

Taxonomic singularities of the veil of Flor yeasts in Fino Wines from the D.O. Jerez-Xérèz-Sherry

Cantoral-Fernández Jesús Manuel¹, Ruiz-Muñoz Marina¹, Hernández-Fernández María¹, Florido-Barba Antonio^{1,2}, Villanueva-Llanes María Paz¹, Pizzi Simona³, and Cordero-Bueso Gustavo¹

¹Laboratorio de Microbiología. CASEM, Dpto. Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Universidad de Cádiz. 11510 Puerto Real, Cádiz, España

²Bodegas Fundador, C. Puerta de Rota, S/N, 11408 Jerez de la Frontera, Cádiz

³Università degli Studi di Milano (Italia). Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche

Abstract. The veil of “Flor yeasts” are responsible for the biological aging process of wines produced in the D.O. of Jerez and Sanlúcar de Barrameda (Finos and Manzanillas) in the province of Cádiz and Fino in the D.O. Montilla-Moriles in the province of Córdoba, as well as in other wine-growing regions of the world, such as France, South Africa, California, Sardinia or Hungary. The first attempts to classify these flor veil yeasts were based on biochemical assays of sugar assimilation and fermentation. Thus, it was concluded that the yeasts involved in biological aging belonged all to *Saccharomyces cerevisiae*, distinguishing four subspecies or physiological races: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* and *rouxii*. On the other hand, molecular techniques, which allow the characterization of oenological yeasts and discriminate between the different strains, are usually pulsed field electrophoresis (PFGE), the analysis of the polymorphism for the length of the restriction fragments (RFLP) of mitochondrial DNA, and multiplex PCR of microsatellites. Recent studies in our laboratory show the existence of at least 9 different genotypes of *S. cerevisiae* veil of flor species, based on the study of microsatellites (SSR-PCR). In addition, we have detected the presence of some species of non-*Saccharomyces* yeasts not described previously.

1 Introducción

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras. Aquellos primitivos viticultores se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y luego dejar el zumo (llamado mosto) fermentar, ya que la superficie de las uvas contiene células de levadura preparadas para llevar a cabo la fermentación. Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación, no fue desarrollado hasta 7000 años más tarde, gracias a los trabajos de Pasteur (1872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana. Al saber 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.

Con el posterior desarrollo de las técnicas microbiológicas, las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1890, Muller Thurgau introdujo el concepto de “fermentación inoculada” empleando cultivos puros de levaduras. Como

resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros análisis genéticos de levaduras comenzaron a mediados de la década 1930-1940, con la introducción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos con fines investigadores, ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas estándar (o de referencia) de laboratorio. La gran mayoría deriva de un aislamiento realizado por Emil Mark a partir de higos en descomposición en Merced. Dicho aislamiento, conocido como EM93, corresponde a una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C, secuenciado en el año 1996.

Las modernas técnicas moleculares que permiten la caracterización de levaduras industriales y discriminan entre las distintas cepas son habitualmente la electroforesis en campo pulsante (PFGE, Fig. 1) y el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial. La primera técnica analiza el número y tamaño de los cromosomas de las levaduras y la segunda mide

variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial afectado por los sitios de corte de determinadas endonucleasas de restricción. Recientemente se ha introducido la PCR multiplexada de microsátelites.

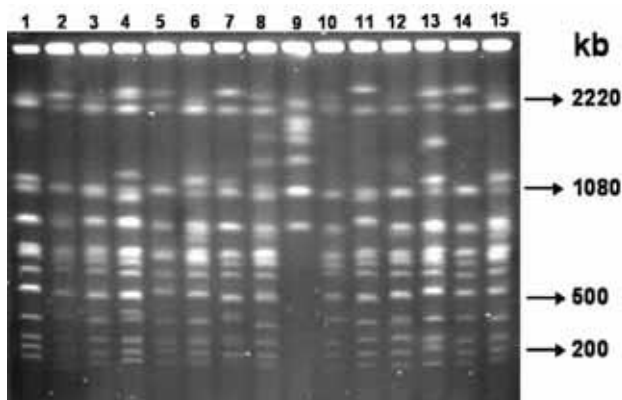


Figura 1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE). Cariotipo electroforético de 15 cepas de levaduras aisladas de la fermentación alcohólica. El aislamiento N° 9 corresponde a una levadura no-*Saccharomyces*. Las cuatro últimas bandas del gel de electroforesis, por debajo de 500 Kb son típicas de *S. cerevisiae*.

2 Levaduras de “velo de flor” de los vinos bajo “crianza biológica” (finos y manzanillas)

Las levaduras de “velo de flor” son las responsables del proceso de “crianza biológica” (Fig. 2) de los vinos producidos en el marco de Jerez y Sanlúcar de Barrameda en la provincia de Cádiz y de Montilla Moriles en la de Córdoba, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo, como Sudáfrica, California, Cerdeña o Hungría. Estas singulares levaduras, constituyen un caso especial de levaduras vínicas que aparecen al final de la fermentación alcohólica del vino, formando una biopelícula en la superficie que se denomina “velo de flor” ya que aparecen de manera especial en primavera (periodo de la floración).

El “velo de flor” surge de forma espontánea como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras desarrollarse en un medio en el que están obligadas a asimilar etanol y glicerol mediante respiración, que son las principales fuentes de carbono una vez agotados los azúcares fermentables. Estas levaduras son las únicas capaces de desarrollarse en el vino tras el proceso de encabezado (adición de alcohol vínico hasta llegar a una concentración de etanol del 15-15.5%).

La crianza del fino en el Marco de Jerez, tiene un primer periodo de envejecimiento estático en botas o depósitos (sobretablas), a continuación se somete al proceso de envejecimiento dinámico mediante el sistema



Figura 2. Proceso de Vinificación. Proceso de vinificación representando el conjunto de operaciones que se realizan desde la recogida de la uva en el viñedo hasta la obtención de los distintos tipos de vinos. Tras la fermentación alcohólica, se obtienen vinos jóvenes con 11° alcohólico (v/v). La adición de alcohol a estos vinos hasta obtener 18° permite obtener los vinos olorosos bajo crianza físico-química; mientras que la adición de alcohol hasta 14-15° permite la obtención de finos y manzanillas bajo crianza biológica.

de criaderas y solera (Fig. 3). Este sistema consiste en una serie de filas de botas de roble (600 litros de capacidad), cada una de las cuales contiene vino del mismo tipo y con el mismo grado de crianza (escala). Las botas no se llenan por completo, se deja vacía una sexta parte de su capacidad, lo que genera una amplia superficie y una cámara de aire que permite el desarrollo de estas levaduras filmógenas en dicha superficie (Fig. 3). En la fila más próxima al suelo está el vino más viejo (1a escala o solera), de donde se extrae el vino (saca) para el embotellado. Las botas de la solera se rellenan (rocío) con vino de la fila superior (2ª escala o 1ª criadera), que se rocían a su vez con vino de la siguiente (3ª escala) y así sucesivamente con una serie de escalas hasta llegar a las sobretablas, que se rellenan con vino nuevo, conteniendo un 15 % etanol (Fig. 4).

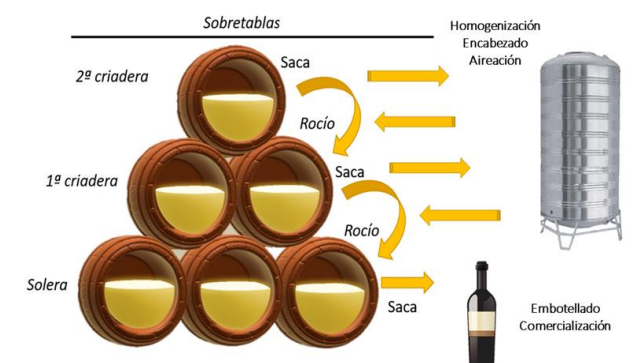


Figura 3. Crianza biológica. Barricas de roble americano constituyendo los sistemas de “criaderas y solera” de los vinos finos y manzanillas.

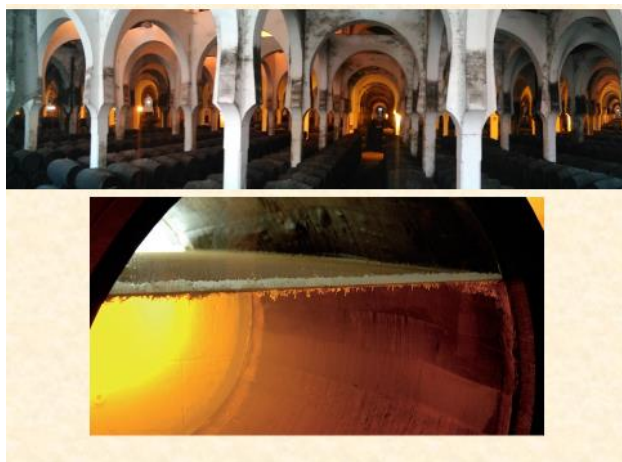


Figura 4. Crianza biológica. Barricas de roble constituyendo los sistemas de “criaderas y solera” de los vinos finos y manzanillas en una bodega típica.

Entre las diversas transformaciones de interés enológico que las levaduras de flor producen sobre la composición del vino destaca la liberación de acetaldehído, que es producido directamente mediante oxidación de etanol como primer paso para su asimilación. El acetaldehído aporta al vino el olor punzante y característico del fino, por lo que se considera su concentración en el vino como un índice del grado de crianza. Además, el acetaldehído es punto de partida de numerosas reacciones que se producen durante el envejecimiento y que contribuirán decisivamente al buque y color que definen a los finos.

3 Caracterización de las levaduras de “velo de flor”

Se han realizado múltiples trabajos para caracterizar las levaduras de velo de flor, en los cuales se pone de manifiesto que en las barricas de crianza aparecen casi exclusivamente levaduras de la especie *S. cerevisiae*, aunque se pueden diferenciar cuatro grupos según pruebas de asimilación y fermentación de azúcares que se catalogan como razas fisiológicas: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii* [1]. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras, concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estos organismos a condiciones industriales tan específicas.

Nuestro grupo ha llevado a cabo una amplia caracterización de estas levaduras en un sistema dinámico de envejecimiento del vino de “criaderas y solera” utilizando las técnicas moleculares de PFGE y los RFLP, descritas en el apartado anteriormente, llegándose a establecer una correspondencia entre un determinado tipo de levaduras presentes en el velo y el estado de envejecimiento del vino [2, 3].

Las levaduras de velo de flor tienen una presencia constante en la bodega (desde que se comenzó la crianza biológica de vinos hace unos 200 años) y se encuentran

sometidas a una fortísima presión de selección que incluye su crecimiento en presencia de grandes cantidades de etanol (15-15.5%) y acetaldeído (200-800 mg/L), dos inhibidores del crecimiento celular con demostrada actividad mutagénica. Por ello, estas levaduras son de especial interés para la realización de estudios de evolución cromosómica.

En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio novedoso del polimorfismo cromosómico al comparar dos cepas de levaduras industriales mediante el uso de “chips” de ADN (*microarrays* o micromatrices) de *S. cerevisiae*, que ha puesto de manifiesto los mecanismos específicos de recombinación y las secuencias afectadas por estos, que posibilitan la evolución de estas cepas industriales y su adaptación al ambiente [4]. La hibridación comparativa del genoma entre estas dos cepas de velo de flor puso de manifiesto que ambas poseen amplificaciones de grandes regiones genómicas. Las amplificaciones responden a fenómenos de reorganización cromosómica mediados por puntos calientes de recombinación estratégicamente situados en el genoma. Además, los “amplicones” contienen genes clave para la adaptación de las levaduras de flor al ambiente extremo en el que se desarrollan, y muchos de ellos se encontraron sobreexpresados al comparar el transcriptoma de dichas cepas con cepas de laboratorio no adaptadas al ambiente industrial.

Estos resultados proporcionaron evidencias de que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como un mecanismo general de evolución adaptativa para las levaduras que crecen en ambientes muy selectivos. De manera que los agentes químicos como el etanol y el acetaldehído, presentes en altas concentraciones en el medio, provocan roturas de la doble hélice de ADN en puntos sensibles del genoma de las levaduras. La reparación de dichas roturas por mecanismos alternativos a la recombinación homóloga genera grandes reorganizaciones cromosómicas que dan lugar, tras la división mitótica, a cambios en el genoma que permiten la aparición de cepas mejor adaptadas al ambiente. La caracterización de los mecanismos de evolución adaptativa del genoma de estas levaduras de velo de flor fue la primera vez que se realiza en levaduras industriales y ha proporcionado un modelo de evolución genómico global íntimamente ligado a la influencia ambiental que puede ayudar a comprender los modelos de evolución actuales [4].

Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto la existencia de al menos 9 genotipos diferentes pertenecientes a la *Saccharomyces cerevisiae* en el “velo de flor” de vinos Finos, empleando para analizar la variabilidad intraespecífica tres *loci* con una alta densidad de microsatélites (PCR-SSR). Además, estos genotipos mostraron diferencias fenotípicas entre sí en cuanto a la capacidad para fermentar y/o asimilar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Por tanto, pueden considerarse como biotipos distintos dentro de la especie *S. cerevisiae* [5]. Además, se ha identificado la presencia de otras especies de levaduras diferentes a *S. cerevisiae*, pertenecientes al género *Pichia* (*P. manshurica*, *P. membranifaciens*, *P. kudriavzevii*) y *Wickerhamomyces*

anomalus. Estas levaduras no-*Saccharomyces* mostraron, a su vez, unas características fenotípicas no descritas hasta ahora, resaltando su alta capacidad para producir enzimas extracelulares, así como para formar *biofilm* [6]. Por tanto, aunque no se conozca el origen de estos aislados, se pone de manifiesto que se encuentran adaptados al vino Fino durante la crianza biológica.

Estos hallazgos sugieren que diversidad de levaduras que componen el velo de flor es mayor de lo que se había descrito hasta ahora y que, además, parecen participar activamente en el equilibrio de las poblaciones del velo de flor y en la composición química del producto final en este singular medio (vino con elevadas concentraciones de etanol, acetoína y acetaldehído).

Además de los autores que se detallan al inicio, queremos agradecer a todos los compañeros que con su trabajo han forjado la historia del grupo de “Microbiología Enológica” de la Universidad de Cádiz.

También a los Proyectos que lo han sostenido, así como la valiosa colaboración (OTRI) con las Bodegas que hemos colaborado: Sandeman Coprimar, Barbadillo S.L., Lustau y Caballero.

Dedicamos este trabajo a la memoria del Dr. Carmelo García Barroso por habernos introducido en el apasionante mundo de las levaduras de velo de flor.

Bibliografía

1. P. Martínez, A. C. Codón, T. Benítez. *Yeast* **11**, 14 1399-1411, doi.org/10.1002/yea.320111408 (1995)
2. JJ. Mesa, JJ. Infante, L. Rebordinos, JM Cantoral. *Food Science and Technology* **32**, 114-120. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0514> (1999)
3. JJ. Mesa, JJ. Infante, L. Rebordinos, JA. Sánchez, JM. Cantoral. *American Journal of Enology and Viticultura*, ISSN 0002-9254, **51**, 15-21 (2000)
4. JJ. Infante, MD Kenneth, L. Rebordinos, JM. Cantoral, ET. Young. *Genetics* **165**(4) 1745-1759, doi:10.1093/genetics/165.4.1745 (2003)
5. M. Ruiz-Muñoz, G. Cordero-Bueso, F. Benítez-Trujillo, S. Martínez, F. Pérez, JM. Cantoral. *Food Microbiology* **92**, doi.10.1016/j.fm20202.103553 (2020)
6. M. Ruiz-Muñoz, M. Hernández-Fernández, G. Cordero-Bueso, S. Martínez-Verdugo, F. Pérwez, JM. Cantoral. *Fermentation* **8**(9) 456, doi.org/10.3390/fermentation8090456 (2022)