, de manera que para iniciar el proceso se preparó un pie de cuba, primero en el laboratorio y después en los lagares de elaboración, para posteriormente ser inoculado en los depósitos de fermentación. El análisis del cariotipo electroforético obtenido a partir de los aislamientos realizados de varias muestras tomadas durante la fermentación, reveló la presencia de dos de las cepas inoculadas, P5 y P5.I aunque no al 100%, detectándose cepas con un cariotipo similar al de P5/P5.I. Los cariotipos de estas cepas se muestran en la siguiente figura:

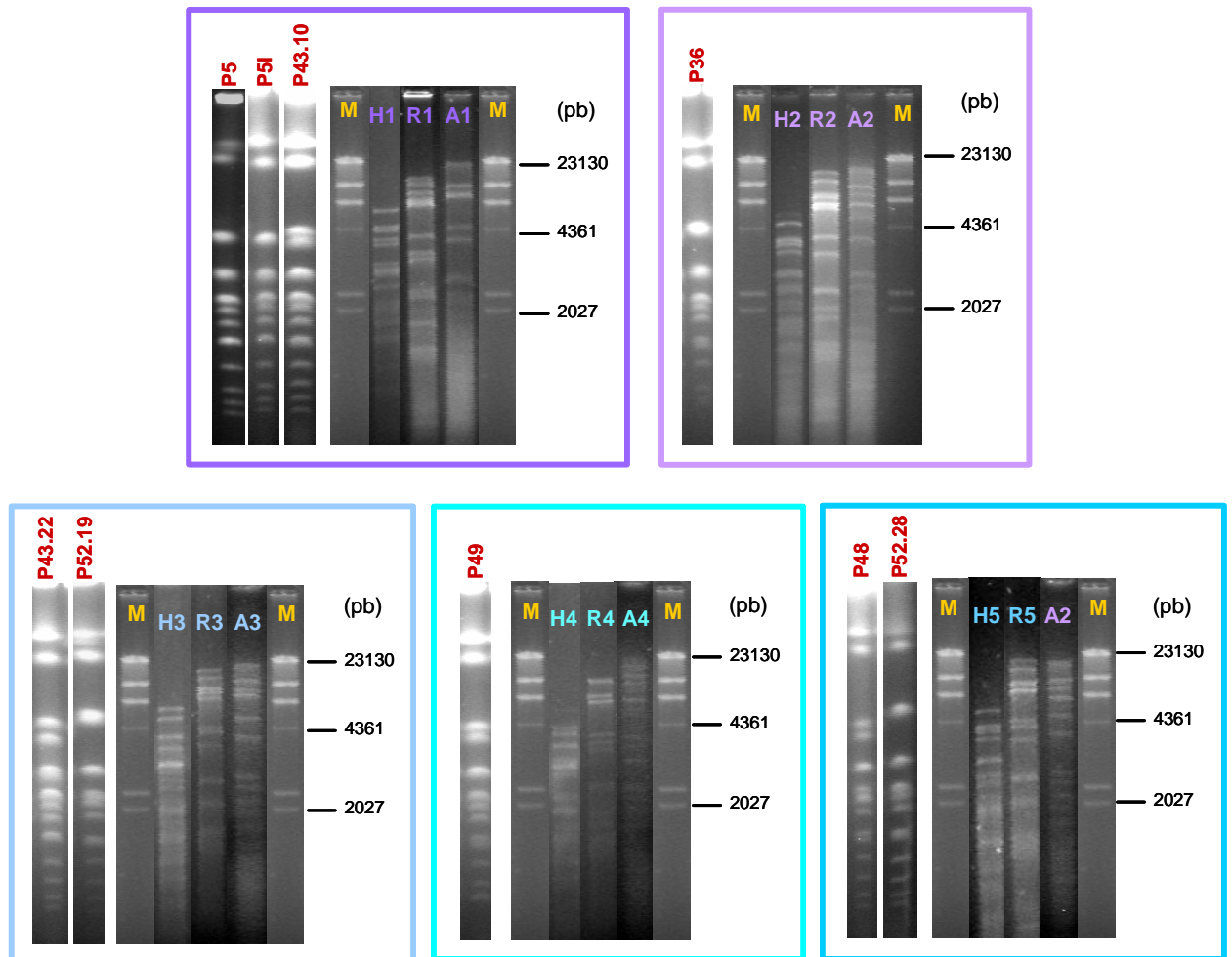


**Figura 80.** Cariotipos electroforéticos de las cepas inoculadas, P5 y P5.I, y de las similares detectadas durante las fermentaciones en la vendimia 2003.

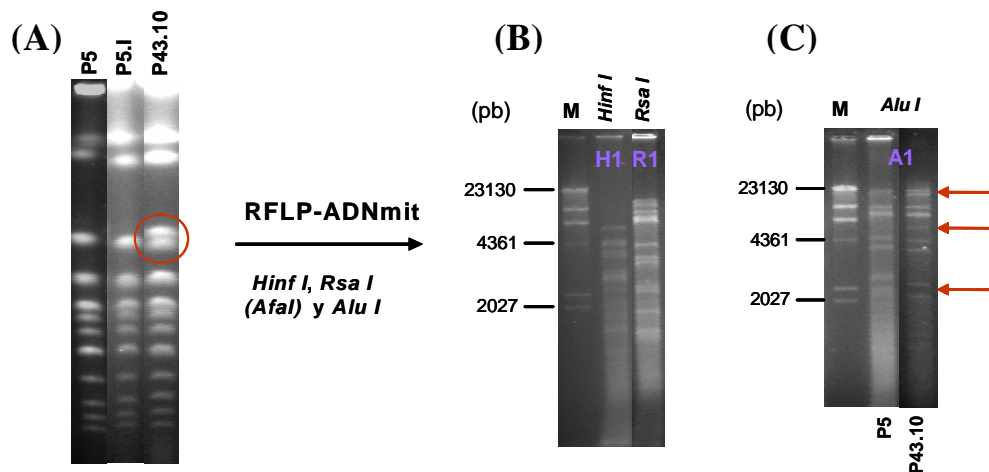
Algunas de estas cepas se llegaron a detectar en proporciones elevadas en las fermentaciones llevadas a cabo en esta vendimia como por ejemplo las de patrón P36 (9,4%), P43.10 (13%), P43.22 (5,4%), P48 (14,8%), P49 (4,5%) y P52.28 (13%), (ver Tabla 31).

Las variaciones que presentaron los cariotipos de estas cepas con respecto a las inoculadas P5/P5.I fueron por ejemplo la presencia de una banda extra (P43.10, P43.22, P48, P49), ausencia (P49) o cambios en la movilidad de las bandas (P36, P52). No hay seguridad de que estas cepas deriven de las cepas inoculadas, pero para tener una idea de la proximidad existente entre estas 9 cepas, se analizaron los RFLPs del ADN mitocondrial con las enzimas de restricción *Hinf I* (H), *Rsa I* (R) y *Alu I* (A), obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 81.

De las siete cepas nuevas, sólo una, la de cariotipo, P43.10 tuvo un perfil de restricción similar al de las cepas inoculadas, que llamamos H1R1A1. Fue similar, y no igual, porque el patrón de restricción para dos enzimas, *Hinf I* y *Rsa I* resultó igual para las tres cepas, pero con la tercera enzima, *Alu I*, presentaron algunas diferencias, por ejemplo en el caso de la cepa con cariotipo P43.10 el patrón de restricción para esta enzima tuvo algunas bandas adicionales, o ausencia de otras (flechas rojas de la Figura 82) con respecto a la cepa con cariotipo P5. Por lo tanto consideramos a la cepa con cariotipo P43.10 estrechamente relacionada con las cepas con cariotipos P5 y P5.I.



**Figura 81.** Perfiles de restricción del ADN mitocondrial de las cepas que mostraron cariotipos similares a los de las inoculadas, P5 y P5.I, con tres enzimas de restricción *Hinf I*, *Rsa I* y *Alu I*. El marcador molecular correspondió al fago lambda digerido con *Hind III* (M).



**Figura 82.** En (A) se representan los cariotipos electroforéticos P5 Y P5.I de las cepas inoculadas, y P43.10 similar a éstos; (B) muestra los patrones de restricción para el ADN mitocondrial con las enzimas *Hinf I* y *Rsa I* para las cepas con cariotipos P5, P5.I y P43.10; y en (C) se representa el perfil de restricción obtenido con la enzima *Alu I*, mostrando las diferencias (flecha roja) entre las cepas con cariotipos P5 y P43.10. El marcador molecular (M) correspondió al fago lambda digerido con *Hind III* (SIGMA).

El resto de las cepas mostraron patrones de restricción diferentes al de las cepas inoculadas de modo que no se pudo asegurar que fuesen cepas próximas a éstas, aunque cabe destacar que entre ellas sí que hubo algunas que presentaron el mismo patrón de restricción. Por ejemplo, las cepas con cariotipos P43.22 y P52.19, los cuales no fueron tan similares entre sí como en el caso de las cariotipos anteriores (P5, P5.I y P43.10) mostraron un patrón de restricción igual del tipo H3R3A3, y las cepas con cariotipos P48 y P52.28 presentaron un perfil de restricción del tipo H5R5A2. Al igual que en la vendimia 2001, en esta vendimia, las cepas con estos cariotipos nuevos no desplazaron a las inoculadas, hecho que se mostró cuando se analizaron las muestras tomadas de distintas fases de la fermentación mediante cariotipo electroforético (apartado 2. 3 de los resultados).

Los resultados de los cariotipos obtenidos en las vendimias 2001 y 2003 junto con los obtenidos de los RFLPs hicieron plantearnos si los cariotipos de las cepas inoculadas eran estables ó no durante el crecimiento vegetativo en un medio natural. El descubrimiento de la inestabilidad del cariotipo de las levaduras durante el crecimiento vegetativo ha planteado una grave amenaza para todas las industrias que confiaban en la propagación y propiedades metabólicas de las cepas de levaduras, como las cerveceras, las panaderas y las del vino. Las propiedades genéticas de una cepa inestable pueden variar, haciéndola inadecuada para el proceso deseado. La inestabilidad de los cariotipos en cepas de levaduras naturales es un fenotipo difícil de detectar ya que no puede ser seguido de otra forma que no sea con el cariotipo electroforético analizando un amplio número de clones, aislados tras muchas generaciones en crecimiento vegetativo (Carro y Piña 2001). Por tanto el que una cepa mantenga estable su cariotipo puede ser considerado como otro criterio importante a la hora de seleccionar cepas de levaduras para ser utilizadas en un proceso industrial.

El estudio de la estabilidad de los cariotipos nos permitirá resolver, por un lado, el polimorfismo cromosómico detectado entre cepas aisladas durante las fermentaciones industriales inoculadas en las vendimias 2001 y 2003, y si éste fue debido a reorganizaciones cromosómicas producidas durante el crecimiento

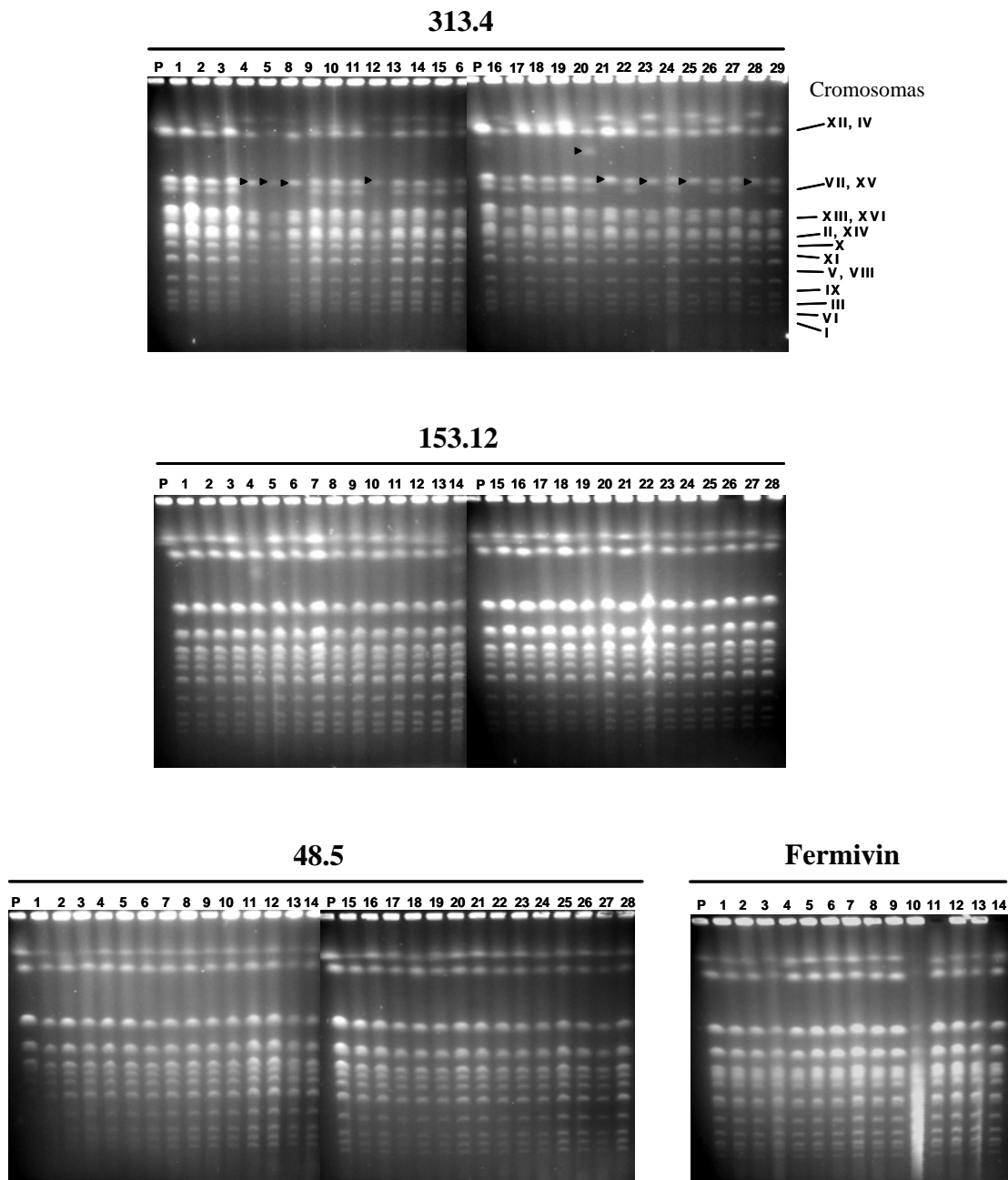
vegetativo; y por otro lado nos dará una idea de la estabilidad genética de las cepas autóctonas seleccionadas.

Para analizar la estabilidad de los cariotipos se eligieron varias cepas de levaduras, las autóctonas seleccionadas 313.4, 153.12 y 48.5, una comercial, Fermivin, y la cepa de laboratorio diploide X2180. Para llevar a cabo los experimentos el medio de cultivo utilizado fue mosto sintético (esterilizado a 100 °C, 30 min.) para mantener la composición del medio constante. Las cepas se inoculaban en 15 mL de medio de cultivo en tubos estériles de 25 mL dejándose crecer a 20 °C y sin agitación a fin de imitar las condiciones reales de una fermentación industrial. Una vez que los cultivos alcanzaban una densidad de  $1 \times 10^8$  células/mL aproximadamente, se inoculaban en mosto sintético fresco  $2 \times 10^6$  células/mL. Los cultivos seriados se realizaron hasta llegar aproximadamente a las 100 generaciones en un primer experimento (18 pases) y hasta las 300 generaciones en un segundo ensayo (60-70 pases). Después se tomaron muestras de cada tubo, se hicieron diluciones y se aislaron en torno a 20-30 colonias para estudiar su cariotipo electroforético.

### 4.3. Estabilidad de los cariotipos tras 100 generaciones

El primer experimento se realizó con las cepas 313.4, 153.12, 48.5 con cariotipos P2, P5, P5.I respectivamente, y la cepa comercial Fermivin, sin adicionar etanol al medio y hasta llegar a las 100 generaciones. Posteriormente se hicieron diluciones y se aislaron 30 colonias de cada cultivo, analizándose un total de 98 clones mediante cariotipo electroforético.

Como se muestra en la Figura 83, en el caso de la cepa 313.4, de los 28 clones analizados, 19 fueron iguales a la cepa parental y 9 distintos, de los cuales 8 fueron iguales entre sí, indicándose las diferencias en el cariotipo con respecto a la cepa original con una flecha negra.



**Figura 83.** Cariotipo electroforético de los clones aislados tras pasar 100 generaciones en crecimiento vegetativo en mosto sintético para las cepas 313.4, 153.12, 48.5 y Fermivin. Las flechas negras indican las variaciones en el cariotipo de los clones con respecto a la cepa parental. P corresponde a la cepa parental en cada caso.

En la mayoría de los clones se observaron diferencias en la movilidad, en la presencia o ausencia e intensidad en las bandas de la zona superior del gel, donde se encuentran los cromosomas IV y XII, de mayor tamaño molecular.

Para la cepa 313.4 se calculó la proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación (R) de acuerdo con la fórmula descrita por Carro y colaboradores (Carro y col. 2001) sin tener en cuenta las variaciones observadas en la parte superior del gel:

$$R=1-Pi^{0.01}$$

Pi: Fracción de clones iguales a la cepa parental.

Por tanto si  $Pi=0.68$  y  $R=1-0.68^{0.01}$ , entonces  $R=3.8 \times 10^{-3}$  para esta cepa.

Para el resto de las cepas, 153.12, 48.5 y Fermivin los clones analizados tras las 100 generaciones se mostraron muy estables, siendo las únicas variaciones las observadas en las bandas de la parte superior del gel, donde se encuentran los cromosomas IV y XII.

Existe una fuerte indicación de que las amplificaciones, deleciones y reorganizaciones de las secuencias repetidas de los genes ribosómicos, presentes en el cromosoma XII (rDNA) pueden ser la fuente más importante de variación en el tamaño de este cromosoma (Nadal y col. 1999). En el apartado 4.4.1 analizaremos este tipo de variaciones mediante hibridaciones Southern con una sonda de los genes ribosómicos.

#### 4.4. Estabilidad de los cariotipos tras 300 generaciones

El segundo experimento se realizó con las cepas 313.4, 153.12, 48.5, la comercial Fermivin y la de laboratorio diploide X2180. Con estas cepas se llevaron a cabo dos tipos de ensayos, uno sin adicionar etanol al mosto sintético y otro en presencia de un 7% de etanol. En este caso el experimento finalizó cuando se alcanzaron las 300 generaciones. Además, cuando se llegó a las 100 generaciones, se hizo un control de cariotipos, para lo cual se hicieron diluciones y se aislaron 20 colonias de las cuales se analizó el cariotipo de 6-7; posteriormente, tras pasar las 300 generaciones de nuevo se hicieron diluciones, se aislaron 20 colonias y se estudió el cariotipo electroforético de las 20.



4.4.1. 300 generaciones sin presencia de etanol en el medio

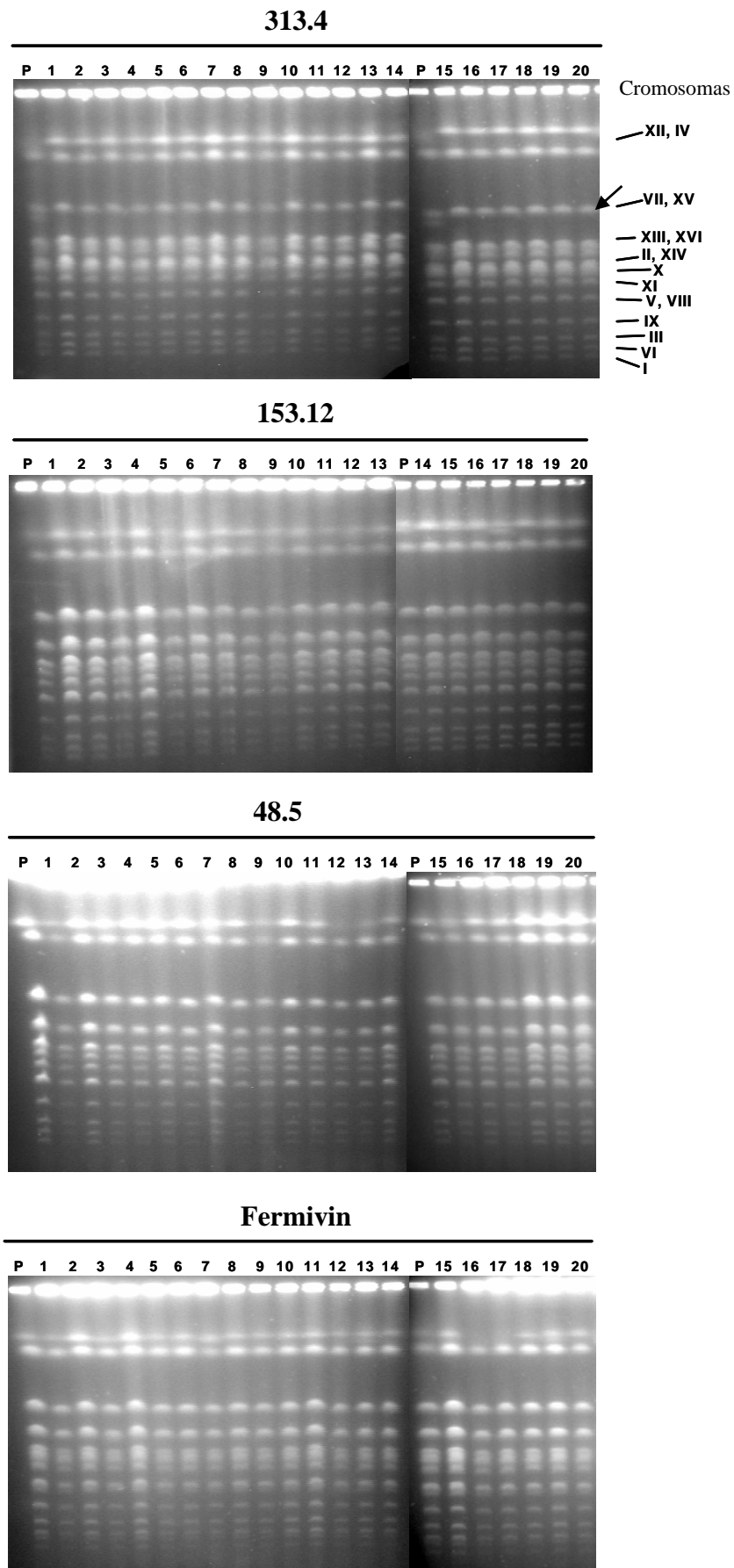
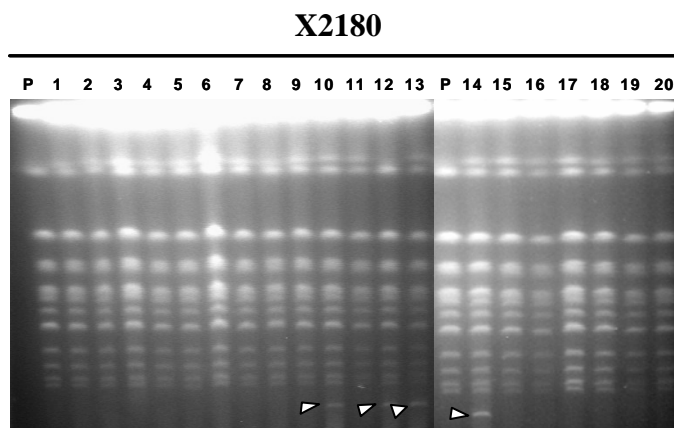


Figura 84.



**Figura 84** (Continuación). Cariotipo electroforético de los clones aislados tras pasar 300 generaciones en crecimiento vegetativo en mosto sintético para las cepas 313.4, 153.12, 48.5, Fermivin y X2180. P corresponde a la cepa parental en cada caso.

Con respecto a la cepa 313.4, en la Figura 84 la flecha negra indica la posición donde todos los clones aislados presentaron la misma variación cromosómica, ausencia de una banda, y que correspondió a la zona del gel donde se encuentran los cromosomas VII y XV. En esta zona ya se detectaron diferencias para esta cepa en el primer experimento, tras pasar 100 generaciones, pero sólo en 8 clones. Además, también se observaron variaciones en la parte superior del gel, correspondiente a la zona de los cromosomas IV y XII, en la cual todos los clones mostraron dos bandas bien definidas con respecto a la cepa parental que solo presentó una.

El resto de las cepas presentaron variaciones sólo en la zona superior del gel correspondiente a la zona de los cromosomas IV y XII. Hay que destacar que en el caso de la cepa de laboratorio X2180 se detectó, en la parte inferior del gel, para los clones 10, 12, 13 y 14, una banda de bajo peso molecular (se indica con una flecha blanca) que no estuvo presente en la cepa parental, ni en el resto de los clones analizados para esta cepa.

4.4.2. 300 generaciones en presencia de un 7% de etanol en el medio

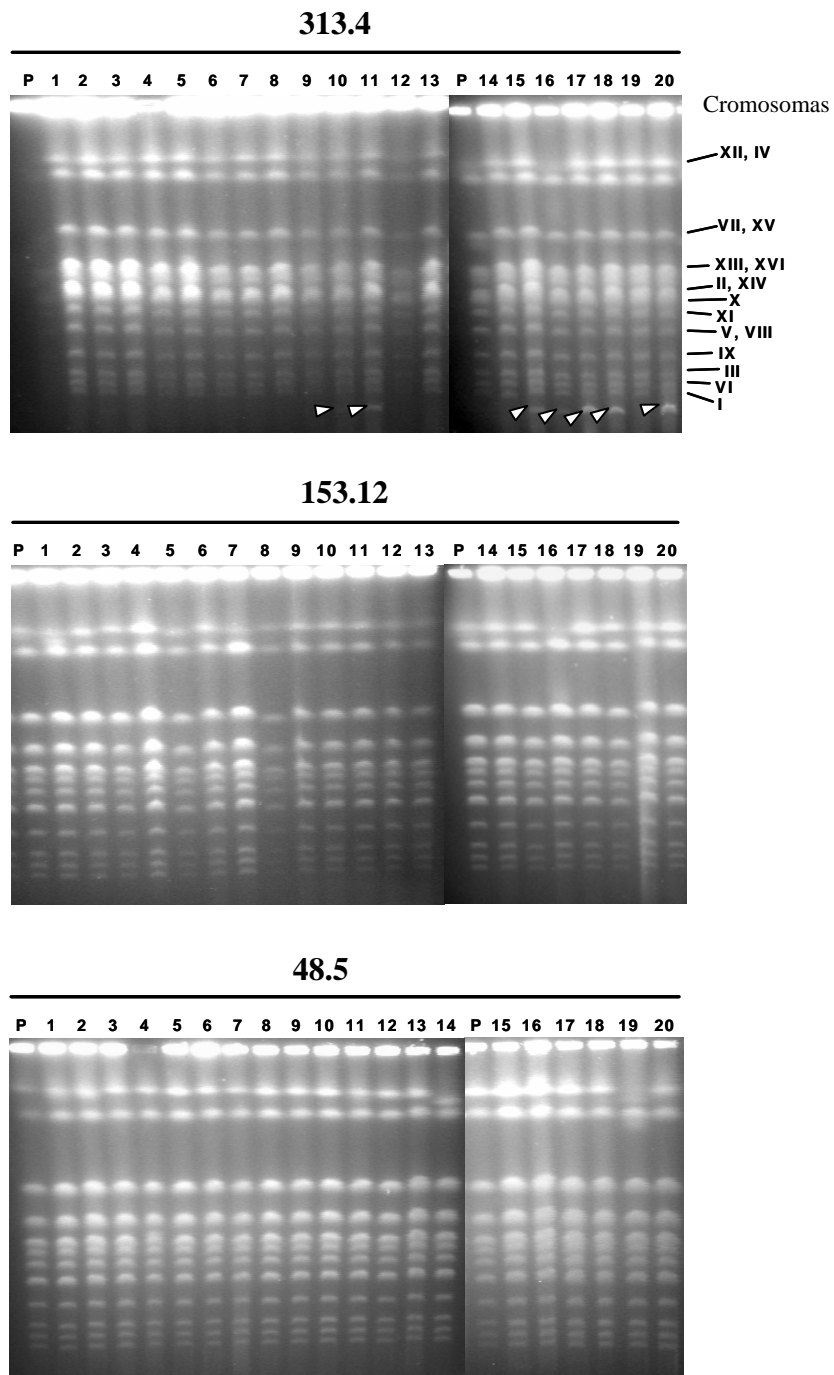
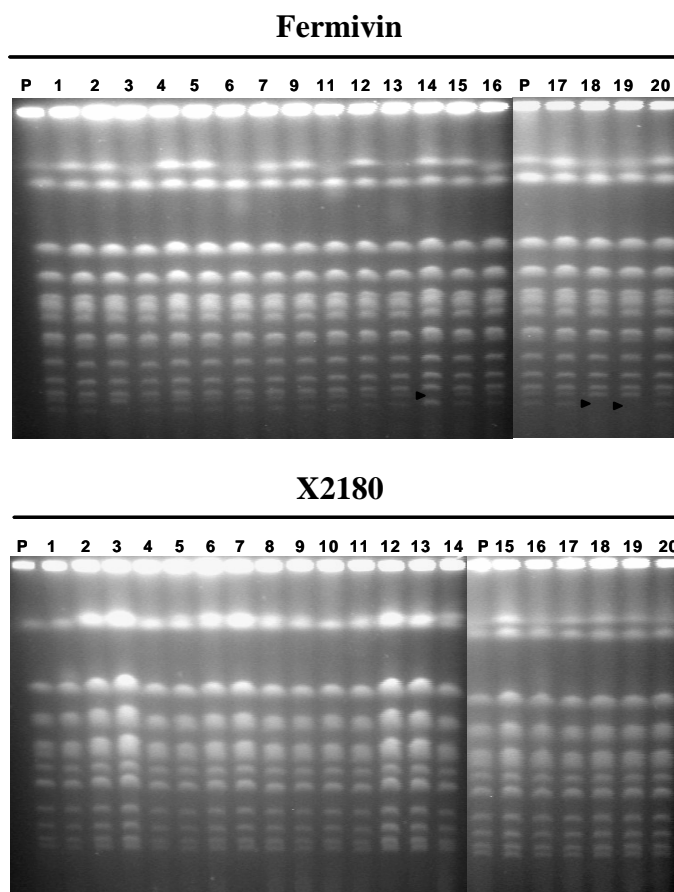


Figura 85.



**Figura 85** (Continuación). Cariotipo electroforético de los clones aislados tras pasar 300 generaciones en crecimiento vegetativo en mosto sintético en presencia de un 7% de etanol para las cepas 313.4, 153.12, 48.5, Fermivin y X2180. P corresponde a la cepa parental en cada caso.

En este caso, a los clones derivados de la cepa 313.4 les ocurrió lo mismo que en el caso anterior, observándose la ausencia de la banda situada en el gel en la zona de los cromosomas VII y XV, estabilizándose el cariotipo sin esa banda para todos los clones analizados. También se detectó una banda de bajo peso molecular en los clones 10, 11, 15, 16, 17, 18 y 20 (se indica con una flecha blanca) que no estuvo presente en la cepa parental.

En los clones de las cepas 153.12 y 48.5 no se observaron diferencias en las bandas que no fuesen las pertenecientes a la zona superior del gel donde se encuentran los cromosomas IV y XII.

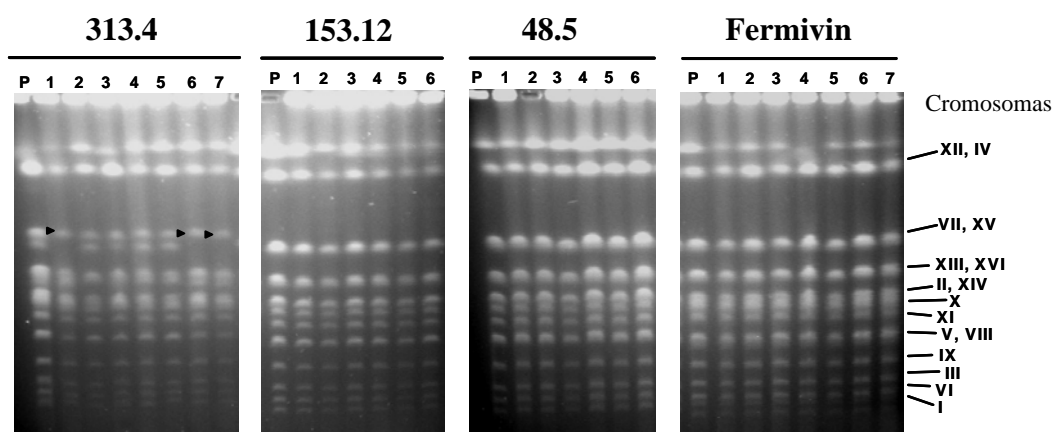
En el caso de la cepa comercial Fermivin sí se observaron variaciones en tres de los clones aislados, 14, 18 y 19, en la zona del gel donde se encuentran los

cromosomas de menor tamaño, el I, III y VI (se indica con una flecha negra). Además también se observaron variaciones en la zona superior del gel correspondiente a los cromosomas de mayor tamaño, IV y XII. Por tanto teniendo en cuenta la inestabilidad cariotípica que presentaron los tres clones, la proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación (R) para esta cepa fue de  $9 \times 10^{-3}$ .

#### 4.4.3. Control de la estabilidad de los cariotipos tras 100 generaciones

Fue realizado en el transcurso del segundo experimento

##### (i) Sin presencia de etanol en el medio

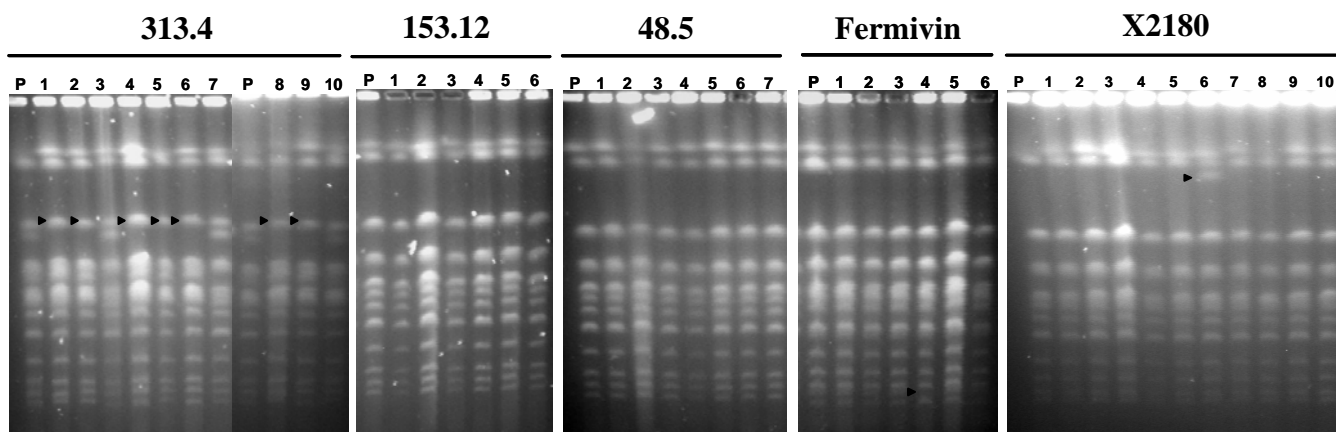


**Figura 86.** Cariotipo electroforético de los clones aislados tras pasar 100 generaciones en crecimiento vegetativo en mosto sintético para las cepas 313.4, 153.12, 48.5 y Fermivin. El análisis se realizó en el transcurso del segundo experimento. P corresponde a la cepa parental en cada caso.

En principio, para la cepa 313.4, de los 7 clones analizados, 3 se consideraron distintos (flecha negra) con respecto a la cepa parental debido a la ausencia de un banda en esa zona del gel. Además se detectaron diferencias en la parte superior del gel como por ejemplo fueron las distintas intensidades en estas bandas para los clones analizados. En este caso la proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación fue  $R=5.6 \times 10^{-3}$  ( $P_i=0.57$ ;  $R=1-0.57^{0.01}$ ). Los resultados fueron similares a los del primer experimento a las 100 generaciones realizado sin presencia de etanol en el medio.

El cariotipo de los clones de las cepas 153.12, 48.5 y Fermivin sólo variaron en la parte superior del gel, que correspondió a la zona de los cromosomas IV y XII.

(ii) En presencia de un 7% en el medio



**Figura 87.** Cariotipo electroforético de los clones aislados tras pasar 100 generaciones en crecimiento vegetativo en mosto sintético en presencia de un 7% de etanol para las cepas 313.4, 153.12, 48.5, Fermivin y X2180. El análisis corresponde al control de cariotipos realizado en el transcurso del segundo experimento. P corresponde a la cepa parental en cada caso.

En cuanto a la cepa 313.4, de los 10 clones analizados, 7 fueron distintos respecto a la cepa original por presentar en sus cariotipos, de nuevo, la ausencia de una banda en el gel en la zona indicada con una flecha negra en la Figura 87. La proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación, sin tener en cuenta las variaciones de las bandas superiores del gel, fue  $R = 1.2 \times 10^{-2}$  ( $P_i = 0.30$ ;  $R = 1 - 0.30^{0.01}$ ). En este ensayo, la proporción de reorganizaciones cromosómicas fue aproximadamente 2 veces mayor que en el ensayo sin presencia de etanol.

En el caso de la cepa Fermivin, el clon 4 presentó ausencia de una banda en la parte inferior del gel (indicado con la flecha negra en la figura), con respecto a la cepa parental y al resto de los clones.

El resto de clones de las cepas 153.12, 48.5, y X2180 mantuvieron los cariotipos estables, siendo las únicas variaciones observadas las correspondientes a la parte superior del gel donde están los cromosomas IV y XII.

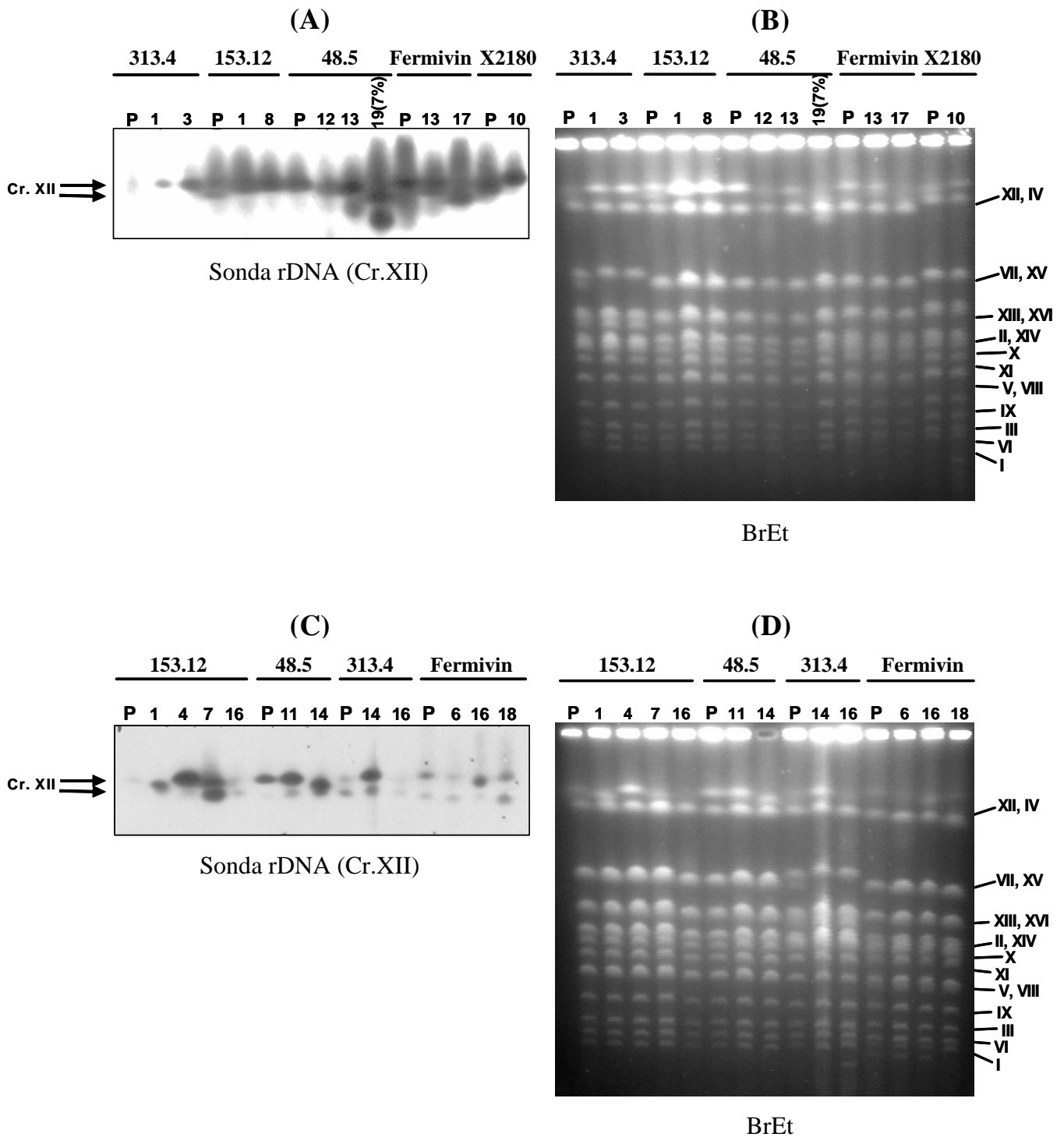
## 4.5. Hibridaciones ADN-ADN (Southern blot)

### 4.5.1. Hibridaciones con una sonda de ADN de los genes ribosómicos

En general, la mayoría de los cariotipos de los clones en los dos experimentos presentaron variaciones en las bandas de parte superior del gel, en la zona correspondiente a los cromosomas de mayor tamaño molecular, IV y XII. Para comprobar e identificar si la variabilidad observada en esa zona era debida a variaciones de las repeticiones de los genes ribosómicos presentes en el cromosoma XII, como ha sido descrito anteriormente (Nadal y col. 1999; Puig y col. 2000; Carro y Piña 2001), se hibridó el cariotipo de algunas cepas que presentaron estas variaciones con una sonda ribosómica de este cromosoma (ITS1-5.8S-ITS2). Los resultados de las hibridaciones se muestran en la Figura 88.

En el primer caso de hibridación (Figura 88-A) se observa claramente una banda que varía de posición en función del tamaño para los distintos clones. En algunos casos, se observan dos señales de hibridación para este cromosoma, lo cual indica que se trata de cromosomas XII homólogos de distinto tamaño, que variaron en función del número de repeticiones de los genes ribosómicos. Este hecho también ha sido observado en otros estudios (Chindamporn y col. 1993; Nadal y col. 1999; Pasero & Marilley 1993; Rustchenko y col. 1993; Rustchenko & Sherman 1994; Carro & Piña 2001).

En la segunda hibridación (Figura 88-C) se observan dos bandas para la mayoría de las cepas analizadas y en algunos casos de distinta intensidad, como por ejemplo para la cepa 5.7, I.11, y 2.14., indicando este hecho que las variaciones observadas se deben a estos genes, por tanto si consideramos que las cepas que varían en el cromosoma XII no son inestables genéticamente (Carro & Piña 2001), podremos concluir que las cepas autóctonas seleccionadas 153.12 y 48.5 son estables, presentando el resto de las cepas estudiadas algunas variaciones adicionales que discutiremos en los apartados 4.5 y 4.6 de los resultados.



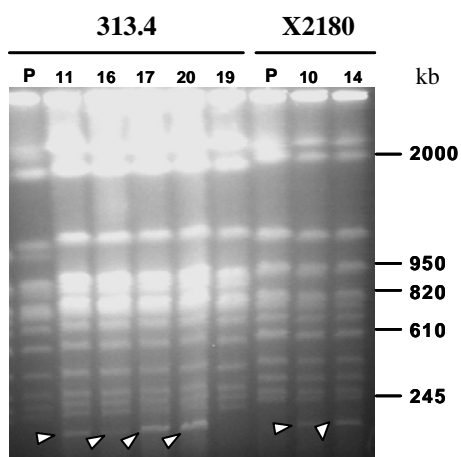
**Figura 88.** Análisis de la variación de las repeticiones de los genes ribosómicos de algunos clones para las cepas estudiadas mediante hibridaciones Southern con la sonda ITS1-5.8S-ITS2 en el caso de 300 generaciones sin presencia de etanol en el medio (A), mostrándose también el cariotipo electroforético para los mismos clones (B); y análisis Southern para la misma sonda tras 300 generaciones con un 7% de etanol en el medio (C) y cariotipo electroforético de los correspondientes clones (D). P representa los parentales de cada cepa estudiada.



#### 4.5.2. Hibridaciones con una sonda de ADN de los genes mitocondriales

Para determinar la naturaleza de la banda de bajo peso molecular detectada en los clones 10, 12, 13 y 14 de la cepa X2180 (Figura 84), y en los clones 10, 11, 15, 16, 17, 18 y 20 de la cepa 313.4 (Figura 85), primero se calculó el tamaño molecular de la banda mediante el programa *Molecular Analyst*, siendo ésta de 75,42 kilobases (kb) aproximadamente. Este tamaño fue muy similar al del ADN mitocondrial el cual se ha estimado en 75-85 kb (De Zamaroczy & Bernardi 1985; Foury 1998). Estas bandas no estuvieron presentes en el resto de los clones analizados ni en las cepas parentales.

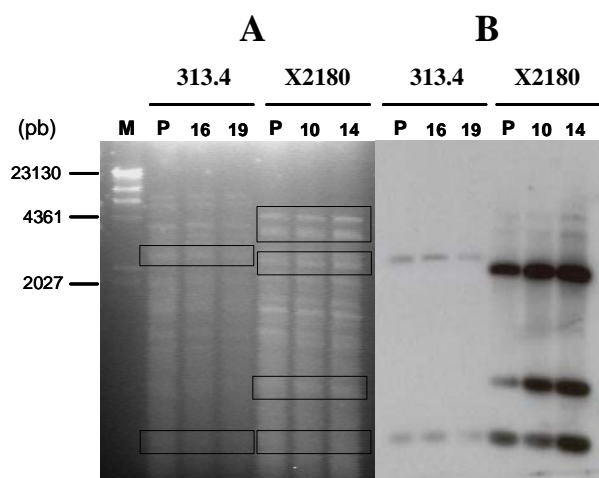
Para comprobar si la banda se trataba o no de ADN mitocondrial, se hibridó sobre campo pulsante con una sonda del intrón AI3 del gen mitocondrial *COX1*. Tras la hibridación, no se observó ninguna señal en la zona donde se hallaban las bandas de bajo peso molecular.



**Figura 89.** Cariotipo electroforético, tras 300 generaciones, de los clones de las cepas 313.4 y X2180, en un medio suplementado con un 7% de etanol y sin etanol respectivamente. La flecha blanca indica la banda de bajo peso molecular. P representa el cariotipo de las cepas parentales.

Como control positivo se hibridó con la misma sonda sobre los patrones de restricción del ADN mitocondrial para la enzima *Hinf I* obtenidos mediante una electroforesis en gel de agarosa. Las cepas utilizadas fueron los clones 16 y 19 derivados de la cepa 313.4, y los clones 10 y 14 derivados de la cepa X2180 (Figura 90). En todos ellos se obtuvo señal de hibridación.

Por tanto se pudo concluir que las bandas de bajo peso molecular no correspondieron a ADN mitocondrial.



**Figura 90.** A) Muestra el gel de electroforesis en gel de agarosa con los perfiles de restricción del ADN mitocondrial con la enzima *Hinf I* para dos clones de las cepas que presentaron la banda de bajo peso molecular. Para el caso de la cepa 313.4 el clon 16 sí presentó la banda y el clon 19 no. M representa al marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -*Hind III* (SIGMA). B) Resultados de la hibridación Southern blot sobre el gel con la sonda del intrón AI3 del gen mitocondrial *COXI*.

Por otro lado, estudios llevados a cabo sobre inestabilidad genética en mutantes de *Candida albicans* (Andaluz y col. 2007) han puesto de manifiesto la pérdida o fragmentación de cromosomas en respuesta a la adaptación de estas levaduras a determinados medios de crecimiento, detectando mediante cariotipo electroforético bandas de bajo peso molecular que posteriormente se identificaron como fragmentos de cromosomas.

De manera que el siguiente paso que nos planteamos fue comprobar la posibilidad de que las bandas correspondieran a fragmentos de algún cromosoma, pero tras la preparación de nuevas muestras para obtener el cariotipo electroforético las bandas de bajo peso molecular no se volvieron a detectar. Por consiguiente las consideramos bandas inestables posiblemente debidas a degradaciones de ADN.

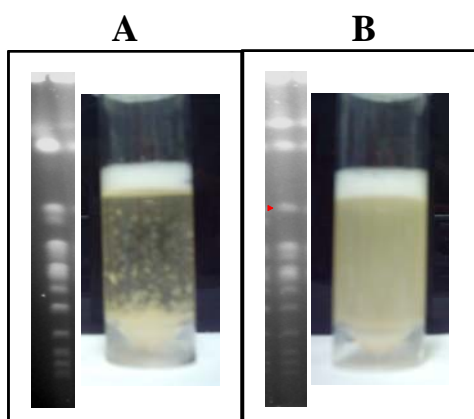
#### 4.6. Inestabilidad del cariotipo de la cepa 313.4

Los clones derivados de la cepa 313.4 después de 300 generaciones, tanto en un medio sin etanol como en presencia de un 7%, mostraron cariotipos distintos al de la cepa parental, aunque todos fueron iguales entre si (Figuras 84 y 85).

A las 100 generaciones cuando se analizó el cariotipo de los clones aislados de un medio sin presencia de etanol (Figura 83), se mostró que 8 fueron distintos al

de la cepa parental, pero iguales entre sí y a los mostrados en las Figuras 84 y 85. Los cariotipos de estos clones se diferenciaron del parental en que mostraron ausencia de una banda en la zona del gel correspondiente a los cromosomas VII y XV. Se observó que a medida que transcurrieron las generaciones los cariotipos de los clones cambiaron en la zona de estos cromosomas, hasta que llegó un momento en el que se estabilizaron, siendo todos distintos al de la cepa original.

Se ha observado una propiedad fenotípica interesante en la cepa 314.4, que ya se comentó en el apartado 2.3 de los resultados, y es su capacidad para formar agregados celulares y depositarse en el fondo de los recipientes con mosto en los que se encuentra creciendo. Esta propiedad resulta interesante desde el punto de vista industrial porque facilita la operación del clarificado del vino una vez finalizada la fermentación. Pero en realidad la utilización de este tipo de cepas para inocular las fermentaciones tiene algunos riesgos, ya que al depositarse en el fondo de los depósitos no llega a terminar las fermentaciones como se mostró por ejemplo en el caso de la vendimia de 2003. En las condiciones de nuestro experimento, a medida que fueron pasando las generaciones la cepa P2 fue perdiendo esta capacidad ya que se observó la ausencia de estos agregados a medida que se fueron realizando los cultivos seriados, sobre todo transcurridas las 300 generaciones (Figura 91).



**Figura 91.** Cultivos en mosto sintético de la cepa parental 313.4 (A), y del clon 18 aislado a las 300 generaciones de un cultivo en presencia del 7% de etanol (B), con sus correspondientes cariotipos

No sabemos si la pérdida de la capacidad de formar flóculos y el cambio de una sola banda en el cariotipo están directamente relacionados, pero sí se ha descrito que el cultivo prolongado de una cepa puede llevar a una variabilidad genotípica

causando cambios en los perfiles de floculación, que están determinados genéticamente (Smart & Whisker 1996).

#### 4.7. Inestabilidad genética de la cepa comercial Fermivin

En cuanto a la cepa Fermivin, observamos diferencias en los cariotipos de tres clones tras 300 generaciones en presencia de un 7% de etanol (señalados con una flecha roja en la Figura 85). Fueron variaciones que mostraron en cada clon la ausencia de banda en la zona del gel correspondiente a los cromosomas más pequeños, I, III y VI. La proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación (R) para Fermivin fue de  $8 \times 10^{-3}$ .

Se podría pensar, en principio, que estas variaciones pudieran estar relacionadas con la presencia de etanol en el medio, puesto que está descrito que el etanol puede actuar como agente mutagénico, produciendo lesiones tanto en el ADN mitocondrial (Codón & Benítez 1995; Ibeas & Jiménez 1997) como en el cromosómico (Ristow y col. 1995). Además estas variaciones no se detectaron para los clones de la misma cepa en el caso de no suplementar el medio con etanol (Figura 84).

Variaciones similares se han detectado también aunque en mayor proporción en otras cepas industriales de la zona de EL Penedès (Nadal y col. 1999) y en las aisladas de viñedos del champagne cuando pasan 412 generaciones, probablemente debidas a reorganizaciones mitóticas entre cromosomas homólogos (Longo y Vezinhet, 1993).

En la cepa Fermivin no sabemos qué cromosomas están involucrados en los cambios observados, aunque estudios realizados en otras cepas vínicas muestran que las variaciones en la misma zona de gel (Nadal y col. 1999) se deben a variaciones en las regiones subteloméricas del cromosoma I (Carro y col. 2003), pudiendo estar relacionadas con secuencias repetidas de elementos Ty, LTRs, tRNA y familias de genes como por ejemplo los *FLO* que se encuentran precisamente en estas regiones, en todos los cromosomas, y que pueden servir como diana para producirse

recombinaciones entre los cromosomas de las cepas silvestres de *S. cerevisiae* (Codón y col. 1997; Nadal y col. 1999; Puig y col. 2000; Rachidi y col. 1999; Neuvégliise y col. 2000). Aunque no tenemos certeza de que estos cambios se deban a variaciones en el cromosoma I, podríamos pensar que estas variaciones pudieron proporcionar un mecanismo adecuado para una adaptación de los clones de Fermivin al medio cuando éste fue suplementado con un 7% de etanol. Además estas reorganizaciones cromosómicas pueden ser también ventajosas porque generan variabilidad genética en este tipo de cepas que normalmente tienen un ciclo de vida asexual.

#### **4.8. Polimorfismo cromosómico detectado en las vendimias inoculadas de 2001 y 2003 y estabilidad cariotípica de las cepas seleccionadas**

Con respecto a las vendimias 2001 y 2003 cuyos depósitos de fermentación fueron inoculados con levaduras autóctonas, previamente seleccionadas, tras el análisis del cariotipo electroforético de varias muestras tomadas de los depósitos de fermentación se observó la presencia de cepas con cariotipos muy similares a los de las cepas inoculadas con patrones P5 y P5.I (Figura 79 y 80).

En las fermentaciones de la vendimia 2001 se detectaron cepas con cariotipos que llamamos P5.A, P5.E y P5.I, y aunque inicialmente se pensó que podrían ser cepas distintas a la inoculada de patrón P5, porque presentaban variaciones en la parte superior del gel, los resultados de los RFLPs del ADN mitocondrial y los Southern blot revelaron que fueron cepas muy relacionadas y que las variaciones observadas fueron debidas a variaciones en las repeticiones de los genes ribosómicos presentes en el cromosoma XII.

En el caso de la vendimia 2003, las cepas con nuevos cariotipos (Figura 80) presentaron variaciones distintas respecto a las detectadas en la vendimia 2001 como, por ejemplo, presencia de una banda extra (P43.10, P43.22, P48, P49), ausencia (P49) o cambios en las movilidades de algunas bandas (P36, P52). De los análisis de los RFLPs del ADN mitocondrial de estas cepas se observó que P43.10

mostró un patrón de restricción similar a P5/P5.I llamado H1R1A1. El resto de las cepas tuvieron patrones de restricción diferentes a los de las cepas inoculadas, de modo que no se pudo asegurar que derivasen de éstas, sin embargo entre ellas sí que hubo algunas que presentaron el mismo patrón de restricción aunque sus cariotipos fueron menos similares que en el caso de las cepas P5/P5I y P43.10. Por ejemplo las cepas con patrones cariotípicos P43.22 y P52.19, tuvieron un patrón de restricción tipo H3R3A3, y las de cariotipo P48 y P52.28 mostraron un patrón tipo H5R5A2. Esto nos llevó a pensar en la posibilidad de que algunas de estas cepas fuesen híbridos silvestres formados a partir de otras cepas. Aunque también, partiendo de la hipótesis de que cepas con idéntico patrón de restricción del ADN mitocondrial pero que difieren en sus cariotipos podrían estar genéticamente muy relacionadas (Nadal y col. 1999), sería necesario un nuevo estudio sobre estabilidad de cariotipos de alguna de estas nuevas cepas durante crecimiento vegetativo para comprobar los posibles cambios en los cariotipos.

Los resultados de los experimentos de la estabilidad de cariotipos nos confirmaron:

(i) Por un lado, la estabilidad genética de la cepa 153.12 con cariotipo P5 durante el crecimiento vegetativo cuando pasaron 300 generaciones en mosto sintético tanto sin presencia de etanol en el medio como con un 7%, ya que las únicas variaciones detectadas fueron las debidas a los genes ribosómicos presentes en el cromosoma XII, no considerándose éstas un aporte de inestabilidad genética a la cepa. En cuanto a la cepa con cariotipo P5.I se podría decir que es igual a la anterior, diferenciándose con respecto a ella sólo en las variaciones del cromosoma XII. Las variaciones en este cromosoma también se han observado en otras cepas industriales como la causa principal de alteración en el cariotipo (Petes y col. 1991; Chindamporn y col. 1993; Rustchenko y col. 1993; Nadal y col. 1996, 1999; Carro & Piña 2001).

El porqué una cepa puede presentar estabilidad genética frente a otras es difícil de determinar y habría que hacer estudios más específicos y detallados para averiguarlo. Por ejemplo, una cepa estable como 153.12 puede que tenga los sistemas de reparación del ADN intactos, pudiendo, por un lado, suprimir de manera espontánea posibles reorganizaciones genómicas mediante el “checkpoint”

(Kolodner y col. 2002). El checkpoint fue definido como una ruta que promueve el retardo o parada del ciclo celular en respuesta a daños del ADN o del huso mitótico, dando así tiempo a la célula a reparar esos daños (Foiani y col. 2000; Gardner y col. 2000). Por otro lado, se han descrito determinados mecanismos de recombinación que también funcionan suprimiendo la inestabilidad genética en *S. cerevisiae* como por ejemplo el BIR (break induced-replication) (Malkova y col. 1996; Signon y col. 2001). Mediante este mecanismo el ADN se replica para reparar posibles roturas de la doble cadena de ADN, quizás inducidas por el etanol (Codón & Benítez 1995; Ibeas & Jiménez 1997), mediante recombinación homóloga que no provoca grandes reorganizaciones cromosómicas, siendo por tanto una ruta importante para la supresión de la inestabilidad genética en levaduras.

En el caso de la cepa comercial Fermivin, que presentó una cierta inestabilidad genética, puede que ésta tuviese estos sistemas de reparación defectuosos, activándose otras rutas de reparaciones no-homólogas, como por ejemplo *NHJE* (*non-homologous end joining*) que podrían resultar en altas proporciones de fusiones cromosómicas (Myung y col. 2001), aunque la proporción de reorganizaciones cromosómicas por generación (R) de esta cepa se calculó en  $8 \times 10^{-3}$ . La fusión cromosómica puede suceder en presencia de checkpoint si los fragmentos cromosómicos o degradaciones no exponen regiones de homología para que se diera el BIR, aunque se ha observado que ocurre en baja proporción (Hackett y col. 2001).

En el caso de la cepa 313.4 a las 300 generaciones se observó que todos los clones fueron iguales entre ellos pero distintos a la cepa parental. Los clones en los que se observó un cambio en el cariotipo en la zona del gel donde se encuentran los cromosomas VII y XV, se estabilizaron al finalizar el experimento, sugiriendo esto que el clon reorganizado pudiera tener una ventaja selectiva frente a la cepa parental en las condiciones de ensayo (Adams y col. 1992) llegando a sustituir a la cepa original completamente. Esto podría ser debido a que la cepa 313.4 evolucionó por medio de este cambio en su cariotipo para adaptarse a las condiciones del medio donde se encontraba creciendo (Nadal y col. 1999; Puig y col. 2000; Pérez-Ortín y col. 2002; Infante y col. 2003).

La estabilidad genética es un requisito muy importante a la hora de seleccionar cepas de levaduras para su utilización industrial, ya que los cambios genéticos producidos en las cepas a veces pueden implicar cambios en propiedades fenotípicas de interés industriales, lo cual supondría un riesgo para las industrias (Carro & Piña 2001).

Nuestros resultados fueron contrarios a los observados para el caso de la elaboración de vinos espumosos en la zona de El Penedés en los que se mostró una alta inestabilidad cariotípica para las cepas ensayadas (Carro & Piña 2001).

(ii) Por otro lado, los datos del experimento de estabilidad de cariotipos no mostraron que para el caso de la cepa 153.12 apareciesen clones, tras 300 generaciones, que tuviesen los cariotipos P36, P43.10, P43.22, P48, P49, P52.19 y P52.28 similares a P5. De manera que si en ese periodo de tiempo que duró el ensayo la cepa 153.12 permaneció estable, durante la fermentación del vino, en la cual el número de generaciones es mucho más bajo, tuvieron que ocurrir otros fenómenos que derivasen en la aparición de los cariotipos similares. Este hecho junto con los resultados obtenidos de los RFLP-ADNmt (Figura 81) nos llevó a pensar en la posibilidad de la formación de híbridos naturales entre las cepas. Por ejemplo se podría pensar que la cepa con cariotipo P43.10 y patrón de restricción H1R1A1 fuese un híbrido formado a partir de la cepa con cariotipo P5/P5.I y otra desconocida. O que, por ejemplo, la cepa con cariotipo P48 fuese también un híbrido formado a partir de las cepas con patrones P52.28 y P36.

Sin embargo, la reproducción sexual en levaduras vínicas de *S. cerevisiae* es un tema de controversia, ya que éstas son por lo general prototróficas, homotáticas, altamente heterocigotas y aneuploides, y exhiben bajos niveles de esporulación y viabilidad de las esporas (Bakalinsky & Snow 1990; Barre y col. 1993; Guijo y col. 1997). Estas características son evidencias que favorecen el que la reproducción sexual sea rara o ausente en levaduras vínicas.

No obstante se han encontrado, en algunos casos, híbridos naturales de levaduras del grupo “*sensu stricto*”, en el cual se incluye la especie *S. cerevisiae*,



que existen en la naturaleza (Masneuf y col. 1998; Groth y col. 1999). Estos híbridos presentan un genoma nuclear con cromosomas de ambos parentales y un genoma mitocondrial que puede ser de uno u otro padre, o una molécula nueva de ADN recombinante. Los apareamientos que se dan entre esporas de distintas especies para formar un híbrido pueden contribuir al polimorfismo observado entre este grupo de levaduras (Gorth y col. 1999). Y aunque estos híbridos se den con poca frecuencia en la naturaleza, una vez que se forman, son bastante estables, si bien el apareamiento entre células de la misma especie es más frecuente que cuando se trata de especies diferentes (Marinoni y col. 1999).

Se ha propuesto un modelo de laboratorio (Marinoni y col. 1999) para explicar esta transferencia horizontal genética mostrándose que híbridos viables entre dos levaduras de distinta especie *S. cerevisiae* y *S. bayanus* mostraron grupos de cromosomas de ambos parentales. Estos híbridos fueron estables y pudieron propagarse mediante mitosis durante muchas generaciones sin someterse a ninguna reorganización aparente en sus genomas nucleares. Parece ser que cuando esto ocurre, es porque ambos grupos parentales de cromosomas son compatibles y pueden coexistir en la misma célula (el híbrido).

Ruderfer y col (2006) mostraron que se puede producir un cruzamiento entre esporas y aunque sea relativamente infrecuente, es suficiente para que se produzca una mezcla de genomas a través de la recombinación. Determinaron además que no es tan inusual que el cruzamiento sea debido a las condiciones del medioambiente que rodean a las células.

En teoría el proceso de esporulación generalmente ocurre en medios en los que existe una limitación de nutrientes, pero Mortimer y colaboradores (1994) mostraron que la esporulación también podía tener lugar en medios en los que no hubiese agotamiento de los nutrientes. Por otro lado, Pulvirenti y colaboradores (2002) sugirieron que las paredes de las ascas que envuelven a las esporas podrían ser hidrolizadas durante el paso de éstas a través del tracto digestivo de varios animales, resultando en la expulsión de las esporas libres al medioambiente.

En el laboratorio hemos comprobado que las cepas con patrones P5 y P5.I fueron capaces de esporular en un medio con limitación de nutrientes, observándose a los cinco días, tras la siembra en ese medio, la formación de tétradas, es decir, ascas con 4 ascosporas en su interior, aunque en baja proporción (datos no mostrados). Basándonos en estas observaciones y teniendo en cuenta los resultados de la vendimia 2003, pudiera ser que en algún momento durante las fermentaciones se produjera la esporulación de las células, tanto de las cepas inoculadas con cariotipos P5 o P5.I como de otras probablemente de la misma especie, dándose el fenómeno de reproducción sexual. De esta manera podría haber surgido un híbrido con cariotipo P43.10 por ejemplo, el cual también estaría muy adaptado a las condiciones de la fermentación (Groth y col. 1999), pudiendo tener un genoma nuclear bastante estable, ya que esta cepa se detectó en varios depósitos de fermentación y coexistió con las cepas inoculadas. Pudiera ser también que la cepa con cariotipo P43.10 tuviese el genoma mitocondrial de una de las cepas con cariotipo P5/P5.I, ya que las tres cepas presentaron el mismo patrón de restricción para dos de las enzimas ensayadas (*Hinf I* y *Rsa I*) pero fue similar a una tercera (*Alu I*). Otro ejemplo de un posible híbrido podría ser la cepa con patrón cariotípico P48 y patrón de restricción H5R5A2. De manera que sería el resultado del cruce entre las cepas con cariotipos P52.28 y P36, teniendo el híbrido cromosomas de los dos parentales, y heredando por ejemplo el genoma mitocondrial de la cepa con cariotipo P52.28 (H5R5A2). Pero no tenemos certeza de que el proceso de apareamiento y formación de híbridos sea el responsable de obtener estos cariotipos nuevos y similares a los de las cepas inoculadas, y habría que hacer futuros experimentos de esporulación y cruzamiento entre las células haploides para averiguarlo.

Sin embargo sí que podemos afirmar que en el caso de las cepas con cariotipos P5/P5.I y P43.10, dadas sus similitudes en cuanto a cariotipos electroforéticos y perfiles de restricción para el ADN mitocondrial, están estrechamente relacionadas y probablemente tengan un origen común (Masneuf y col. 1998).

Actualmente los híbridos naturales formados entre cepas de levaduras *Saccharomyces* pertenecientes al grupo “*sensu stricto*” están siendo objeto de

estudio por diversos grupos de investigación. Por ejemplo, González y colaboradores (2007) caracterizaron algunas cepas de levaduras vínicas que fueron identificadas como híbridos naturales entre las especies de *Saccharomyces cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, y mostraron que estos híbridos, durante las fermentaciones ensayadas, fueron mejores productores de alcoholes superiores, los cuales están relacionados con compuestos aromáticos, que las cepas controles no híbridas. Le Jeune y colaboradores (2007) caracterizaron nueve cepas que resultaron ser híbridos diploides entre las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* var. *uvarum*. Por último, en Austria, Lopandic y colaboradores (2007) determinaron entre la biodiversidad de levaduras indígenas de las fermentaciones de los mostos de esta región supuestos híbridos formados a partir de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, sugiriendo que la presencia de estas cepas híbridas pudieron influenciar en las propiedades sensoriales del vino obtenido de forma favorable.

En general, estos trabajos ponen de manifiesto la ventaja que podría suponer la utilización de los híbridos para vinificar ya que pueden estar dotados de mejores propiedades enológicas que las cepas no híbridas de las que proceden.

## 5. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de las cepas de levaduras inoculadas

Tras los análisis realizados en el apartado 2 de la Tesis, que trataban sobre las fermentaciones industriales inoculadas con cepas de levaduras autóctonas, previamente seleccionadas, se observó, mediante cariotipo electroforético, que no en todas las vendimias de las cinco estudiadas predominó o predominaron las cepas inoculadas. Por ejemplo en la vendimia 2002 se mostró que hubo una implantación de otra cepa indígena, la cual desplazó casi en su totalidad a las inoculadas; y en la vendimia 2003, aunque sí se detectó una de las cepas inoculadas, la de cariotipo P5, ésta no fue la que predominó en las fermentaciones, encontrándose otras cepas junto a ella en proporciones elevadas. Por este motivo fue necesario aplicar un método de control microbiológico rápido y fiable que nos pusiera de manifiesto si la cepa inoculada era la que estaba llevando a cabo la fermentación desde el inicio del proceso, tanto en el pie de cuba como en los depósitos de fermentación.

Para este fin, la técnica molecular que aplicamos fue la del *Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción del ADN mitocondrial* (RFLP-ADNmt) a muestras tomadas directamente del mosto fermentando, sin necesidad de aislar colonias en placas de medio YPD. De manera que durante la fermentación se tomaba un volumen de aproximadamente 250 mL de mosto y se transportaba en frío al laboratorio de Microbiología (UCA) donde se procesaba. A continuación la muestra se centrifugaba para tener un precipitado celular suficiente y se purificaba el ADN de ese conjunto celular, según el protocolo que se indica en el apartado 8 dentro de materiales y métodos de la Tesis. Después, una alícuota del ADN se trataba con la enzima de restricción *Hinf I* y tras un periodo de incubación se realizaba una electroforesis en gel de agarosa para obtener un patrón de bandas característico de la muestra en cuestión. Los resultados se obtenían en aproximadamente 20 horas desde la realización de la toma de muestras.

La aplicación de esta técnica para el control de cepas inoculadas en fermentaciones ofrece resultados muy intuitivos sobre todo en el caso de utilizar una sola cepa, porque conociendo el patrón de restricción de la cepa seleccionada, bien autóctona o comercial, se puede saber si es la que predomina o no durante el proceso

comparando su patrón con el obtenido de la muestra tomada directamente del mosto. Los resultados que se obtienen son cualitativos y aproximados pero fiables.

En las dos últimas vendimias, 2005 y 2006, en las que se utilizó sólo una de las cepas seleccionadas, 153.12, para inocular las fermentaciones, fue cuando se comprobó la eficacia del método aplicado directamente a muestras fermentando.

### 5.1. Vendimia 2005

En esta vendimia, el inicio de las fermentaciones y lo referente a la elaboración del pie de cuba se indica en el apartado 2.5 de los resultados. Durante la vendimia 2005 se analizó mediante RFLP-ADNmt una muestra del **Pie de Cuba B** cuando éste tenía un grado Beaumé de 6,1, y muestras de varios depósitos de fermentación tomadas en distintos días a lo largo del proceso (Tablas 13 y 14). Los resultados se muestran en la Figura 92.

Los depósitos K, L, M, P y Q no se muestran en la tabla de toma de muestras (Tabla 14).

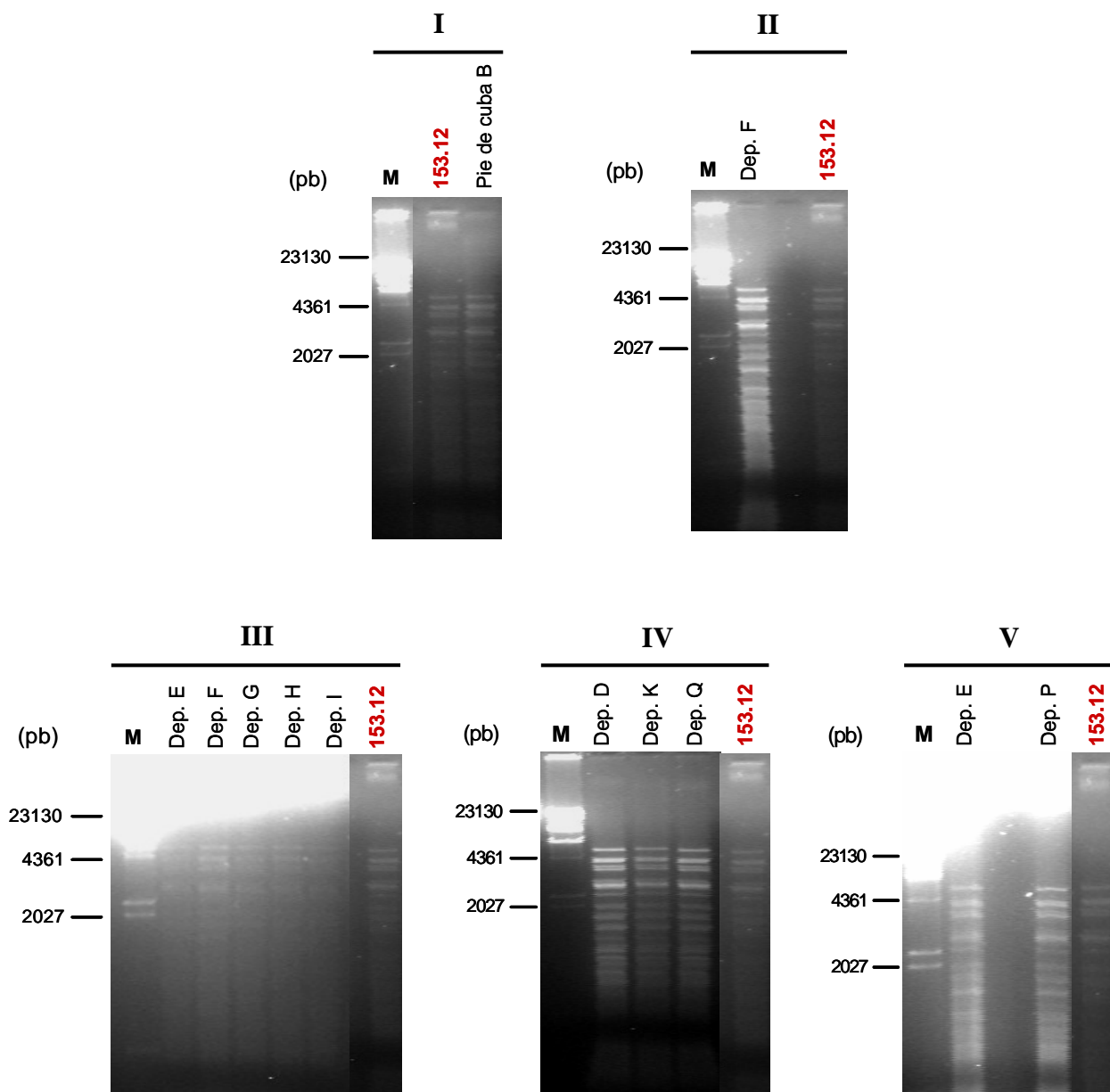
En el **panel I** para el pie de cuba, con un 6,1 °Be, se observa que el patrón de restricción del ADN mitocondrial para el conjunto de células recogidas ese día, coincidió con el de la cepa inoculada 153.12, deduciéndose por lo tanto que esta cepa estuvo presente de forma mayoritaria en la fermentación, ya que no se aprecian otras bandas.

En el **panel II** el patrón de restricción de la muestra tomada del depósito F es igual que el de la cepa inoculada, por tanto se pudo afirmar que en el depósito F con 9,9 °Be la cepa mayoritaria fue la inoculada.

En el **panel III** se indican los patrones para las muestras tomadas de 5 depósitos, E (4,00 °Be), F (5,2 °Be), G (5,1 °Be), H (4,65 °Be) e I (4,35 °Be) aproximadamente en el mismo momento de la fermentación. Aunque los patrones no

son nítidos, sí se aprecia que las bandas coinciden en tamaño molecular con las de la cepa inoculada 153.12 sin que haya bandas adicionales.

En el **panel IV** se observa que en las muestras tomadas ese día en los tres depósitos, D (4,6 °Be), K (6,2 °Be) y Q (6,1 °Be), la cepa que estaba llevando a cabo la fermentación fue la inoculada, ya que las bandas de los patrones resultaron iguales.



**Figura 92.** Perfiles de restricción del ADN mitocondrial para la enzima *Hinf I* de muestras tomadas de mosto fermentando. Los paneles representan los distintos días en los que se hizo el análisis para varios depósitos de fermentación; I correspondió al día 11/8/05; II al 22/8/05; III al 25/8/05; IV al 29/8/05 y V al 5/9/05 (Tablas 13 y 14). M representa al marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -*Hind III* (SIGMA) y 153.12 corresponde al patrón de restricción de la cepa inoculada.

Y por último en el **panel V**, en los dos depósitos analizados E (6,9 °Be) y P (4,48 °Be), se observa que, aunque las bandas tampoco están muy definidas, no hay otras bandas adicionales ni ausencia de éstas con respecto a las del patrón de la cepa inoculada, pudiéndose pensar que esta cepa fue la que predominaba en ese momento.

### 5.1.1. Comparación de los resultados del control microbiológico rápido con los obtenidos mediante *Electroforesis en Campo Pulsante*

Para comprobar que realmente el método fue válido y sirvió para saber si la cepa inoculada fue la predominante durante las fermentaciones en los depósitos analizados, se compararon estos resultados con los obtenidos mediante *Electroforesis en Campo Pulsante* que se muestran en el apartado 2.5 de los resultados.

De manera que se analizó el cariotipo electroforético de los aislamientos realizados de las muestras de los depósitos F del día 22/8/05 (panel I); E, F, G y H que se muestran en el panel III, y del depósito E que se muestra en el panel V de la Figura 92.

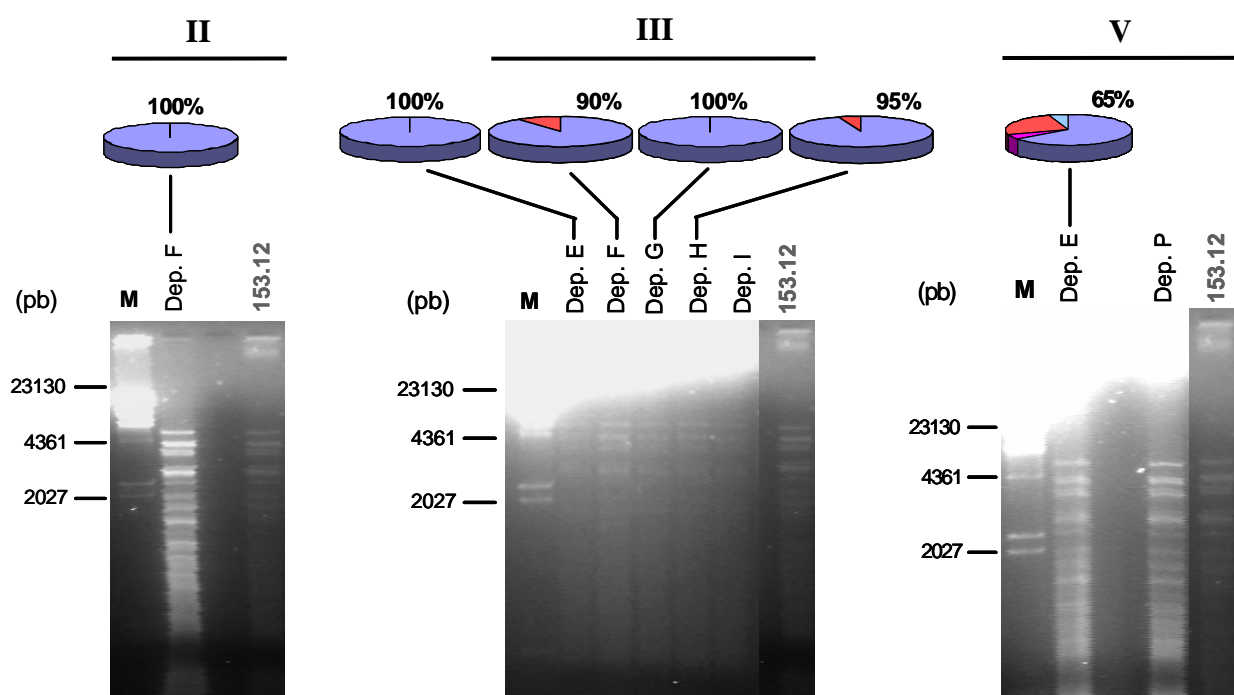
Se comparó el cariotipo electroforético de un total de 100 aislamientos (20 cepas/muestra) con los resultados obtenidos de los RFLP-ADNmt, mostrándose en la Figura 93.

Las gráficas indicaron que, efectivamente, en las 6 muestras analizadas la cepa predominante durante las fermentaciones en esos depósitos fue la inoculada, 153.12, con patrón cariotípico P5.

En el caso de la muestra tomada del depósito E (panel V de la Figura 93), los RFLPs mostraron que la cepa que predominó fue la inoculada 153.12, sin embargo después de analizar los cariotipos electroforéticos, solo se detectó un 65% de la cepa inoculada, un 25% de cepas con patrón P56, un 5% de cepas con patrón P43.10 y un 5% de cepas no-*Saccharomyces*. Teniendo en cuenta que las cepas con cariotipo P5 y P43.10 tienen el mismo patrón de restricción para el ADN mitocondrial con la

enzima *Hinf I* (Figura 81), el porcentaje de células con este patrón en la muestra tomada del depósito E aumentaría a un 70%.

El hecho de no detectar mediante los RFLPs otras cepas distintas a la inoculada, indicado por la presencia de más bandas u otro tipo de patrón de restricción, demuestra que estas cepas estaban en una concentración mucho más baja que la cepa inoculada, de hecho las cepas no-*Saccharomyces* que estuvieron presentes en un 5%, y las de patrón P56 en un 25% no se detectaron debido a que en el medio predominaron las células derivadas de la cepa inoculada.



**Figura 93.** Comparación de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial de las muestras tomadas de varios depósitos con los resultados obtenidos mediante *Electroforesis en Campo Pulsante*, en los que se muestra el porcentaje de cepas con cariotipo igual al de la inoculada, P5, representado en color azul en las gráficas de tartas.

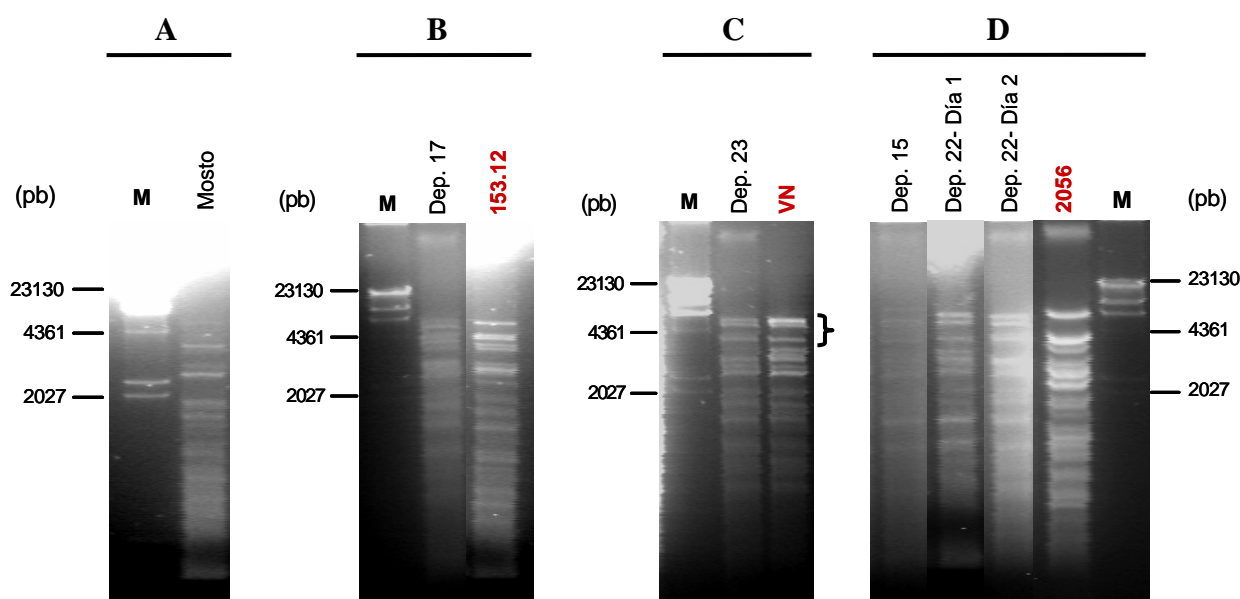
### 5.1.2. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de mostos tintos

Durante la vendimia de 2005 también se llevó a cabo un control microbiológico rápido, mediante RFLPs, de muestras tomadas de **mostos tintos** de distintos depósitos de fermentación que fueron inoculados con diferentes levaduras comerciales. Además se analizó una muestra de mosto antes de ser inoculado y otra



de un depósito de fermentación inoculado con la cepa autóctona seleccionada 153.12.

En el **panel A** de la Figura 94 se muestra que el patrón de restricción para la muestra de mosto presentó multitud de bandas, posiblemente debidas a la presencia en ese momento de una alta diversidad de cepas de levaduras, y que además puede ser indicativo de un posible inicio de la fermentación del mosto.



**Figura 94.** Perfiles de restricción para muestras tomadas de distintos depósitos. Los depósitos 15 y 22 fueron inoculados con la levadura comercial **Rhône 2056**, el depósito 23 con **VN** y el 17 con la cepa autóctona **153.12**. M corresponde al marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -*Hind III*.

El **panel B** corresponde a una muestra tomada del depósito 17, que fue inoculado con la cepa autóctona seleccionada 153.12, observándose que el patrón de restricción para el conjunto de células no correspondió con el de la cepa inoculada. De manera que no fue la cepa inoculada la que estuvo presente de forma mayoritaria en ese momento, sino que habría otras cepas autóctonas que la acompañaban.

En el **panel C** la muestra tomada del depósito 23 presentó un patrón de restricción similar al de la cepa comercial VN con la que se inoculó. Se podría decir que en este caso sí estaba presente la cepa comercial inoculada, porque se observan bandas que coinciden (zona señalada con un corchete negro), aunque no

predominando ya que el resto de bandas no coinciden, lo que podría indicar presencia de otras cepas.

En el **panel D** figuran los patrones de las muestras tomadas de los depósitos que fueron inoculados con la cepa comercial Rhône 2056. Se observa que en el depósito 15 no estaba predominando la levadura inoculada debido a la multitud de bandas detectadas con respecto al patrón de la cepa inoculada, siendo además similar al observado para la muestra de mosto (panel A). Esto podría ser indicativo de una alta diversidad de cepas en ese momento de la fermentación. Del depósito 22 se analizaron dos muestras correspondientes a distintos estados de la fermentación, estando el proceso más avanzado el segundo día. En ambos días podríamos decir que la población de cepas parece que se mantiene igual porque el patrón de restricción coincide entre ellos. Pero no es la levadura comercial la que está llevando a cabo la fermentación, ya que no coinciden los patrones de las muestras con el de la cepa inoculada. No descartamos la presencia de la cepa inoculada aunque no de forma mayoritaria.

En el caso de los mostos tintos de esta vendimia no podemos asegurar que las cepas inoculadas estuvieran presentes en el caso de obtener un patrón de restricción distinto al de éstas, ya que no se realizaron análisis de cariotipos electroforéticos para poder comprobar los resultados con los obtenidos mediante RFLPs.

## 5.2. Vendimia 2006

Esta vendimia no se ha incluido en el apartado 2 de los resultados, de manera que el comienzo del proceso se detalla a continuación. Al igual que en la de 2005 se utilizó sólo una de las cepas seleccionadas para inocular las fermentaciones. La cepa fue la 153.12 con cariotipo P5. Para iniciar el proceso se elaboró un solo pie de cuba, aunque sí por duplicado (a y b) en el laboratorio de Microbiología (UCA). Para ello se inoculó la cepa autóctona, a partir de biomasa crecida en placa de medio YPD, en 500 mL de mosto esterilizado en autoclave (126 °C, 20 min.). A los dos días se realizó el escalamiento a 2 litros de mosto, también esterilizado en las mismas condiciones que el volumen anterior, y pasados cuatro días se escaló a 18

litros de mosto descongelado para tener un volumen total de 20 litros de pie de cuba de cada duplicado.

A partir de este volumen los escalamientos del pie de cuba se realizaron en los lagares de elaboración de la bodega, de manera que los 20 litros de cada duplicado “a” y “b” se agitaron muy bien, se mezclaron y se adicionaron al siguiente volumen para tener en total 700 litros de pie de cuba. Posteriormente se realizaron más escalamientos hasta tener el volumen final el día 23/8/06 que fue repartido a los depósitos de fermentación. Los escalamientos a volúmenes mayores se efectuaron cuando el inóculo alcanzaba un grado Beaumé bajo.

Diariamente se tomaron muestras de todos los depósitos de fermentación y del pie de cuba que fueron glicerizadas al 20% y conservadas a -80 °C.

Durante la vendimia se realizó el control microbiológico rápido mediante la obtención del patrón de restricción del ADN mitocondrial de muestras de mosto fermentando tomadas tanto del pie de cuba como de los depósitos de fermentación. Los resultados se indican en la Figura 95.

En el panel del **pie de cuba** de la Figura 95 se muestran los controles realizados en distintos momentos en la elaboración del pie de cuba: para los dos duplicados con 20 litros, “a” y “b” con un °Be de 3,4 y 3,8 respectivamente; para un volumen de 1.000 litros con 5,5 °Be; y antes de repartirlo a los depósitos de fermentación con fecha del 23/8/06. Se comprobó que en todas las muestras analizadas la cepa inoculada 153.12 fue la mayoritaria dentro de la población analizada, ya que los patrones de restricción para el ADN mitocondrial del conjunto de células coincidieron con el de la cepa inoculada.

En cuanto a los **depósitos de fermentación** se analizaron un total de 33 muestras correspondientes a 16 depósitos. De la mayoría de ellos se analizaron distintos días de la fermentación que se indica con la fecha de la toma de muestras en la Figura 95

En los **depósitos A, B, E, F, H, N, I y Q**, observando el patrón de restricción se pudo confirmar que la cepa que predominó fue la inoculada 153.12.

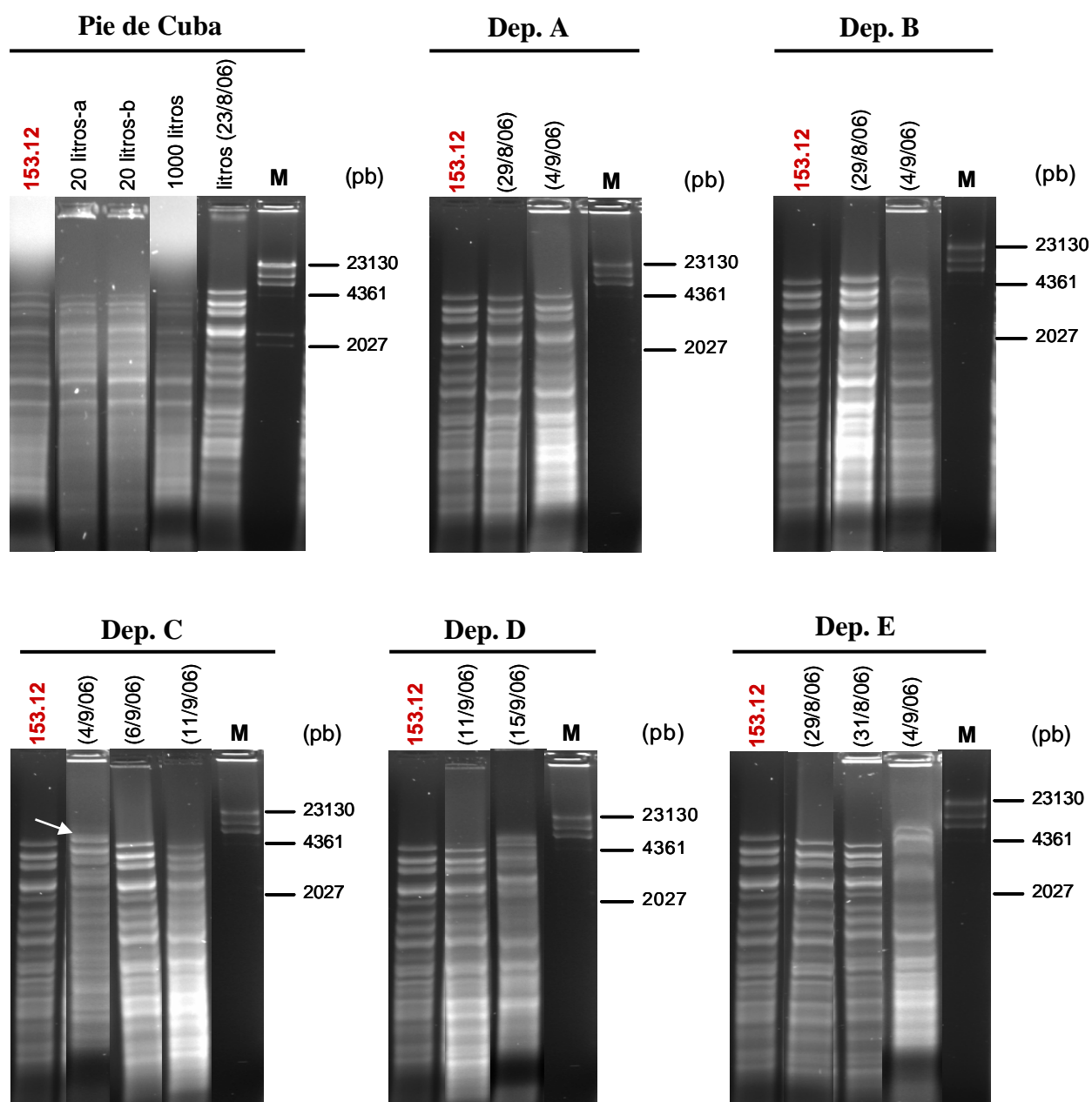


Figura 95.

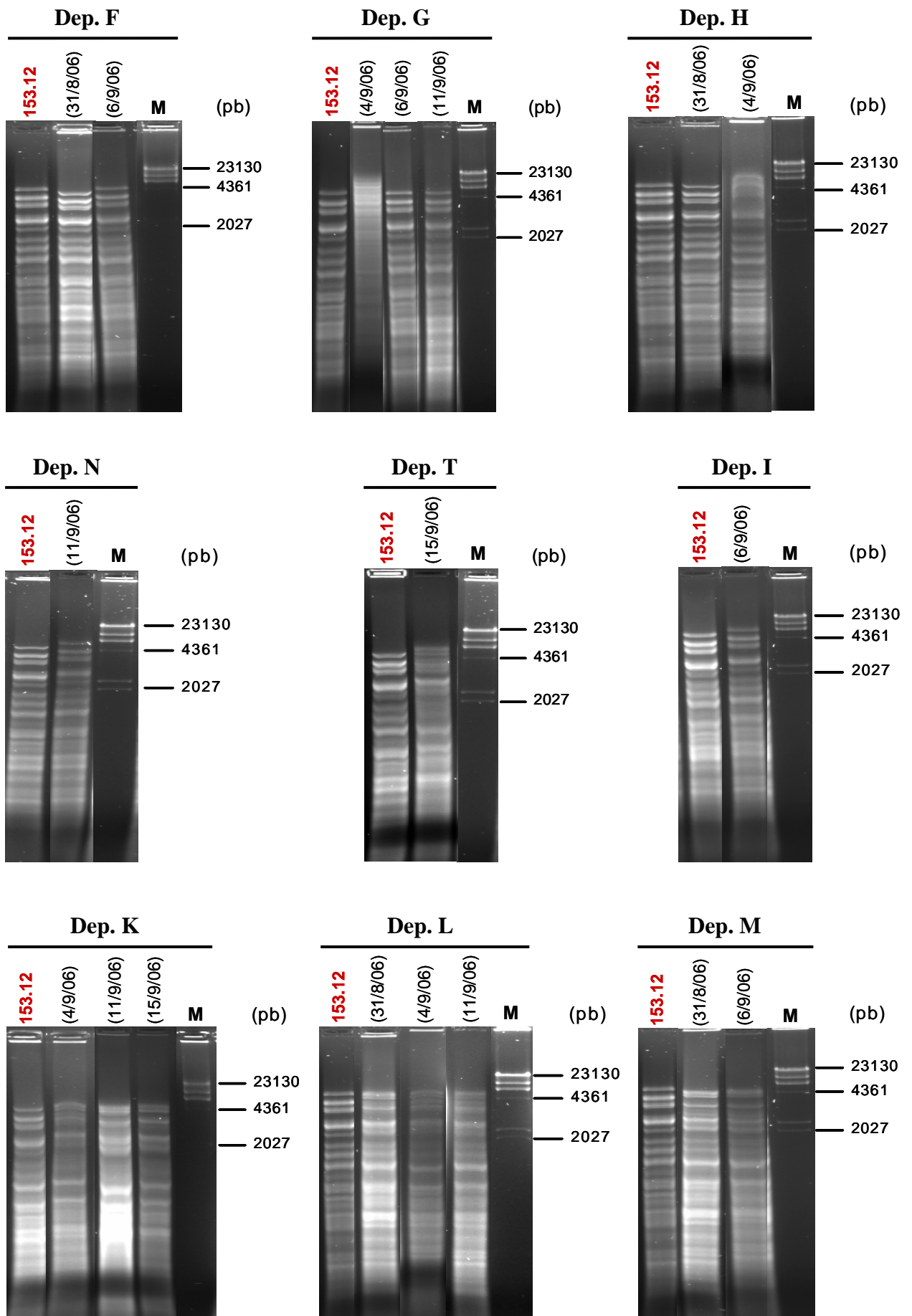
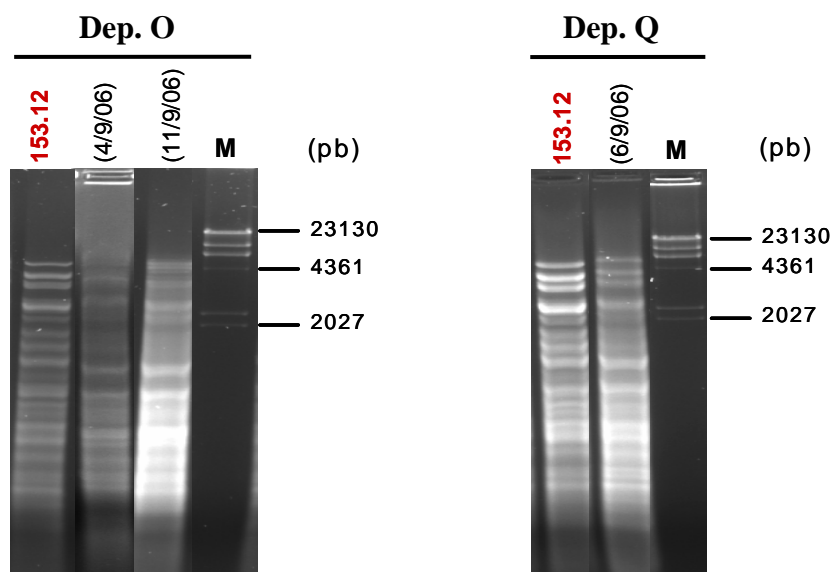


Figura 95 (Continuación).



**Figura 95** (Continuación). Perfiles de restricción de muestras tomadas del pie de cuba y de distintos depósitos de fermentación. En cada depósito se indica la fecha en que fue tomada la muestra para ser analizada. 153.12 indica la cepa autóctona inoculada. M corresponde al marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -Hind III.

En el **depósito C**, el primer día analizado (4/9/06) se observa que la cepa inoculada no predominó al 100% ya que se detectaron en el patrón de restricción algunas bandas adicionales (flecha blanca) con respecto al patrón de la cepa inoculada, aunque seguramente ésta estuvo presente de forma mayoritaria debido a la similitud observada entre los patrones, y porque en las dos muestras siguientes analizadas los patrones fueron iguales al de la cepa inoculada.

En el **depósito D**, en la Figura 95 observamos que en la primera muestra analizada sí predominó la cepa inoculada, pero cuatro días después (15/9/06) deja de hacerlo y parece que es otra población de levaduras la que se implanta, lo cual no quiere decir que la cepa inoculada no estuviera presente.

En el **depósito T** sólo se analiza una muestra tomada el día 15/9/06. En ella el patrón de restricción del ADN mitocondrial de la población de levaduras que predomina no correspondió con el de la cepa inoculada, aunque coincidió con el observado en la muestra del día 15/9/06 del depósito D.

En el caso del **depósito G** observamos que de los tres días analizados el primero presentó un patrón de restricción con multitud de bandas que fue similar al

observado en el panel A de la Figura 94 para el caso de una muestra de mosto. Esto nos llevó a pensar que la muestra se tomó justo después de realizar una recarga de mosto en este depósito, ya que en las dos muestras siguientes analizadas el patrón de restricción fue igual al de la cepa inoculada, es decir que ésta se implantó con éxito a medida que fue avanzando la fermentación.

Para el **depósito K** se observa que en las tres muestras analizadas los patrones de restricción fueron iguales entre ellas pero distintos al de la cepa inoculada, lo cual indicó que ésta no se implantó de forma mayoritaria en el depósito.

En el **depósito L** ocurrió lo mismo que en el anterior, es decir, que en las tres muestras analizadas los patrones de restricción fueron iguales entre ellos pero distintos al de la cepa inoculada. Estos patrones fueron muy similares a los observados para el depósito K.

En el **depósito M** pudimos afirmar que la población de levaduras predominante en los dos días analizados fue igual a la que predominó en el depósito K ya que los patrones de restricción fueron similares. En este caso tampoco se implantó de forma mayoritaria la cepa inoculada.

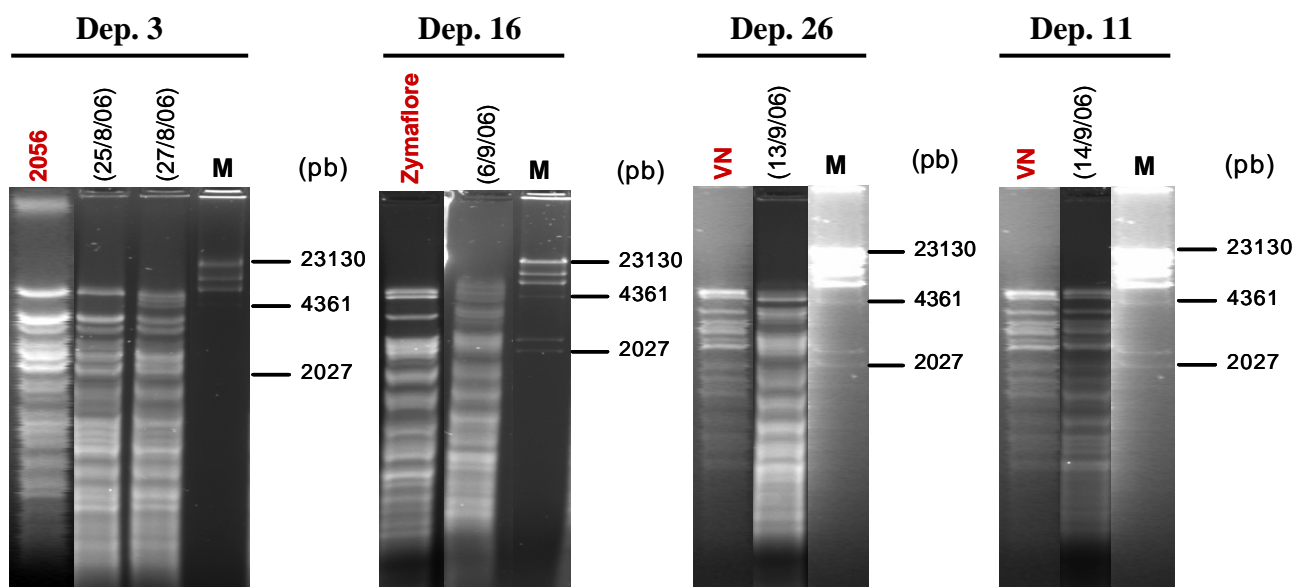
Para el **depósito O**, nuevamente, en las dos muestras analizadas se observa que los patrones de restricción para el ADN mitocondrial fueron iguales entre ellos y distintos al de la cepa inoculada, y además coincidieron con los patrones que mostraron las muestras tomadas de los depósitos K y M.

Resumiendo, podríamos decir que en el caso de los depósitos K, M y O, en los que el patrón de restricción fue el mismo, predominó la misma población de levaduras, y quizás dentro de ella hubo alguna cepa en concreto que pudo estar en proporciones elevadas, no tratándose de la inoculada. Tendríamos que analizar cada muestra minuciosamente, aislando colonias y aplicando la técnica molecular de PFGE, por ejemplo, para confirmar estos resultados y determinar la presencia y las proporciones de las cepas que llevaron a cabo el control del proceso en cada caso.

De los 16 depósitos analizados, en 10 de ellos se observó una clara implantación de la cepa autóctona inoculada, y en menor medida en el depósito D. Los análisis sensoriales del vino obtenido en esta vendimia, realizados por personal especializado en catas, indicaron que éste fue de una calidad excelente, comparable al obtenido en la vendimia de 2001.

### 5.2.1. Control microbiológico rápido durante las fermentaciones de mostos tintos

Durante la vendimia 2006 también se analizaron distintas muestras tomadas de mostos tintos mediante RFLP-ADNmt. Se estudiaron cuatro depósitos de fermentación que fueron inoculados con distintas levaduras comerciales liofilizadas (LSA) para comprobar la implantación de éstas. Los resultados se muestran a continuación:



**Figura 96.** Perfiles de restricción para muestras tomadas de distintos depósitos de fermentación de vinos tintos. El depósito 3 se inoculó con la levadura comercial Rhône 2056, el 16 con Zymaflore y los depósitos 26 y 11 con VN. M corresponde al marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -Hind III.

El **depósito 3** fue inoculado con la levadura comercial Rhône 2056. De las dos muestras analizadas, en la primera se observa que el patrón de restricción coincidió con el de la cepa inoculada. Sin embargo, a los dos días, el patrón de



restricción cambia, detectándose bandas adicionales con respecto a la cepa comercial y otras similares. Esto indicó, según nuestro criterio, que en el segundo día analizado la cepa inoculada seguramente estuvo compitiendo con otras autóctonas y fue desplazada parcialmente por éstas.

El **depósito 16** fue inoculado con la levadura comercial Zymaflore. En la muestra analizada el patrón de restricción tuvo multitud de bandas, no coincidiendo con el patrón de la cepa inoculada, lo cual indicó que posiblemente la fermentación la estuviera llevando a cabo una población de levaduras formada por una amplia diversidad de cepas.

Los **depósitos 26 y 11** fueron inoculados con la cepa comercial VN. En el primer depósito se observa que la cepa inoculada no fue la predominante ya que el patrón de restricción resultó distinto al de la cepa inoculada, siendo otras levaduras las que quizás estuvieron llevando a cabo la fermentación. Sin embargo, en el depósito 11 sí que se pudo afirmar que la levadura predominante fue la inoculada ya que los patrones de restricción de la cepa inoculada y de la población existente en la muestra analizada fueron iguales.

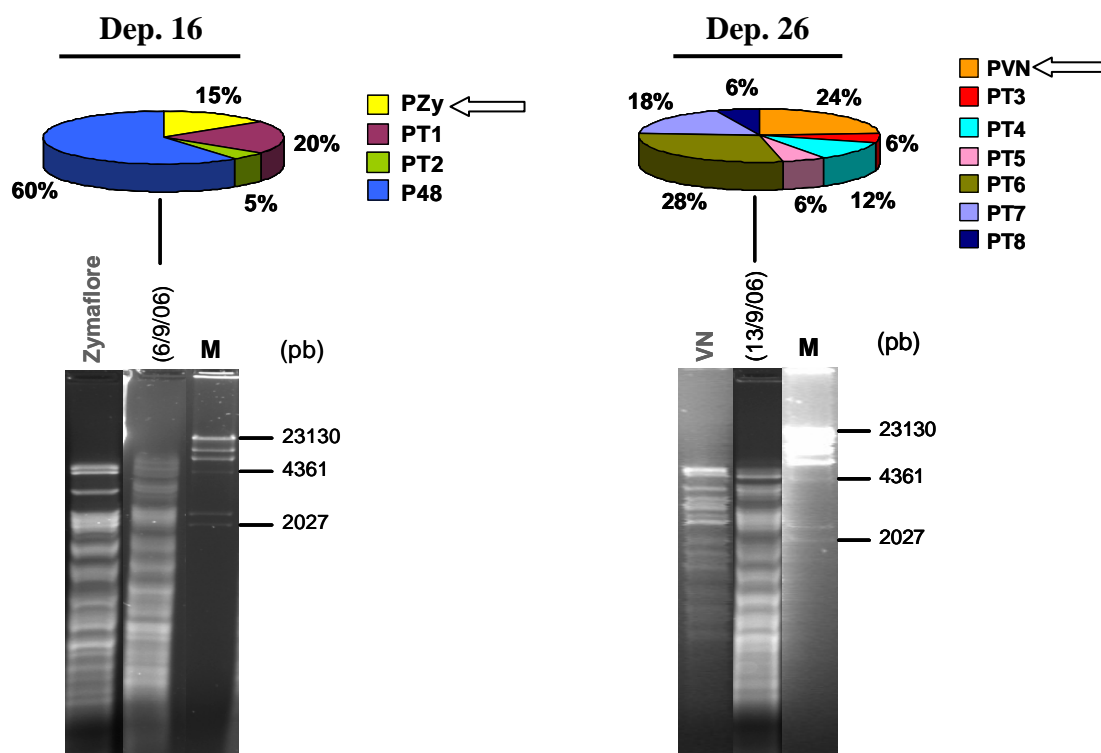
### **5.2.2. Comparación de los resultados de los RFLPs del ADN mitocondrial de los mostos tintos con los obtenidos mediante *Electroforesis en Campo Pulsante***

Durante la vendimia, además de analizar diversas muestras mediante RFLP-ADNmt, se fueron tomando muestras de los distintos depósitos destinados a las fermentaciones de vinos tintos. Estas muestras fueron glicerizadas y conservadas a -80 °C para ser analizadas posteriormente.

Para comprobar los resultados obtenidos mediante el control microbiológico rápido por RFLPs durante las fermentaciones, se aplicó la técnica de *Electroforesis en Campo Pulsante* a dos muestras pertenecientes a dos depósitos, 16 y 26, en las que no se observó predominancia de la cepa inoculada. Para ello de las muestras conservadas se hicieron diluciones, se sembraron en placas de Petri con medio YPD y se incubaron a 28 °C durante 3-4 días. De las placas más representativas, aquéllas

que presentaron al menos 100 colonias totalmente aisladas, se eligieron 30 aislamientos al azar.

De la muestra tomada del depósito 16 se analizó el cariotipo electroforético de un total de 20 colonias aisladas, y del depósito 26 se analizó el cariotipo de un total de 17 aislamientos. Los resultados se muestran a continuación:



**Figura 97.** Comparación de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial de las muestras tomadas de los depósitos 16 y 26 con los resultados obtenidos mediante *Electroforesis en Campo Pulsante*, en los que se muestra el porcentaje de las distintas cepas presentes en dichas muestras. El cariotipo de la levadura comercial *Zymaflore* (PZy) se representa en amarillo en la gráfica, mientras que el de VN (PVN) se muestra en color naranja.

En el caso del **depósito 16** se comprueba que en la muestra analizada la cepa inoculada no estuvo presente de forma mayoritaria detectándose sólo en un 15% (color amarillo, señalado con un flecha blanca en la Figura 97). En principio, cuando se analizó el patrón de restricción, se indicó que podría existir en esa muestra una amplia variabilidad de cepas, y sin embargo observamos un bajo polimorfismo cromosómico, y que realmente existió una cepa predominante, aquella que mostró el patrón cariotípico P48 en un 60%. En menor proporción se detectaron cepas con

patrones llamados PT1 y PT2 en un 20 y 5% respectivamente. El patrón P48 se ha llamado así por su similitud con el detectado entre las poblaciones de levaduras pertenecientes a fermentaciones de mostos blancos.

En el caso del **depósito 26** se detectó una mayor variabilidad genética en la muestra analizada observándose 6 patrones cariotípicos pertenecientes a cepas autóctonas. La cepa inoculada estuvo presente en un 24% (color naranja indicado con una flecha blanca en la Figura 97).

Con estos resultados comprobamos de nuevo que cuando el patrón de restricción no coincide con el de la cepa inoculada se puede asegurar que ésta no se encuentra de forma mayoritaria en el medio, pero no implica que no esté presente.

### 5.3. Discusión

Durante las vendimias 2001 hasta 2005, que fueron inoculadas con cepas de levaduras autóctonas seleccionadas, el seguimiento de éstas a lo largo de las fermentaciones fue realizado utilizando la técnica molecular de *Electroforesis en Campo Pulsante* una vez finalizada la vendimia. Con estos análisis se ha logrado estudiar lo que ocurría durante el proceso, es decir, si las cepas inoculadas se implantaban con éxito o si por el contrario eran otras las que predominaban. Además también se ha mostrado el efecto que pueden tener operaciones como la adición de mosto fresco o el control de la temperatura sobre las poblaciones de las levaduras, y en este sentido la utilización de esta técnica ha sido muy útil para poder actuar en vendimias posteriores a las que se iban estudiando y mejorar el proceso. El inconveniente que presenta esta técnica es que resulta compleja, no es económica debido al coste del equipo, requiere personal especializado y es muy laboriosa, necesitando al menos 2 semanas desde la toma de muestras hasta obtener los resultados, no pudiendo saber hasta entonces si las cepas inoculadas dirigen las fermentaciones o no.

De los resultados obtenidos en la vendimia 2005 (Figura 93) y los obtenidos en la de 2006 (Figura 97), tras la aplicación de la técnica de RFLP-ADNmt a

muestras tomadas directamente del mosto fermentando, se puede afirmar que ésta ha supuesto una herramienta muy útil para el control microbiológico en el caso de fermentaciones inoculadas con una sola cepa de levadura seleccionada (comercial o autóctona).

La necesidad de monitorizar las levaduras inoculadas durante las fermentaciones en tiempos relativamente cortos, cada vez tiene más importancia en las bodegas, ya que en caso de tener sospecha de que no esté presente la cepa inoculada, se pueda actuar sobre las fermentaciones adicionando más inóculo, lo cual supone una ventaja para el bodeguero.

López y colaboradores (López y col. 2003) propusieron un método rápido y simple para realizar el seguimiento de las cepas inoculadas durante las fermentaciones del vino. El método está basado en la técnica molecular de PCR, no siendo necesario el aislamiento de colonias de levaduras ni del ADN, es decir, que se analiza directamente la muestra de mosto, obteniendo los resultados en poco tiempo, a las 8 horas aproximadamente. En nuestro caso tardamos en torno a 20 horas, aunque sería posible reducir este tiempo si los análisis se llevaran a cabo en la misma bodega de elaboración, ya que la aplicación de la técnica es relativamente fácil y el equipo no resulta costoso.



## **V. CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

1. En el primer año de estudio (1999), la caracterización genética de las cepas de levaduras implicadas en la fermentación espontánea del vino joven estudiado, llevada a cabo utilizando la técnica molecular de *Electroforesis en Campo Pulsante*, puso de manifiesto:

(i) La existencia de un elevado polimorfismo cromosómico, característico de las levaduras vínicas que participan en un proceso industrial

(ii) La dominancia de cuatro cepas durante la fermentación espontánea, aquéllas con cariotipos P1, P2, P3 y P5, que fueron las principales responsables del proceso

(iii) La detección de cepas no-*Saccharomyces*, durante las primeras horas de la fermentación, identificadas por no presentar en sus cariotipos bandas con una movilidad electroforética por debajo de 500 kb

2. Las principales características de interés enológico de las cepas de levadura dominantes durante el proceso industrial se estudiaron en detalle en el laboratorio. Las cepas con cariotipos P1, P2, P3 y P5 presentaron fenotipo killer, tuvieron un poder fermentativo elevado y presentaron porcentajes de inhibición por etanol similares. En el estudio de la capacidad de implantación de las 4 cepas pre-seleccionadas en condiciones semi-industriales (100.000 L) se estableció una correspondencia entre la abundancia de cepas específicas y la calidad del vino fermentado. En el Experimento 1 se detectó mayor polimorfismo cromosómico, no hubo un claro predominio de las cepas inoculadas y el vino resultante no tuvo características organolépticas destacadas. Mientras que en el Experimento 2, en el que predominaron las cepas con patrones cariotípicos P2 y P5, el vino obtenido fue de mayor calidad organoléptica.

3. La selección de cepas autóctonas se realizó teniendo en cuenta sobre todo el estudio de la capacidad de implantación de las levaduras, sirviendo el análisis de los parámetros de interés enológico de apoyo a dicha selección. Las cepas



elegidas fueron por tanto 313.4 (P2), 313.10 (P3) y 153.12 (P5), que se utilizaron para dirigir las fermentaciones en condiciones industriales en la primera vendimia inoculada en 2001.

4. De los cinco años en los que se inocularon las fermentaciones (2001-2005), tras el estudio del cariotipo electroforético de un elevado número de aislamientos, se obtienen las siguientes conclusiones:

(i) La disminución del polimorfismo cromosómico con respecto a las fermentaciones espontáneas

(ii) El desplazamiento de las cepas no-*Saccharomyces*, no detectándose estas levaduras al comienzo de las fermentaciones

(iii) El predominio de la cepa inoculada con cariotipo P5 en las vendimias 2001, 2004 y 2005. Esta cepa se implantó desde el comienzo del proceso de forma mayoritaria en los depósitos de fermentación. El vino obtenido en estas vendimias tuvo unas características organolépticas mejoradas con respecto al obtenido en las fermentaciones espontáneas

(iv) Las cepas inoculadas tuvieron una aportación importante a la hora de favorecer el desarrollo de otras cepas que fueron las predominantes en las fermentaciones de las vendimias 2002 y 2003. El vino obtenido en estas vendimias también tuvo buenas características organolépticas con respecto a las vendimias en las que se fermentó de manera espontánea, aunque no tan destacadas como en las que predominó la cepa con cariotipo P5

(v) La elaboración del pie de cuba es el paso inicial del proceso de vinificación que más hay que controlar, para asegurar la implantación de las levaduras inoculadas, ya que existen determinados factores que pueden afectar al desarrollo de las cepas tales como: los escalamientos, la temperatura de fermentación y las recargas de mosto

5. Se ha puesto de manifiesto la importancia de inocular las fermentaciones con levaduras autóctonas seleccionadas frente a las espontáneas. Las cepas autóctonas están mejor adaptadas a las condiciones de vinificación de una determinada zona productora de vino aportando a éste las características organolépticas típicas del vino. Desde que en 2001 se empezaron a inocular las fermentaciones con las cepas autóctonas, se ha producido una mejora en las cualidades sensoriales del vino que se estudia (Ver anexo: referente al reconocimiento del vino por expertos internacionales).
  
6. Del estudio global de la diversidad genética de las cepas de levaduras presentes en las fermentaciones en los 7 años estudiados observamos la permanencia de determinadas cepas de unos años a otros, pudiendo ser representativas de la zona enológica estudiada, y quizás residentes de la bodega de elaboración. Por otro lado se ha considerado el mosto como una fuente en el aporte de nuevas cepas de levaduras, observadas en cada año estudiado.
  
7. El estudio de la estabilidad de los cariotipos nos confirmó la estabilidad genética de la cepa seleccionada con cariotipo P5. Por otro lado, se ha considerado la posibilidad de formación de cepas híbridas en un medio natural como es el mosto fermentando que pudieron dar lugar a la aparición de los cariotipos similares a P5 detectados en la vendimia 2003.
  
8. La aplicación de la técnica molecular de RFLP-ADNmt a muestras tomadas directamente del mosto fermentando sin necesidad de realizar aislamientos ha llevado a tener un mayor control del proceso de fermentación dada la rapidez en la obtención de los resultados. La coincidencia entre el patrón de restricción del ADN mitocondrial utilizando la enzima *Hinf I*, del conjunto de células recogidas en un momento determinado de la fermentación y el patrón de la cepa inoculada es indicativo del predominio de la cepa inoculada.



## **VI. ANEXO**



## VI. ANEXO

### **Los enólogos franceses premian al “Castillo” (Lunes 2· abril 2007, Diario de Jerez)**

JEREZ. “Castillo San Diego”, de Bodegas Barbadillo, ha sido galardonado con la medalla de plata en el prestigioso concurso Vinalies Internacionales que organiza la Unión de Enólogos de Francia en la ciudad de París. En este concurso, cada productor defiende las particularidades y lo especial de sus vinos frente a un panel de catas que está compuesto por 137 expertos internacionales. El “Castillo” es el primer vino de la Tierra de Cádiz que obtiene un reconocimiento internacional. La nota de cata de “Castillo San Diego” cosecha 2006, es un vino limpio y brillante de color amarillo pajizo. La entrada en boca es fresca, sin acidez, con buen cuerpo y equilibrado.



## VII. BIBLIOGRAFÍA





## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.; Puskas-Rozca, S.; Simlar, J.; Wilke, C. M. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 22: 13-19 (1992).
- Andaluz, E.; Gómez-Raja, J.; Hermosa, B.; Ciudad, T.; Rustchenko, E.; Calderone, R.; Larriba, G. Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of rad52- $\Delta\Delta$  strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet. Biol.* (2007). (Article in press).
- Bakalinsky, A. T.; Snow, R. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 367-382 (1990).
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. *Yeast: Characterization and Identification*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge (1990).
- Barre, P.; Vezinhet, F.; Dequin, S.; Blondin, B. Genetic improvement of wine yeast. *Wine microbiology and biotechnology* (ed. G. H. Fleet), 421-447 (1993).
- Bauer, F. F.; Pretorius, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 27-51 (2000).
- Beltran, G.; Torija, M. J.; Nova, M.; Ferrer, N.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Rozès, N.; Mas, A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System Appl. Microbiol.* 25: 287-293 (2002).
- Benítez, T.; Martínez, P.; Codón, A. C. Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiology* 12: 371-384 (1996).
- Bisson, L. Stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119 (1999).
- Blanco, P.; Ramilo, A.; Cerdeira, M.; Orriols, I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 351-357 (2006).
- Cappello, M. S.; Blevé, G.; Grieco, F.; Dellaglio, F.; Zacheo, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1274-1280 (2004).
- Carle, G. F.; Olson, M. V. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 3756-3760 (1985).

- Carro, D.; Piña, B. Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains. *Yeast* 18: 1457-1470 (2001).
- Carro, D.; García-Martínez, J.; Pérez-Ortín, J. E.; Piña, B. Structural characterization of chromosome I size variants from a natural yeast strain. *Yeast* 20: 171-183 (2003).
- Cavaliere, D.; Townsend, J. P.; Harl, D. L. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 97: 12369-12374 (2000).
- Chindamporn, A.; Iwaguchi, S.; Nakagawa, Y.; Homma, M.; Tanaka, K. Clonal size-variation of rDNA cluster region on chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1409-1415 (1993).
- Chu, G; Vollarath, D.; Davis, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science* 234: 1582-1585 (1986).
- Ciani, M.; Vincenzo, P. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *J. Sci. Food Agric.* 82: 573-578 (2002).
- Ciani, M.; Mannazzu, I.; Marinangeli, P.; Clementi, F.; Martini, A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 159-164 (2004).
- Codón, A. C.; Benítez, T. Variability of the physiological features and the nuclear and mitochondrial genomes of baker's yeast. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 343-352 (1995).
- Codón, A. C.; Benítez, T.; Korhola, M. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast. *Curr. Genet.* 32: 247-259 (1997).
- Codón, A. C.; Benítez, T.; Korhola, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 154-163 (1998).
- Combina, M.; Elía, A.; Mercado, L.; Catania, C.; Ganga, A.; Martínez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 237-243 (2005).
- Comitini, F.; Ciani, M. Survival of inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strain on wine during two vintages. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 248-253 (2006).

- Constantí, M.; Poblet, M.; Arola, L.; Mas, A.; Guillamón, J. M. Analysis of yeast population during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 339-344 (1997).
- Constantí, M.; Reguant, C.; Poblet, M.; Zamora, F.; Mas, A.; Guillamón, J. M. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 169-175 (1998).
- Coratza, G.; Musmanno, R. A.; Cresti, S.; Vagnoly, P.; Maccio, T. L'evoluzione della popolazione di lieviti durante la fermentazione. *Vignevini* 9: 24-27 (1992).
- Cromie, G. A.; Connelly, J. C.; Leach, D. R. Recombination at double-strand breaks and DAN ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell* 8: 1163-1174 (2001).
- Da Silva, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeast in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 112-121 (1996).
- De Jonge, P.; De Jongh, F. C. M.; Meijers, R.; Steensma, H. Y.; Scheffers, W. A. Orthogonal-Field-Alternation-Gel-Electrophoresis banding patterns of DNA from yeast. *Yeast* 2: 193-204 (1986).
- De Zamaroczy, M.; Bernardi, G. Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast. *Gene* 37: 1-17 (1985).
- Deak, T. Simplified techniques for identifying foodborne yeast. *Int. J. food Microbiol.* 19: 15-26 (1993).
- Degre, R. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G. pp. 421-447. Switzerland: Harwood Academic (1993).
- Demuyter, C.; Lollier, M.; Legras, J. L.; Le Jeune, C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97:1140-1148 (2004).
- E.B.C. (European Brewery Convention). Analytica microbiologica. *J. Inst. Brew.* 83: 115-117 (1977).
- Egli, C. M.; Edinger, W.D.; Mittrakul, C. M.; Henick-Kling, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory

- character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 779-789 (1998).
- Epifanio, S. I.; Gutierrez, A. R.; Santamaría, M. P.; López R. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strain spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (2): 219-224 (1999).
- Espinosa, J. C.; Fernández-González, M.; Ubeda, J.; Briones, A. Identification of wine yeast by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (2): 157-160 (2002).
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337 (1999).
- Esteve-Zarzoso, B.; Gostinçar, A.; Bobet, R.; Uruburu, F.; Querol, A. Selection and molecular characterization of wine yeast isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiol.* 17: 553-562 (2000).
- Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Toran, M.; García-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of Sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2056-2061 (2001).
- Fernández-Espinar, M. T.; Esteve-Zarzoso, B.; Querol, A.; Barrio, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast. *Anton. Leeuw.* 78: 87-97 (2000).
- Fernández-Espinar, M. T.; López, V.; Ramón, D.; Bartra, E.; Querol, A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food. Microbiol.* 70: 1-10 (2001).
- Fleet, G. H.; Heard G. M. Yeast-growth during fermentation. In: *Fleet GH (Ed) Wine Microbiology and Biotechnology* (pp: 27-54) Harwood, Chur (1993).
- Fleet, G. H. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food. Microbiol.* 50: 101-117 (1999).
- Florido, A. Seguimiento poblacional de levaduras implicadas en la fermentación tumultuosa en la elaboración de vinos finos. Influencia de la inoculación de cepas comerciales. Tesis de licenciatura (2000).
- Foiani, M.; Pelliccioli, A.; Lopes, M.; Lucca, C.; Ferrari, M.; Liberi, G.; Falconi, M. M.; Plevani, P. DNA damage checkpoints and DNA replication controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 451: 187-196. Review (2000).

- Foury, F.; Roganti, T.; Lecrenier, N.; Purnelle, B. The complete sequence of mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440: 325-331 (1998).
- Frezier, V.; Dubordieu, D. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4): 375-380 (1992).
- Ganga, M. A.; Martínez, C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeast. *J. Appl. Microbiol.* 96: 76-83 (2004).
- Gardner, D. R.; Burke, D. J. The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Cell Biol.* 10: 154-158. Review (2000).
- Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S. G. Life with 6000 genes. *Science* 274 (5287): 546, 563-567 (1996).
- González, S. S.; Gallo, L.; Climent, M. D.; Barrio, E.; Querol, A. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 11-18 (2007).
- Granchi, L.; Ganucci, D.; Viti, C.; Giovannetti, L.; Vincenzini, M. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 54-58 (2003).
- Groth, C.; Hansen, J.; Piskur, J. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1933-1938 (1999).
- Guerra, E.; Mannazu, I.; Sordi, M.; Tangherlini, M.; Clementi, F.; Fatichenti, F. Characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from the Italian region of Marche : hunting for new strains for local wine quality improvement. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 49: 79-88 (1999).
- Guijo, S.; Mauricio, J. C.; Salmon, J. M.; Ortega, J. M. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast* 13: 101-117 (1997).
- Guillamón, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. Rapid identification of wine yeast species base don RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392 (1998).

- Gutiérrez, A. R.; Lopez, R.; Santamaría, P.; Sevilla, M. J. Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. *Int. J. Food. Microbiol.* 36: 241-245 (1997).
- Gutiérrez, A. R.; Santamaría, P.; Epifanio, S.; Garijo, P.; Lopez, R. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 411-415 (1999).
- Hackett, J. A.; Feldser, D. M.; Greider, C. W. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106: 275-286 (2001).
- Hall, T. A. Bio edits a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98 (1999).
- Heard, G. H.; Fleet, G. H. Growth of natural yeast during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 727-728 (1985).
- Heard, G. M.; Fleet, G. H. Occurrence and growth of killer yeast during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2171-2174 (1987).
- Heard, G. M.; Fleet, G. H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 23-28 (1988).
- Heard, G. Novel yeast in wine making - looking to the future. *Food Australia* 51: 347-352 (1999).
- Infante, J. J.; Dombek, K. M.; Rebordinos, L.; Cantoral, J. M.; Young, E. T. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* 165: 1745-1759 (2003).
- Ibeas, J. I.; Lozano, I.; Perdignes, F.; Jiménez, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in Sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (3): 998-1003 (1996).
- Ibeas, J. I.; Jiménez, J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 7-12 (1997).
- Izgü, F.; Altinbay, D.; Yücelis, A. Identification and killer activity of yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiol.* 14: 125-131 (1997).

- Johnston, J. R.; Baccari, C.; Mortimer, R. K. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeast by tetrad analysis. *Res. Microbiol.* 151: 583-590 (2000).
- Kocková-Kratochvilová, A. Yeast and yeast-like organisms. *VCH* (1990).
- Kolodner, R. D.; Putnam, C. D.; Myung, K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297: 552-557 (2002).
- Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. Yeast and its importance in wine aroma: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 97-129 (Special Issue) (2000).
- Le Jeune, C.; Erny, C.; Demuyter, C.; Lollier, M. Evolution of population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol.* 23: 709-716 (2006).
- Le Jeune, C.; Lollier, M.; Demuyter, C.; Erny, C.; Legras, J. L.; Aigle, M.; Masneuf, I. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.* 7: 40-549 (2007).
- Llauradó, J. M.; Rozès, N.; Constantí, M.; Mas, A. Study of some *Saccharomyces cerevisiae* for winemaking after preadaptation at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1003-1011 (2005).
- Longo, E.; Cansado, J.; Agrelo, D.; Villa, T. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape must from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 141-144 (1991).
- Longo, E.; Vezinhet, F. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 322-326 (1993).
- Lopandic, K.; Gangl, H.; Wallner, E.; Tscheik, G.; Leitner, G.; Querol, A.; Borth, N.; Breitenbach, M.; Prillinger, H.; Tiefenbrunner, W. Genetically different wine isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* (2007).
- Lopes, C. A.; van Broock, M.; Querol, A.; Caballero, A. C. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 93: 608-615 (2002).
- Lopes, C. A.; Lavalle, T. L.; Querol, A.; Caballero, A. C. Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Anton. Leeuw.* 89: 147-156 (2005).



- Lopes, C. A.; Rodríguez, M. E.; Sangorrín, M.; Querol, A.; Caballero, A. C. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 139-149 (2007).
- López, V.; Fernández-Espinar, M. T.; Barrio, E.; Ramón, D.; Querol, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 63-71 (2003).
- Lurton, L.; Snackers, G.; Roulland, C.; Galy, B.; Versavaud, A. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J. Sci. Food Agri.* 67:485-491 (1995).
- Makower, M.; Bevan, E. A. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In: Geerts SJ (ed) Proceedings 11<sup>th</sup> International Congress on Genetics, vol I. Pergamon, Oxford, p. 203 (1963).
- Malkova, A.; Ivanov, E. L.; Haber, J. E. Double-strand break repair in absence of *RAD51* in yeast: A possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7131-7136 (1996).
- Marinoni, G.; Manuel, M.; Petersen, R. F.; Hvidtfeldt, J.; Sulo, P.; Piskur, J. Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeast. *J. Bacteriol.* 181: 6488-6496 (1999).
- Marquina, D.; Santos, A.; Peinado, J. M. Biology of killer yeast. *Int. Microbiol.* 5: 65-71 (2002).
- Martinez, P.; Codón, A. C.; Pérez, L.; Benítez, T. Physiological and molecular characterization of flor yeast: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* 11: 1399-1411 (1995).
- Martínez, M.; Gac, S.; Lavín, A.; Ganga, M. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1161-1168 (2004).
- Martini, A. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 4: 165-176 (1993).
- Martini, A. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Microbiol.* 6: 207-209 (2003).
- Masneuf, I.; Hansen, J.; Groth, C.; Piskur, J.; Dubourdieu, D. New Hybrids between *Saccharomyces* 'sensu stricto' yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3887-3892 (1998).

- McGovern, P. E.; Glusker, D. L.; Exner, L. J.; Voigt, M. M. Meolithic resinated wines. *Nature* 381: 480-481 (1996).
- McGovern, P. E. Wine's prehistory. *Archaeology* pp. 32-34 (1998).
- Medina, K.; Carrau, F. M.; Giogia, O.; Bracesco, N. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2821-2825 (1997).
- Mesa, J. J.; Infante, J. J.; Rebordinos, L.; Cantoral, J. M. Characterization of yeasts involved in the aging of sherry wines. *Food Sci. and Technol.* 32: 114-120 (1999).
- Mesa, J. J.; Infante, J. J.; Rebordinos, L.; Sánchez, J. A.; Cantoral, J. M. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (1): 15-21 (2000).
- Mortimer, R. K.; Romano, P.; Suzzi, G.; Polsinelli, M. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grapes musts. *Yeast* 10: 1543-1552 (1994).
- Mortimer, R. k.; Polsinelli, M. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204 (1999).
- Mortimer, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Gen. Res.* 10: 403-409 (2000).
- Myung, K.; Chen, C.; Kolodner, R. D. Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 411: 1073-1076 (2001).
- Nadal, D.; Colomer, B.; Piña, B. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1944-1950 (1996).
- Nadal, D.; Carro, D.; Fernández-Larrea, J.; Piña, B. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1688-1695 (1999).
- Naumov, G. I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces cerevisiae* sensu stricto complex. *J. Ind. Appl. Microbiol.* 17: 295-302 (1996).

- Naumov, G. I.; Masneuf, I.; Naumova, E. S.; Aigle, M.; Dubourdieu, D. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.* 151: 683-691 (2000).
- Naumov, G.I.; Naumova, E. S.; Antunovics, Z.; Sipiczki, M. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 727-730 (2002).
- Neuvéglise, C.; Solano-Serena, F.; Brignon, P.; Gendre, F.; Gaillardin, C. Casarégola, S. Homologous recombination and transposition generate chromosome I neopolymorphism during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 263: 722-732 (2000).
- Pasero, P.; Marilley, M. Size variation of rDNA clusters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *CSHL Press*, Cold Spring Harbor, N. Y. (1993).
- Pérez, M. A.; Gallego, F. J.; Hidalgo, P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 375-378 (2001).
- Pérez, F.; Ramírez, M.; Regodón, A. Influence of killer strain of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Anton. Leeuw.* 79: 393-399 (2001).
- Pérez-Coello, M. S.; Briones Pérez, A. I.; Ubeda Iranzo, J. F.; Martín Álvarez, P. J. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiol.* 16: 563-573 (1999).
- Pérez-Ortín, J. E.; Querol, A.; Puig, S.; Barrio, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* 12: 1533-1539 (2002).
- Petes, T.; Malone, R.; Symington, L. Recombination in yeast. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor. 407-521 (1991).
- Prado, F.; Cortés-Ledesma, P.; Huertas, P.; Aguilera, A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 42: 185-198 (2003).
- Pretorius, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729 (2000).

- Puig, S.; Querol, A.; Barrio, E.; Pérez-Ortín, J. E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2057-2061 (2000).
- Pulvirenti, A.; Zambonelli, C.; Todaro, A.; Giudici, P. Interspecific hybridisation by digestive tract of invertebrates as a source of environmental biodiversity within the *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* 52: 245-255 (2002).
- Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.* 15: 439-446 (1992a).
- Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramón, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9): 2948-2953 (1992b).
- Querol, A.; Huerta, T.; Barrio, E.; Ramón, D. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and patterns. *J. Food. Sci.* 57(1): 183-185, 216 (1992c).
- Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 315-323 (1994).
- Rachidi, N.; Barre, P.; Blondin, B. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 841-850 (1999).
- Ramón, D. Trends in wine microbiology. Minireview. *Microbiología SEM* 13: 405-412 (1997).
- Raspor, P.; Cus, F.; Povhe Jemec, K.; Zagorc, T.; Cadez, N.; Nemanic, J. Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of *Zametovka* must. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (2): 95-102 (2002).
- Raspor, P.; Milek, D. M.; Polanc, J.; Mozina, S. S.; Cadez, N. Yeast isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 97-102 (2006).
- Redzepovic, S.; Orlic, S.; Sikora, S.; Majdak, A.; Pretorius, I. S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 305-310 (2002).
- Regodón, J. A.; Pérez, F.; Valdés, M. E.; De Miguel, C.; Ramírez, M. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strain. *Food Microbiol.* 14: 247-254 (1997).

- Rementería, A.; Rodríguez, J. A.; Cadaval, A.; Amenazar, R.; Muguruza, J. R.; Hernando, F. L.; Sevilla, M. J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 86: 201-207 (2003).
- Ristow, H.; Seyfarth, A.; Lochmann E. R. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat. Res.* 326: 165-170 (1995).
- Romano, P.; Fiore, C.; Paraggio, M.; Caruso, M.; Capece, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 169-180 (2003).
- Rosini, G. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *J. General Appl. Microbiol.* 30: 249-256 (1984).
- Rossignol, T.; Dulau, L.; Julien, A.; Blondin, B. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20: 1369-1385 (2003).
- Ruderfer, D. M.; Pratt, S. C.; Seidel, H. S.; Kruglyak, L. Population genomic analysis of outcrossing and recombination in yeast. *Nat. Gen.* 38 (9): 1077-1081 (2006).
- Rustchenko, E. P.; Curran, T. M.; Sherman, F. Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 175: 7189-7199 (1993).
- Rustchenko, E. P.; Sherman, F. Physical constitution of ribosomal genes in common strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1157-1171 (1994).
- Sabate, J.; Cano, J.; Querol, A.; Guillamón, J. M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 452-455 (1998).
- Sabate, J.; Cano, J.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J. M. Isolation and identification of yeast associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157: 267-274 (2002).
- Sangorin, M.; Zajonskovsky, I.; van Broock, M.; Caballero, A. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 115-120 (2002).

- Santamaría, P.; Garijo, P.; López, R.; Tenorio, C.; Gutiérrez, A. R. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 49-56 (2005).
- Schuller, D.; Valero, E.; Dequin, S.; Casal, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231: 19-26 (2004).
- Schutz, M.; Gafner, J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 551-558 (1993).
- Sharf, R.; Margalith, P. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 311-313 (1983).
- Shimizu, K. Killer yeast. In: *Fleet GH (Ed). Wine Microbiology and Biotechnology* (pp: 243-263). Harwood Academic Publishers, Newark, NJ (1993).
- Signon, L.; Malkova, A.; Naylor, M. L.; Klein, H.; Haber, J. E. Genetic requirements for *RAD51*- and *RAD54*-independent break-induced replication repair of chromosomal double-strand break. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2048-2056 (2001).
- Smart, K. A.; Whisker, S. Effect of serial repitching on the fermentation properties and condition of brewing yeast. *J. Am. Brew.* 54: 41-44 (1996).
- Soden, A.; Francis, I.; Oakley, H.; Henschke, P. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 21-30 (2000).
- Southern, E. M. Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J. of Molecular Biological* 98: 503-517 (1975).
- Sturm, J.; Grossmann, M.; Schnell, S. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* ISSN 1364-5072 (2006).
- Suárez, J. A. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodegas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (1997).
- Suutari, M.; Liukkonen, K.; Laakso, S. Temperatura adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1469-1474 (1990).
- Toriya, M. J.; Rozes, N.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different

- wine-producing areas over a period of three years. *Anton. Leeuw.* 79: 345-352 (2001).
- Toriya, M. J.; Rozès, N.; Poblet, M.; Gullamón, J. M.; Mas, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 47-53 (2002).
- Vagnoli, P.; Musmanno, R. A.; Cresi, S.; Di Maggio, T.; Coratza, G. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4037-4043 (1993).
- Valcárcel, M. J.; Pérez, L.; González, P.; Domecq, B. Levaduras responsables de la fermentación industrial de mostos de Jerez. *V Jornadas Universitarias de Viticultura y Enología en Jerez.* 135-142 (1989).
- Van Vuuren, H. J. J.; Jacobs, C. J. Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 119-128 (1992).
- Vaughan-Martini, A.; Martini, M. Facts, myths and legends on prime industrial microorganisms. *J. Indust. Microbiol.* 14: 514-522 (1995).
- Versavaud, A.; Courcoux, P.; Roulland, C.; Dulau, L.; Hallet, J. N. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10): 3521-3529 (1995).
- Veziñhet, F.; Hallet, J. N.; Valade, M.; Poulard, A. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identifications. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(1): 83-86 (1992).
- Wolfe, K. H.; Shields, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708-713 (1997).
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, E.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (pp 315-322). Academic Press, San Diego (1990).
- Yamamoto, N.; Ameriya, H.; Yokomori, Y.; Shimizu, K.; Totsuka, A. Electrophoretic karyotypes of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (4): 358-363 (1991).
- Yap, N. A.; de Barros-Lopes, M.; Langridge, P.; Henschke, P. A. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeast towards indigenous yeast species of

grape must potential application in wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 89: 381-389 (2000).