

**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TRABAJO DE FIN DE GRADO. FACULTAD DE BIOLOGÍA

**EVOLUCIÓN DE LAS LEVADURAS DURANTE LA  
FERMENTACIÓN DE UN MOSTO DE UVA RUFETE**

EVOLUTION OF THE YEAST POPULATION DURING FERMENTATION OF RUFETE  
GRAPE MUST

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 PROCESO DE VINIFICACIÓN .....	1
1.2 LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES.....	3
1.3 D.O.P. SIERRA DE SALAMANCA .....	4
<b>2. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b> .....	5
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
3.1 MUESTREO .....	6
3.2 AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y CULTIVO.....	6
3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LEVADURAS .....	7
3.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS LEVADURAS .....	7
3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS .....	9
<b>4. RESULTADOS</b> .....	10
4.1 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS PRESENTES EN LA MUESTRA V8 .....	10
4.2 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL ESPUMOSO ANCESTRAL .....	12
4.3 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS.....	14
4.4 ANÁLISIS DE LA VARIEDAD DE LAS CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i> A LO LARGO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL VINO ESPUMOSO POR EL MÉTODO ANCESTRAL.....	15
<b>5 DISCUSIÓN</b> .....	17
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	19

## **RESUMEN**

Las levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica en el proceso de vinificación. Además, son las que confieren las distintas características organolépticas al vino, que varían dependiendo de las variedades presentes, normalmente asociadas al tipo de uva y a la región vinícola. Este trabajo se centra en la caracterización de las levaduras presentes durante la fermentación de un mosto de uva Rufete de la Sierra de Salamanca en la añada 2019, utilizado para la producción de un espumoso por el método ancestral. Los resultados muestran una población con gran variedad de levaduras No-*Saccharomyces* que evoluciona a lo largo del proceso. El análisis de estas levaduras indica diferentes niveles de tolerancia al etanol y a diferentes temperaturas, que muy probablemente condicionen la evolución del proceso siendo responsables de conferir las características distintivas a este tipo de vino.

## **ABSTRACT**

Yeasts are the main responsible for alcoholic fermentation in the vinification process. Besides, wine's organoleptic properties, which are different according to the wine region and the variety of yeasts, also rely on them. This work focuses on the characterization of the yeasts present during the fermentation of a must from the Sierra de Salamanca's 2019 vintage Rufete grape, used in the production of sparkling wine by the ancient method. The results show a great variety of Non-*Saccharomyces* yeasts that evolve during the process. The analysis of the obtained yeasts indicates different levels of tolerance to ethanol and temperature, which probably determine the evolution of the fermentation process, being responsible for conferring the distinctive characteristics to this different type of wine.

## 1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida alcohólica que se hace del zumo de uvas exprimido y cocido naturalmente por fermentación. (Definición de Vino - Diccionario de la RAE, n.d.). Esta fermentación es llevada a cabo por las levaduras que transforman el azúcar del mosto en alcohol.

El vino es esencial para entender la civilización tal y como la conocemos en Occidente. En el antiguo Cercano Oriente esta bebida se utilizaba como medicina, como sustancia que alteraba la mente y facilitaba las relaciones sociales y era un producto también altamente valorado en economía, cocina, y farmacopea, llegando incluso a convertirse en el centro de cultos religiosos. La extensión del vino por toda Europa fue consecuencia de las sucesivas colonizaciones llevadas a cabo por griegos, fenicios y romanos. (McGovern et al., 2017).

La fermentación alcohólica que da lugar al vino pasa por varias etapas. En su etapa inicial están presentes levaduras *No-Saccharomyces* y a medida que la fermentación avanza y la concentración alcohólica es mayor, estas levaduras son sustituidas por otras de tipo *Saccharomyces*, las cuales tienen una mayor tolerancia al alcohol. Las levaduras *No-Saccharomyces* se caracterizan por la producción y secreción de varios tipos de enzimas (esterasas,  $\beta$ -glucosidasas, lipasas y proteasas), que generan altos niveles de compuestos aromáticos (ésteres, alcoholes superiores y ácidos), que no pueden ser generados por las del tipo *Saccharomyces*, y que contribuyen a las propiedades finales del vino. Sin embargo, un mal uso de estas levaduras puede provocar efectos no deseados en el vino, por lo que la situación ideal implicaría una fermentación de tipo mixto que combine tanto *No-Saccharomyces* como *Saccharomyces*, (Liu et al., 2016), algo que normalmente se logra durante el proceso de fermentación espontánea de los mostos.

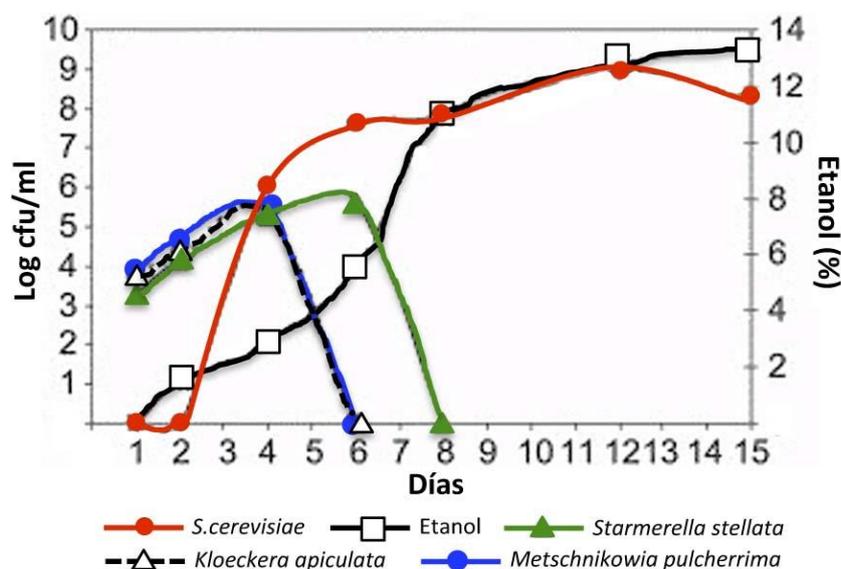
### 1.1 PROCESO DE VINIFICACIÓN

Una vez recogida la uva madura en la bodega se realiza su despallado mecánico, un proceso que separa los granos de uva de los racimos. Estos granos serán posteriormente estrujados para producir el mosto que finalmente dará lugar al vino.

La microflora natural presente en las uvas varía en función de distintos factores como la variedad de la uva, la temperatura, la lluvia, el suelo, la fertilización, el riego y, las diversas prácticas agrícolas con las que se trabaje el viñedo, influyendo también los posibles daños producidos por mohos, insectos, pájaros y los fungicidas. Las especies predominantes en el mosto y, por tanto, en las fases iniciales de la fermentación son levaduras *No-Saccharomyces*, siendo *Kloeckera* y *Hanseniaspora* las más abundantes, encontrándose también levaduras apiculadas de los géneros *Candida*,

*Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Metschnikowia* y *Pichia*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en el mosto abundan también bacterias y otros hongos perjudiciales cuyo crecimiento no deseado es prevenido mediante la adición de sulfitos, que actuarían como agentes antioxidantes y antimicrobianos. (Pretorius, 2000).

La fermentación vínica es llevada a cabo por las levaduras, las cuales mediante la vía glucolítica consumen la glucosa y fructosa, que serán finalmente transformadas en dióxido de carbono y etanol mediante la fermentación alcohólica. Las levaduras No-*Saccharomyces* son las principales responsables del inicio de la fermentación espontánea, sin embargo, estas son muy poco tolerantes al alcohol lo que impide su crecimiento en concentraciones superiores al 5-6% de etanol. Es en este momento cuando aumenta significativamente la concentración de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que presenta una tolerancia al etanol superior y será la encargada de llevar a término la fermentación. (Romano et al., 2003). Las levaduras *Hanseniaspora* y *Metschnikowia* son las más abundantes en el origen del mosto y a medida que avanza la fermentación el proceso será dominado por *Saccharomyces cerevisiae*, con una cinética que puede variar dependiendo de la fermentación. En una fermentación espontánea existen varias cepas iniciales que compiten entre sí creciendo exponencialmente hasta que el alcohol alcanza aproximadamente el 6%, punto en el que cesa el crecimiento de las levaduras No-*Saccharomyces* mientras que continúa el de *Saccharomyces* hasta el final del proceso (véase Figura 1). En una fermentación inducida, la cepa inoculada, normalmente *Saccharomyces*, sería la que realizaría todo el proceso. (Schütz & Gafner, 1993).



**Figura 1.** Evolución de la población de levaduras en un proceso de vinificación espontánea. (Combina et al., 2005).

Una vez acabada la fermentación alcohólica solo quedan azúcares residuales, siendo en este momento, cuando se llevaría a cabo la fermentación malo-láctica, que suaviza y estabiliza los vinos.

Los vinos espumosos se encuentran dentro de los “vinos especiales”. Estos vinos contienen una alta cantidad de CO<sub>2</sub>, las burbujas, que son el resultado de una fermentación secundaria en botella. Además, los vinos se someten a un envejecimiento continuado sobre lías, lo que aportará unas características organolépticas especiales, ya que, aunque las levaduras estén muertas siguen ejerciendo su papel. Todo ello hace que la producción de vinos espumosos sea un proceso largo y costoso. Los primeros vinos espumosos fueron probablemente producidos por lo que se conoce como el método ancestral. Para su elaboración por este método es necesaria la producción de un vino base, que se consigue con las técnicas clásicas de elaboración de vinos tranquilos. Sin embargo, antes de que esta fermentación convencional se acabe, el vino es directamente embotellado por lo que contendría todavía azúcares residuales. Son estos azúcares los que serían fermentados por las levaduras presentes en la botella, lo que generaría el CO<sub>2</sub> correspondiente. Por lo tanto, a diferencia de los espumosos tradicionales, al espumoso ancestral no se le añaden ni azúcares ni levaduras exógenas para realizar la fermentación en botella. Durante el proceso se puede controlar la actividad de las levaduras nativas o inóculos modificando diferentes parámetros entre los que se encuentra la temperatura y nutrientes, que hay que disminuir, y la filtración o adición de dióxido de azufre. Cuando la fermentación en botella y el envejecimiento han acabado, se procede a eliminar las levaduras presentes en el vino. En ese momento el vino es transparente ya que las lías se han depositado en el cuello de la botella. Para eliminar las lías se lleva a cabo un proceso denominado degüelle, que consiste en congelar el cuello de la botella, a la cual posteriormente se le quitará el corcho y saldrán las lías por la presión del interior de la botella evitando que salga el vino. Por último, se le añade como licor de expedición el mismo vino, por lo que este tipo de vinos son siempre secos. (Torresi et al., 2011).

## 1.2 LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES

El término *No-Saccharomyces* es utilizado en el ámbito enológico e incluye a gran cantidad de especies. Son ascomicetas o basidiomicetas que se reproducen por gemación o fisión. El conjunto de todas ellas se puede dividir en tres grupos: (1) levaduras aeróbicas, (2) levaduras apiculadas con baja actividad fermentativa y (3) levaduras con metabolismo fermentativo.

Estas levaduras confieren ciertas características organolépticas al vino. La contribución al sabor de este varía en función de los metabolitos formados y estos a su vez se verán afectados por diferentes parámetros como la presencia de sulfitos, la temperatura, la relación glucosa/fructosa... Las levaduras



El clima en esta zona es mediterráneo húmedo, en el que los inviernos son cortos y no demasiado fríos y los veranos son largos, calurosos y secos. Además, en primavera y otoño aumentan las precipitaciones de modo que se compensa la poca retención de agua por parte del suelo. Este clima permite una buena maduración de la uva dejando que se mantengan propiedades de esta como la acidez y permitiendo el desarrollo de propiedades características de la zona.

En esta zona se encuentran una gran variedad de suelos de carácter ácido como suelos arenosos procedentes de roca granítica y suelos arcillosos procedentes de pizarra. Cada uno de ellos aporta unas peculiaridades diferentes a los vinos.

El vino producido en esta zona se elabora a partir de las variedades Rufete, Garnacha tinta y Tempranillo. La variedad Rufete es la considerada autóctona de la zona y presenta un racimo pequeño, apretado con granos de un tamaño mediano y la piel fina. Es una variedad de brotación y maduración temprana, poco resistente a la sequía y muy sensibles al oídio y a los golpes de calor. Da lugar a unos vinos con un aroma que recuerda a frutas rojas y especiados, con taninos dulces y suaves que aportan elegancia y complejidad al vino. (*Variedades / D.O.P. Sierra de Salamanca*, n.d.).

## **2. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

El objetivo del trabajo es la caracterización de la población de levaduras presentes en algunos de los vinos producidos por la variedad de uva Rufete procedente de la D.O.P Sierra de Salamanca, y la evolución de esta durante el proceso de producción de un espumoso por el método ancestral.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 MUESTREO**

Las uvas de la variedad Rufete utilizadas en los vinos estudiados proceden de un viñedo situado en la zona de Valdemedroso (San Esteban de la Sierra) y cultivado en ecológico (Figura 2). Este año la vendimia se inició antes de lo habitual debido a las bajas precipitaciones y temperaturas; además la vid no sufrió estrés hídrico lo que ha conferido a la uva una calidad extraordinaria con una buena acidez. Esta escasez de precipitaciones contribuyó también a la ausencia generalizada de enfermedades en la uva.

Las uvas fueron vendimiadas manualmente y trasladadas a la bodega en cajas de 25 kg. Una vez allí, se procesaron mediante la despalladora, que elimina los restos de racimos y estruja la uva produciendo el mosto. Los mostos fueron congelados a -20 °C en la bodega antes de ser sulfitados y trasladados al laboratorio donde se conservaron a -80 °C. En el caso del vino ancestral, estos mostos fueron sometidos a un proceso de fermentación en frío a 10 °C durante aproximadamente 10 días, periodo durante el cual se tomaron muestras a los 0 (mosto inicial), 2, 4, 6, 8 y 10 días. A continuación, se subió la temperatura del tanque a 15 °C para garantizar la fermentación, que fue seguida mediante la medida de la densidad. Cuando la mayor parte del azúcar había sido consumido, el vino fue transferido a botellas tipo cava para la finalización de la fermentación, tomándose muestras al inicio del embotellado y un mes después del embotellado. Esta última muestra fue la única que fue tomada y congelada a -80 °C directamente por nosotros.

#### **3.2 AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y CULTIVO**

El medio de cultivo empleado a lo largo de todo el experimento ha sido el Agar Malta Levadura (AML) que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras. El medio contiene extracto de levadura (0.3%), extracto de malta (0.3%), peptona (0.5%), glucosa (1%) en agua desionizada. Posteriormente el pH se ajusta a 5,4, se le añade agar (2%) y se autoclava. Una vez esterilizado el medio se dejó atemperar en un baño termostatzado a 55°C, para añadir después cloranfenicol a una concentración final de 34 µg/mL. El cloranfenicol impide el crecimiento de las bacterias que se encuentran en el mosto.

Para el aislamiento de los microorganismos se partió de las muestras congeladas ya descritas que se descongelaron a temperatura ambiente en el laboratorio. Una vez descongeladas se prepararon diluciones seriadas, de las cuales se inocularon 100 µL en placas de AML que se extendieron con bolitas de vidrio estériles. Las placas se incubaron rutinariamente a 28 °C durante 48-72 horas.

Las colonias aisladas se reaislaron de manera individual en placas de AML mediante la técnica de estría para ser conservadas de forma rutinaria a 4 °C. Una vez caracterizadas las distintas levaduras, éstas se mantuvieron congeladas a -80 °C resuspendidas en glicerol al 15%.

### 3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LEVADURAS

Para la caracterización de las levaduras, lo primero que se hizo fue observar a simple vista las colonias aisladas en placas AML, con lo que se pudieron identificar distintas colonias en base a su forma, color o tamaño. Estas colonias se observaron a continuación directamente a la lupa, lo que permitió identificar otras de sus características como la forma del borde, el brillo y el aspecto superficial. Sin embargo, la información así obtenida es limitada, por lo que se procedió a analizar la forma celular directamente al microscopio. Para ello, una pequeña muestra de cada colonia fue resuspendida en agua, colocada en un porta y visualizada en un microscopio Zeiss Axiophot con el objetivo 40x de contraste de fases. Las fotos se tomaron con la cámara digital RT *monochrome* de SPOT. Todas las imágenes se guardaron en formato TIFF para después ser procesadas con el programa Adobe Photoshop 5. Esta visualización microscópica nos permitió determinar la forma y el tamaño de las células de las distintas colonias.

La combinación de todas estas evidencias visuales nos permite una clasificación preliminar de las distintas colonias que después será verificada mediante técnicas moleculares.

### 3.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS LEVADURAS

Para la identificación genética de las levaduras se emplearon distintos métodos de PCR diferencial. La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, permite amplificar regiones de ADN concretas mediante la utilización de cebadores específicos.

Uno de los métodos utilizados se basó en la amplificación de las regiones ITS, zonas de ADN que separan las secuencias codificantes para las subunidades pequeñas y grandes de los ARN ribosómicos. (Esteve-Zarzoso et al., 1999). El tamaño de esta región es característico de cada levadura. Para realizar esta PCR, se resuspendió una colonia fresca crecida en AML en 10 µL de NaOH 0,02 M. Esta suspensión se calentó a 100 °C durante 2 minutos y posteriormente se incorporó a la mezcla que se someterá a PCR. Esta mezcla contiene 2,5 µL de cada uno de los cebadores, siendo estos ITS1 (5` TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3`) y ITS4 (5` TCCTCCGCTTATTGATATGC 3`) a una concentración de 0,5 µM, 2,5 µL de deoxinucleotidos a 10 µM, 10 µL de buffer 10x, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> a 20 µM, 68,5 µL de agua y 1 µL de la enzima ADN polimerasa Taq, recombinante (EcoTaq, Ecogen SL).

Una vez preparada la muestra se distribuyó en tubos específicos para PCR incluyendo en cada uno de ellos 90  $\mu\text{L}$  de mezcla y los 10  $\mu\text{L}$  de la colonia resuspendida en NaOH. La PCR realizó los siguientes ciclos:

1. Desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos
2. 35 ciclos que constan de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillamiento a 55,5 °C durante 2 minutos y elongación a 72 °C durante 2 minutos
3. Extensión final a 72 °C durante 10 minutos

Como método complementario se realizó también la amplificación por PCR de las regiones interdelta. Estas regiones vienen definidas por la disposición en el genoma de las levaduras de los distintos retrotransposones Ty, posición que es estable durante generaciones. (Legras & Karst, 2003). Esta estabilidad nos permite diferenciar distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en base al patrón de bandas interdelta encontradas. La mezcla de esta PCR se preparó de forma similar a la anterior usando en este caso 1,25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores,  $\delta 12$  (5`TCAACAATGGAATCCCAAC 3`) y  $\delta 21$  (5`CATCTTAACACCGTATATGA 3`), 0,62  $\mu\text{L}$  de deoxinucleotidos, 2,5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10x, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 16,37  $\mu\text{L}$  de agua y 0,25  $\mu\text{L}$  de ADN polimerasa EcoTaq. Una vez preparada la mezcla, a cada uno de los tubos específicos para PCR se añadió 23,75  $\mu\text{L}$  de la misma y 1,25  $\mu\text{L}$  de colonia resuspendida en NaOH y tratada como en el caso anterior. La muestra se sometió al mismo protocolo de PCR descrito anteriormente. En caso de que los productos de PCR no se pudieran analizar de manera inmediata, se conservaron a -20 °C para su análisis posterior.

En todos los casos los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,6% en TAE (40 mM Tris, 20 mM acético, 1 mM EDTA, pH de 8,4). La agarosa se disolvió en la solución de TAE en el microondas. Una vez disuelta se añadió como colorante fluorescente Midori Green que permitirá visualizar posteriormente el ADN. Los geles se cargaron con 10  $\mu\text{L}$  del producto de la PCR y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga X6 (0,001% azul de bromofenol, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,5 y glicerol 50%). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 120 V y se visualizaron y fotografiaron mediante el uso de luz ultravioleta utilizando un equipo BioRAD. Para estimar el tamaño de la banda se tomó como referencia el marcador de peso molecular de 1 Kb.

Ocasionalmente y para poder diferenciar mejor la banda ITS amplificada, ésta fue digerida con la enzima *HaeIII*, para lo cual se añadió a una alícuota de la muestra de PCR 0,5  $\mu\text{L}$  de la enzima BsuRI (Thermo Fisher Scientific) que se incubó a 37 °C durante 90 minutos junto con su buffer y siguiendo las indicaciones del fabricante. El patrón de bandas obtenido es característico de cada especie y puede ser consultado en <https://www.yeast-id.org/>.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

Para determinar la resistencia al etanol de cada una de las cepas escogidas, se emplearon placas de AML suplementadas con etanol absoluto hasta obtener las concentraciones finales de 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12% de ETOH. Las muestras que serían sometidas a este análisis se cultivaron en placas de AML para que crecieran entre 24-48 horas a 28°C. Una colonia aislada se resuspendió en agua estéril y a partir de ella se realizaron diluciones seriadas de la misma empleando placas multipocillo de 96. Estas diluciones 1/10 se sembraron en las distintas placas de AML+ETOH por medio de un multirreplicador Sigma-Aldrich de 48 puntas. Las placas se incubaron en una estufa a 28°C durante 48-72 horas y después fueron fotografiadas.

Para determinar la resistencia a la temperatura de cada una de las cepas escogidas, se siguió el mismo proceso que en el caso de la resistencia al etanol, pero en este caso las placas de AML no contenían suplemento de ETOH. Las placas fueron incubadas durante tiempos variables en estufas a diferentes temperaturas: 16 °C, 21 °C, 25 °C, 28 °C, 32 °C y 37 °C.

#### **4. RESULTADOS**

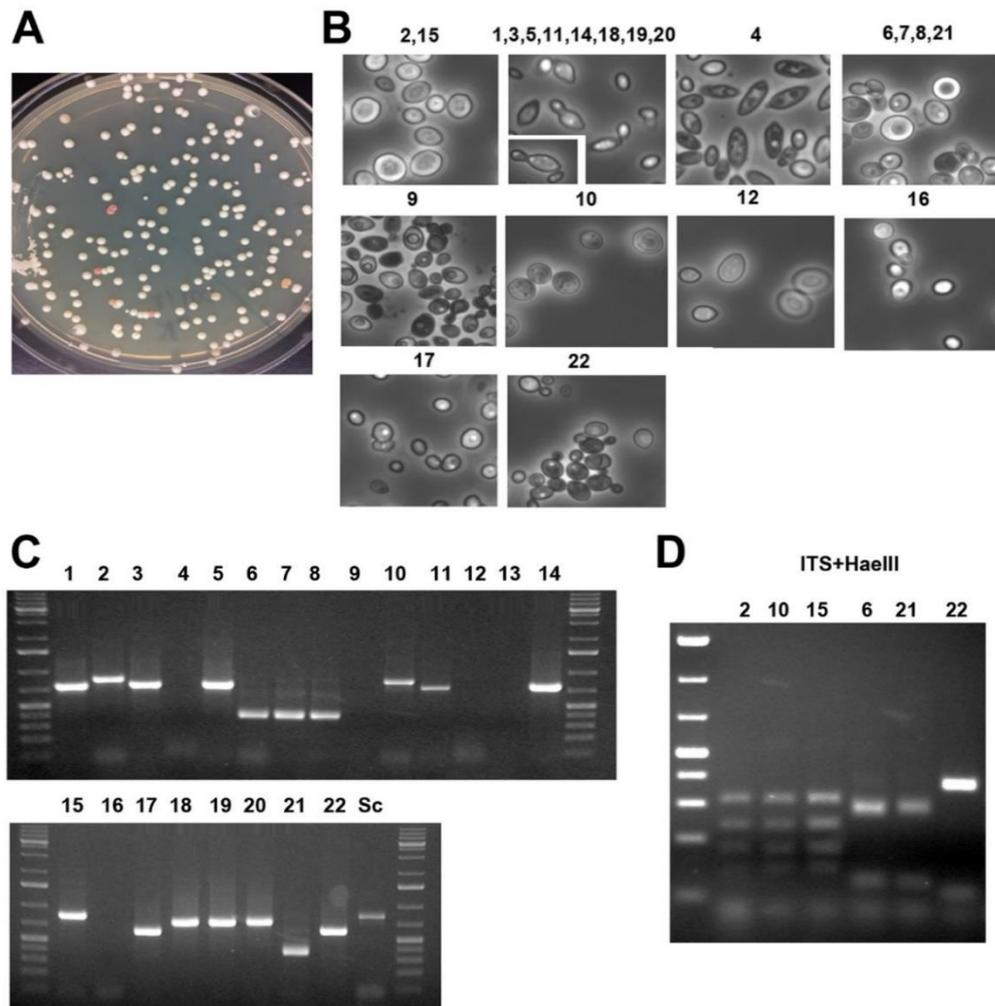
El trabajo se ha desarrollado aislando e identificando las levaduras presentes a lo largo del proceso de fermentación de un vino espumoso ancestral elaborado con la variedad Rufete. La caracterización de estas levaduras se llevó a cabo de forma similar en todas las muestras tomadas: Mostos (V0) y muestras vínicas tomadas a los 2, 4, 6, 8 y 10 días de fermentación (V2-a V10). Además, se caracterizaron también muestras del vino justo antes del embotellamiento (VF) y después de un mes embotellado (BOTELLA). En todos los casos el proceso de caracterización comenzó con el aislamiento de las levaduras presentes en placa de AML y la observación detallada de las colonias aisladas. Estas colonias se reaislaron en placas AML y la forma celular de las distintas levaduras fue visualizada al microscopio de contraste de fases mediante preparaciones húmedas. Posteriormente se amplificó la región ITS de los distintos aislados y se determinó su tamaño; cuando fue necesario estos fragmentos ITS fueron cortados con la enzima de restricción *HaeIII* y se determinó el perfil de degradación que fue comparado con la base de datos de levaduras. Finalmente, como comprobación se procedió a amplificar y secuenciar la región LSU para confirmar la asignación específica de los aislados de una especie. El proceso de secuenciación fue llevado a cabo externamente en la empresa Cenit Support Systems, Salamanca.

Por razones de espacio es imposible describir los resultados detallados de cada muestra, por lo que se ha optado por presentarlos agregados en la Tabla 1, describiéndose a continuación en detalle los resultados obtenidos en la muestra V8, probablemente la más representativa del muestreo. Debe tenerse en cuenta que el número de levaduras obtenidas para las muestras V2 y V4 fue extremadamente bajo, por lo que estas muestras no se han considerado significativas y no han sido incluidas en el estudio.

##### **4.1 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS PRESENTES EN LA MUESTRA V8**

**Caracterización fenotípica:** Como puede observarse en la Figura 3A, la visualización directa de las colonias aisladas en placas de AML e incubadas durante 48-72 horas a 28 °C permite identificar diversos tipos de colonias donde destacan los distintos tipos de colonias rosas. A partir de esta placa se reaislaron 22 colonias diferentes que incluían todos los tipos diferenciables en base a su forma/color/tamaño. Estas colonias fueron reaisladas en el mismo medio y sus células fueron observadas directamente al microscopio. Esta observación (Figura 3B) permite identificar células con el típico aspecto ovoide y tamaño similar (2/15, 6/7/8/21 y 10). Por otro lado, se observan también células ovoides de un tamaño más pequeño (9, 16, 17 y 22). Las células del aislado 12 son

sensiblemente más grandes mientras que las del 4 presentan una forma fusiforme característica. Los aislados más frecuentes (1/3/5/11/14/18/19 y 20) muestran células de un aspecto apiculado característico.



**Figura 3.** Resultados de los análisis en el mosto ancestral tras 8 días de fermentación (V8). (A) Aspecto de las colonias aisladas. (B) Forma celular de los distintos aislados al microscopio de contraste de fases. (C) Electroforesis de las regresiones ITS amplificadas por PCR. (D) Patrón de digestión por *HaeIII* de las regiones ITS indicadas. Las muestras están marcadas en el orden en el que fueron reaisladas.

**Caracterización genética:** Una vez se tuvieron caracterizadas las distintas cepas por el método anterior, se continuó con el análisis genético de las mismas mediante la amplificación de las regiones ITS1-4 de los distintos aislados. Como puede observarse en la Figura 3C, la PCR amplificó bandas ITS de diferentes tamaños, siendo las más frecuentes las de aproximadamente 775 bp, que en todos los casos se asoció a células de forma apiculada (1/3/5/11/14/18/19 y 20). Este conjunto de características: forma de la colonia, forma celular y bandas ITS, nos permite colocar todos estos aislados dentro del género *Hanseniaspora*.

Las células ovoides de mayor tamaño dieron lugar a dos tipos de fragmentos ITS, uno de 850 bp y otro de 400 bp, lo que indicaba claramente la presencia de al menos dos levaduras distintas. Además, se identificó un patrón de bandas ITS de aproximadamente 600 bp (21/22). Del resto de las cepas aisladas no se pudo obtener la correspondiente banda ITS en un primer intento. Repetidos intentos de amplificación de la región ITS permitieron la amplificación de una banda de aproximadamente 500 bp para el aislado 12 (resultados no mostrados), que permitió asignar este aislado al género *Aureobasidium*.

Para intentar confirmar las asignaciones realizadas se procedió a digerir las bandas ITS1-4 amplificadas con la enzima *HaeIII*. Como puede verse en la Figura 3D el fragmento ITS de 850 bp se dividió en 4 fragmentos de 125, 170, 230 y 325, indicando que los aislados 2, 10 y 15 se correspondían con levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*. La ITS de los aislados 6, 7, 8 y 21 de 400 bp se cortó en dos fragmentos de 280 y 120 bp, por lo que los aislados pueden identificarse como pertenecientes a las especies *Metschnikowia pulcherrima*, lo que también se correspondería con el aspecto de la colonia rosada por su parte baja. La digestión de los fragmentos de 600 no ofreció un patrón asociable a ninguna de las especies incluidas en la base de datos.

A partir de esta caracterización inicial se procedió a continuación a identificar el resto de las levaduras mediante la secuenciación directa de las regiones LSU. Así se confirmó que los aislados 9, 17 y 22 se correspondían con *Wickerhamomyces anomalus* con un 100% de identidad de la secuencia. Los aislados 4 y 16, a pesar de su forma celular muy diferente, se correspondieron respectivamente con *Rhodotorula notofagi* y *Rhodotorula mucilaginosa*, completándose así la identificación de los 22 aislados.

#### 4.2 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA DE LAS LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL ESPUMOSO ANCESTRAL

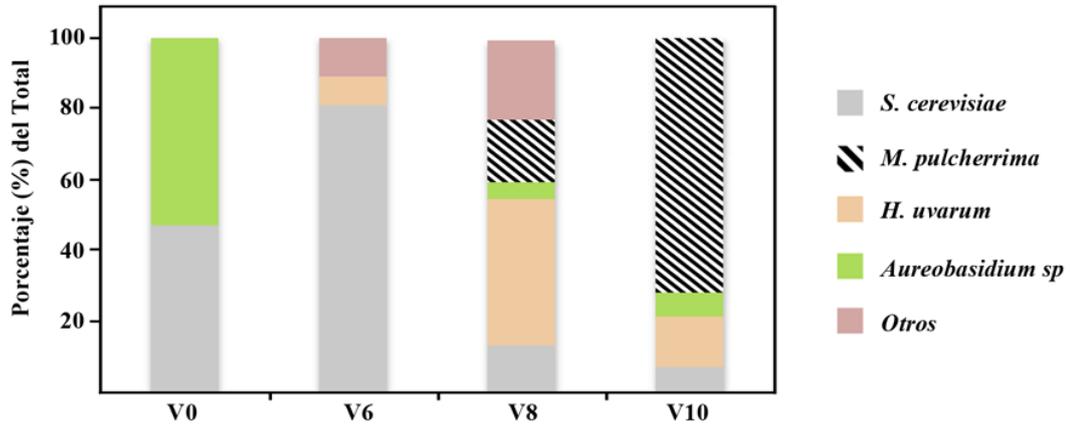
La misma aproximación fue seguida para todas las muestras, confirmando la identidad de algunos aislados por secuenciación cuando fue necesario. Los datos recogidos en la Tabla 1 muestran la evolución de las diferentes variedades de levaduras con los días de incubación. En el mosto inicial se detectó una población con una baja concentración total de levaduras ( $1,5 \times 10^3$  cfu/mL), formada sólo por dos especies en proporciones equivalentes, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aureobasidium pullulans*. Durante los siguientes días, la población total disminuye hasta valores indetectables, repuntando la concentración hasta las  $1,9 \times 10^5$  cfu/mL en el día 6, donde la mayoría de los aislados corresponden con *S. cerevisiae*.

**Tabla 1.** Relación de las levaduras obtenidas en los diferentes días de fermentación del mosto ancestral.

<b>MOSTO ANCESTRAL</b>	<b>CEPAS</b>	<b>UFC/mL</b>
V <sub>0</sub>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (47,05%) <i>Aureobasidium pullulans</i> (52,95%)	1,5x10 <sup>3</sup>
V <sub>6</sub>	<i>Rhodotorula nothofagi</i> (3,84%) <i>Rhodotorula glutinis</i> (3,84%) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (80,76%) <i>Hanseniaspora uvarum</i> (7,69%) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (3,84%)	1,9x10 <sup>5</sup>
V <sub>8</sub>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (40,9%) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (13,63%) <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (18,18%) <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (13,63%) <i>Rhodotorula nothofagi</i> (4,54%) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (4,54%) <i>Aureobasidium pullulans</i> (4,54%)	0,9x10 <sup>5</sup>
V <sub>10</sub>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (71,42%) <i>Hanseniaspora uvarum</i> (14,28%) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (7,14%) <i>Aureobasidium pullulans</i> (7,14%)	1,6x10 <sup>5</sup>
V <sub>F</sub>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (100%)	1,5x10 <sup>1</sup>
BOTELLA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (100%)	5x10 <sup>6</sup>

Más interesante resulta la muestra V8 con una concentración total de levaduras similar a la anterior (0,9x10<sup>5</sup> cfu/mL), pero una gran variedad de levaduras presentes en la misma donde destaca *Hanseniaspora*. La muestra contiene cantidades inferiores de *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* y *W. anomalus* y aislados individuales de otras especies. La muestra V10 mantiene un nivel similar de levaduras totales, pero se detecta un incremento muy significativo de la población de *M. pulcherrima* que pasa a ser dominante. A partir de este punto se subió la temperatura del tanque de fermentación acelerándose el proceso fermentativo.

En la Figura 4 se muestra gráficamente la evolución de las cepas más representativas durante este periodo. La figura indica que la población de *Saccharomyces cerevisiae* mostró un descenso en su concentración conforme avanza la fermentación, lo que resulta llamativo puesto que esta es la responsable de finalizar la fermentación; *Metschnikowia pulcherrima*, exhibió un comportamiento contrario, siendo su concentración al final del proceso muy superior a la del resto de levaduras.



**Figura 4.** Evolución de la población de las levaduras mayoritarias durante la fermentación del mosto ancestral.

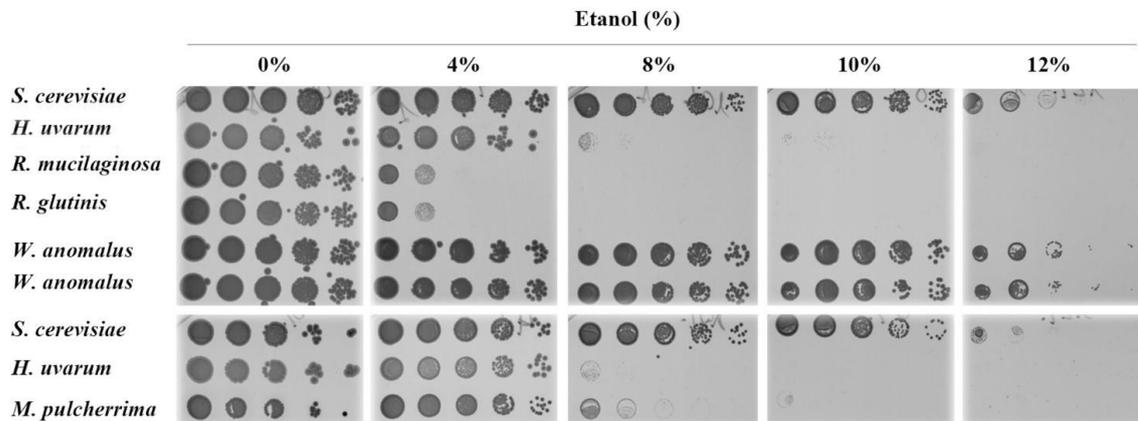
Una vez incrementada la temperatura de fermentación era de esperar un incremento significativo de la población de *S. cerevisiae*, como parece deducirse de los aislamientos únicos de esta levadura en la muestra VF, sin embargo, la concentración total de levaduras es bajísima,  $1,5 \times 10^1$  cfu/mL. Sorprendentemente la visualización de las muestras al microscopio mostró una población de levaduras mucho más abundante (aprox.  $10^7$  cfu/mL), lo que indicaría que las levaduras presentes en esta muestra son incapaces de crecer en medio AML. Por el contrario, la muestra obtenida directamente de la botella mostró niveles relativamente normales de levaduras ( $5 \times 10^6$  cfu/mL), todas ellas *S. cerevisiae*, como debe corresponderse con un vino al final de la fermentación. Discutiremos más adelante una posible explicación de los resultados obtenidos en la evolución de estas poblaciones.

#### 4.3 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

Dados los resultados obtenidos en la caracterización de las poblaciones era necesario determinar si estos se correspondían con las características fisiológicas de las cepas identificadas, para lo cual se determinó la sensibilidad al etanol y el crecimiento a diferentes temperaturas de todas las cepas aisladas.

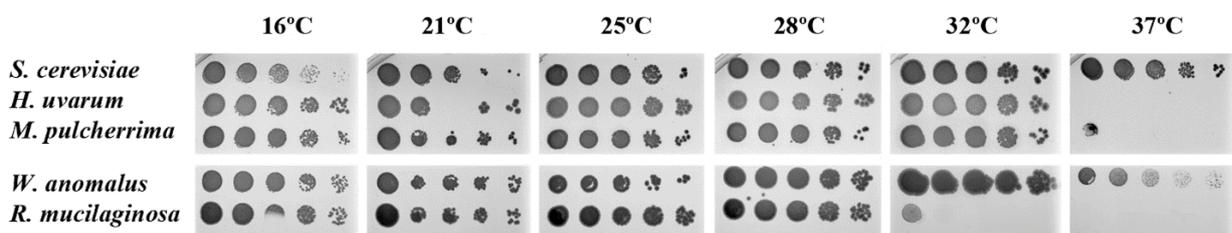
En la Figura 5 se observa que *Saccharomyces cerevisiae* fue capaz de crecer hasta el 12% de etanol, tal y como se esperaba puesto que es la principal responsable del final de la fermentación. Entre las levaduras No-*Saccharomyces* con una tolerancia muy baja al etanol destacan *Rhodotorula nothofagi* y *Rhodotorula mucilaginosa*, las cuales a una concentración tan baja de etanol del 4% ya tuvieron dificultades para su crecimiento. Tanto *Metschnikowia pulcherrima* como *Hanseniaspora uvarum* fueron capaces de crecer normalmente en las placas de etanol al 4%, pero su crecimiento se vio muy limitado al 8%, creciendo un poco mejor a esta concentración *M. pulcherrima*. Por último,

la cepa de *Wickerhamomyces anomalus* presentó una resistencia al etanol similar a la de *S. cerevisiae*, mostrando un crecimiento significativo incluso a una concentración de etanol al 12%.



**Figura 5.** Crecimiento en las concentraciones indicadas de etanol de cada una de las cepas después de 5 días de incubación a 28 °C.

Finalmente se analizó el crecimiento de estas levaduras a diferentes temperaturas (Figura 6). Como se puede observar, todas las levaduras mostraron un crecimiento óptimo a las temperaturas intermedias de 25 a 28 °C, sin embargo, al incrementar la temperatura de crecimiento a 32 °C se observó que *R. mucilaginosa* ya era incapaz de crecer, mientras que las demás crecían normalmente. Solamente *S. cerevisiae* fue capaz de crecer normalmente a 37 °C, mientras que *W. anomalus* lo hacía lentamente. Los resultados más interesantes de este experimento los encontramos en el crecimiento a bajas temperaturas, donde se observa claramente como el crecimiento de *S. cerevisiae* a 16 °C es limitado e incluso a 21 °C inferior al del resto de levaduras. Este resultado podría ser relevante en el proceso estudiado ya que la fermentación se realiza a bajas temperaturas.

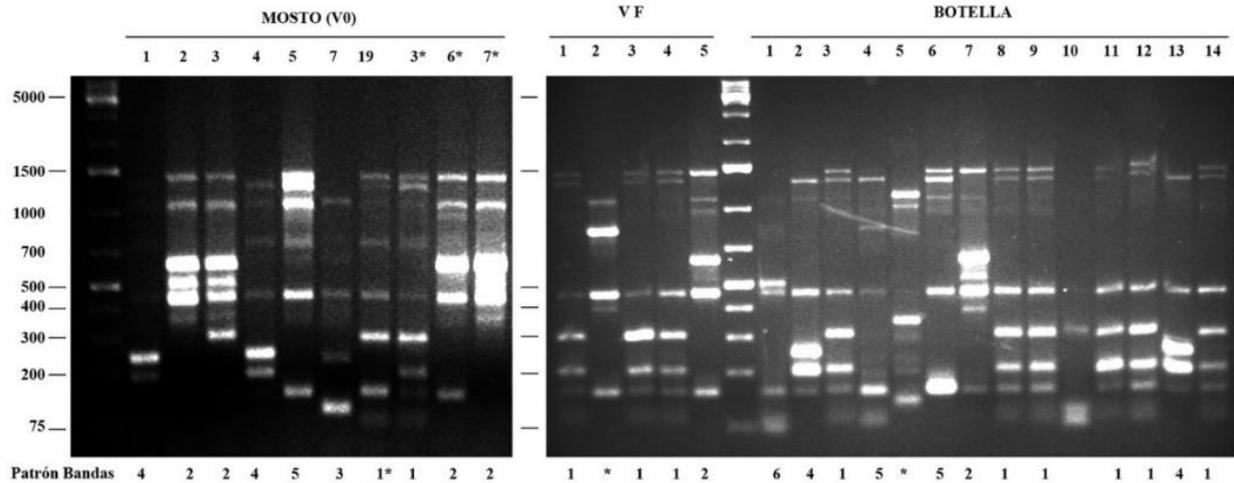


**Figura 6.** Crecimiento de las distintas levaduras a las temperatura indicadas.

#### 4.4 ANÁLISIS DE LA VARIEDAD DE LAS CEPAS DE *S. cerevisiae* A LO LARGO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL VINO ESPUMOSO POR EL MÉTODO ANCESTRAL

Una vez caracterizadas las poblaciones de todas las muestras se procedió a caracterizar las levaduras de tipo *S. cerevisiae* que habíamos aislado mediante la amplificación de las regiones interdelta, utilizando la metodología descrita en Materiales y Métodos. La caracterización se centró

en las cepas aisladas del mosto inicial (V0), del vino antes de ser embotellado (VF) y de las levaduras aisladas de la botella.



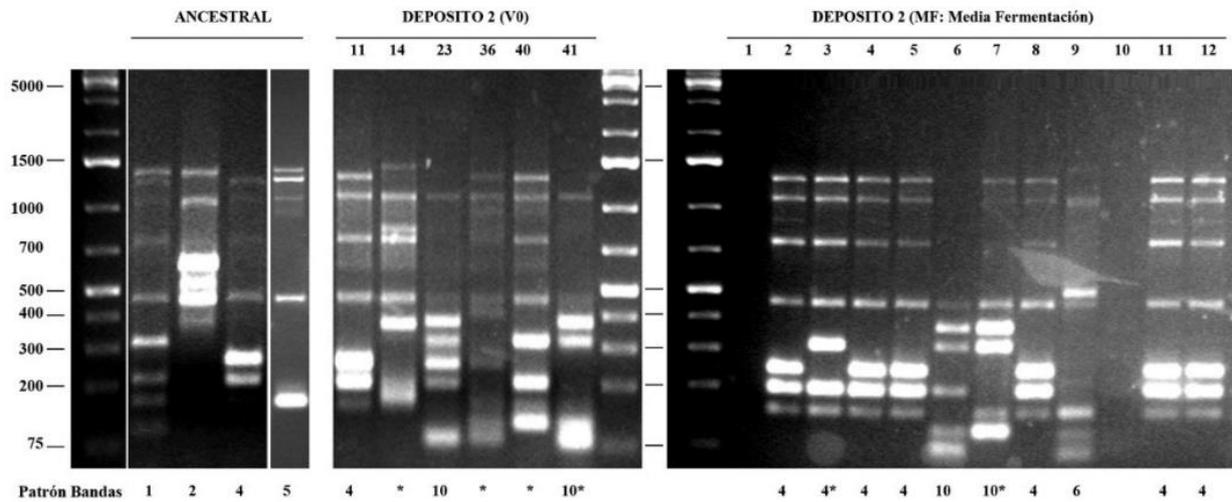
**Figura 7.** Fotografía del gel de agarosa resultado de la amplificación de las regiones interdelta de las levaduras *S. cerevisiae* aisladas de las muestras indicadas todas ellas asociadas al espumoso ancestral. Los patrones de bandas de los distintos aislados se compararon visualmente, asignándoseles un número arbitrario. Los patrones sin numerar se corresponden con patrones únicos.

La Figura 7 muestra que en el mosto inicial pueden distinguirse hasta un total de 6 patrones de bandas diferentes que apuntarían a la presencia de al menos 6 cepas de *S. cerevisiae* al comienzo de la fermentación. Esta diversidad disminuye drásticamente en la muestra VF donde la cepa 1 sería claramente la dominante, aunque habría que tener en cuenta el bajo título de levaduras presentes en esta muestra. La muestra directa de la botella confirma a la cepa 1 como la variedad predominante en la fermentación ya que llega a constituir el 44% de las cepas aisladas. Es interesante destacar también la presencia en una menor proporción en los estadios finales (13-9%) de las cepas 4 y 6, también presentes en otros vinos de la zona (ver más adelante).

El siguiente paso fue comparar las levaduras presentes en este vino con otro de los vinos de la zona hecho de la manera tradicional. En concreto estudiamos las cepas de *S. cerevisiae* procedentes de un mosto de uva del mismo viñedo vinificado en tinto en las instalaciones de otra bodega de la zona.

Como puede observarse en la Figura 8 el mosto inicial (D2) presenta también una alta diversidad de levaduras basadas en el patrón de bandas interdelta, que, con excepción de la cepa 4, son diferentes a las encontradas en el otro mosto. El proceso de fermentación facilita el desarrollo de la cepa 4 que

parece llegar a ser la dominante ya que el 70% de los aislados se correspondieron con esta cepa. Sorprende la ausencia de la cepa 1 en estas muestras, cepa dominante en el vino ancestral.



**Figura 8.** Fotografía del gel de agarosa resultado de la amplificación de las regiones interdelta de las levaduras *S. cerevisiae* del depósito 2 en los estadios indicados. Los patrones obtenidos se comparan con los de las cepas de vino producido por el método ancestral.

## 5 DISCUSIÓN

Este trabajo se engloba en un proyecto más general para el estudio de la población de levaduras responsables del proceso de vinificación de vinos de la uva Rufete producida en la Sierra de Salamanca.

El objetivo inicial del trabajo era la caracterización de las levaduras de tres mostros diferentes: dos de ellos tintos y uno rosado correspondiente al mosto ancestral. A medida que se avanzó en los primeros análisis los resultados obtenidos en el mosto ancestral nos hizo centrarnos en su estudio ya que había muy pocos datos sobre la evolución de las levaduras en este tipo de vinificaciones.

Los resultados obtenidos con las muestras iniciales (V0-V4) resultan sorprendentes por el bajo número total de levaduras presentes, a lo que se une en la muestra V0 la presencia mayoritaria de *S. cerevisiae*, inesperada en un mosto. (Querol et al., 2003). Sospechamos que la baja población de levaduras pueda estar asociada a una incorrecta toma de las muestras o a problemas con su congelación, lo que habría afectado a la viabilidad de las levaduras originalmente presentes. El predominio de *S. cerevisiae* en el mosto inicial, también sorprendente, debe atribuirse a una potencial

contaminación del mismo en la bodega, o, alternativamente, a la contaminación de los instrumentos utilizados para la recolección de las muestras. Este predominio se mantiene hasta los 6 días de fermentación, pero se reduce drásticamente a partir de este punto. Esta reducción puede atribuirse a la temperatura inicial de fermentación, 10 °C, que como hemos mostrado (Figura 6) va a favorecer el crecimiento de otras levaduras frente a *S. cerevisiae*. Esto se detecta ya en la muestra V8 donde la población de levaduras es heterogénea dominando las No-*Saccharomyces*. Quizás lo más relevante de las muestras V8 y V10 es la proliferación muy significativa de la especie *M. pulcherrima*, que no sería demasiado sorprendente ya que esta levadura es capaz de crecer adecuadamente a bajas temperaturas. Esta proliferación de *M. pulcherrima* podría tener importancia en las propiedades organolépticas del vino final debido al carácter aromático que aporta a los vinos en los que participa. (González-Royo et al., 2015). Si el carácter otorgado es el apropiado deberá ser evaluado a través de un panel de cata.

Los resultados para la muestra VF fueron bastante frustrantes ya que se esperaba una alta titulación de levaduras como se corresponde con un vino en plena fermentación; la observación microscópica de los mostos indicaba una alta concentración de levaduras tipo *S. cerevisiae* que después parecían no ser capaces de crecer en medio AML. Cuando esto se discutió en la bodega se nos indicó que en ese punto se había detectado un bajo nivel de fuente nitrogenada en el mosto, lo que podía explicar la entrada de las levaduras en fase quiescente y su capacidad de reanudar el crecimiento. (Marsit & Dequin, 2015). El enólogo a cargo del proceso añadió en este punto una fuente de nitrógeno asimilable que permitió después la finalización de la fermentación en botella, tal y como se observa por el alto título final de levaduras en botella.

Aunque el agotamiento de la fuente de nitrógeno explicaría los extraños resultados obtenidos para la muestra VF no podemos descartar un efecto negativo de la congelación de las muestras a -20 °C, que afectará a la viabilidad de las levaduras. Debemos, por lo tanto, intentar realizar nosotros mismos la toma de muestras evitando la congelación de las mismas, o al menos realizándola a -80 °C.

El otro resultado interesante de este trabajo tiene que ver con la caracterización de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas durante el proceso. Los resultados con el vino ancestral indican el predominio de una levadura denominada cepa 1, presente desde el mosto inicial, al vino finalizado, cepa que sorprendentemente no pudimos detectar en el mosto/vino del otro depósito. Teniendo en cuenta que las uvas proceden del mismo viñedo, aunque se vendimiaron en momentos diferentes, la explicación más lógica habría que buscarla en que ambos vinos se vinificaron desde el inicio en bodegas diferentes. Si tenemos en cuenta que la cepa mayoritaria en la fermentación del depósito 2 es la

denominada cepa 4, que se encuentra naturalmente en los dos mostos, debemos pensar que la cepa 1 debería estar asociada a la bodega en el que se elaboró el espumoso, lo que estaría de acuerdo con la presencia de esta levadura como contaminante de este mosto (ver párrafos anteriores). La importancia en el predominio de una u otra levadura podría tener consecuencias muy importantes en las propiedades organolépticas de los vinos acabados, pero esta potencial consecuencia solo podrá ser determinada con las catas de los vinos, que todavía no han sido realizadas.

Creemos que los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos relevantes sobre el proceso fermentativo asociado a la producción de espumosos por el método ancestral, datos que deberán ser confirmados mediante estudios de la próxima añada. También, aportan por primera vez datos concretos sobre las levaduras implicadas en la fermentación de vinos de la variedad Rufete, lo que constituye un primer paso en la selección de levaduras tipo *S. cerevisiae* características de la DOP.

## **6 BIBLIOGRAFÍA**

- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Definición de vino - Diccionario del español jurídico - RAE.* (n.d.). Retrieved May 2, 2020, from <https://dej.rae.es/lema/vino>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Legras, J. L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00205-2)

- Liu, P. T., Lu, L., Duan, C. Q., & Yan, G. L. (2016). The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *71*, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of Saccharomyces wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, *15*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067>
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., & Lordkipanidze, D. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(48), E10309–E10318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114>
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, *16*(8), 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., Del Olmo, M., & Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 86, Issues 1–2, pp. 3–10). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00244-7)
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Schütz, M., & Gafner, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, *75*(6), 551–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01594.x>
- Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 129, Issue 3, pp. 1232–1241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.006>
- Varela, C., Barker, A., Tran, T., Borneman, A., & Curtin, C. (2017). Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *International Journal of Food Microbiology*, *252*(March), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>
- Variedades | D.O.P. Sierra de Salamanca*. (n.d.). Retrieved May 2, 2020, from <https://www.dosierradesalamanca.es/vinedos/variedades/>