



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Enología

TRABAJO FIN DE GRADO

**ECOLOGÍA DE LEVADURAS DE LA UVA AL VINO. MÉTODOS
MOLECULARES DE TIPADO DE LEVADURAS.**

Alumna: Bárbara Requejo Frutos

Tutora: Marta Baquerizo Mesonero-Romanos

Cotutora: María Simarro Grande

Cotutora: Josefina Vila Crespo

Valladolid. Septiembre de 2014



Universidad de Valladolid

ECOLOGÍA DE LEVADURAS DE LA UVA AL VINO. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPADO DE LEVADURAS

A mis padres.



ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS	5
RESUMEN	6
ANTECEDENTES	7
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
MATERIALES	15
1. REACTIVOS	15
2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	15
3. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	16
4. SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA 17	
5. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ZIMOLIASA	18
MÉTODOS	18
1. CRECIMIENTO AERÓBICO DE LEVADURAS	18
2. EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL	19
3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP) DEL DNA RIBOSÓMICO	21
4. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP) DEL DNA RIBOSÓMICO	24



2. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)	25
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	30



ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

EDTA: ácido etildiaminotetraacético, en inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*.

Factor *killer*: factor asesino.

ITS: espaciador interno transcrito, en inglés *internal transcribed spacer*.

kb: kilo bases.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, en inglés *polymerase chain reaction*.

Primers: cebadores u oligonucleótidos.

Pellet: sedimento.

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, en inglés *restriction fragment length polymorphism*.

TAE: Tris, acetato, EDTA.

YEPD: extracto de levadura peptona dextrosa, en inglés *yeast extract peptone dextrose*.



RESUMEN

En este trabajo de Fin de Grado se pretende el desarrollo de una metodología que permita el análisis de la ecología de levaduras de la uva al vino en una bodega de la Denominación de Origen Rueda.

En primer lugar, se realiza una detallada revisión bibliográfica sobre la importancia del estudio de las distintas poblaciones microbianas que actúan durante la fermentación alcohólica y su impacto en la calidad final del vino. Asimismo, se resumen y explican las técnicas que se emplean en la caracterización de esas poblaciones.

En segundo lugar se explica la puesta a punto de dos técnicas para la caracterización e identificación de levaduras vínicas. El estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción de la región ribosomal ITS-5.8S que permite la identificación de diferentes géneros y especies de levaduras. Y también la puesta a punto del estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción de DNA mitocondrial para la diferenciación de cepas vínicas de levaduras del género *Saccharomyces*, que son las levaduras que se imponen durante el proceso de fermentación alcohólica. La identificación de las especies y cepas de levaduras vínicas de *Saccharomyces* que se encuentren en la uva y que también sean responsables de la finalización de la fermentación alcohólica y su preservación, permitirá su potencial uso en la bodega para la producción de vinos de mayor calidad debido al mayor control del proceso.



ANTECEDENTES

Desde que el estudio y caracterización de levaduras vínicas comenzara, se ha llegado a una serie de conclusiones generales de gran relevancia respecto de la dinámica de poblaciones. En primer lugar, ha quedado constatado que la microbiota levaduriana de las uvas se localiza en la pruina del hollejo, alrededor de las aperturas estomáticas o roturas peristomáticas, donde se alcanzan poblaciones de 10^3 a 10^5 UFC/baya (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Entre el 50% y el 75% de estas poblaciones está compuesta por levaduras de los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora* (Carrascosa *et al.* 2005). Aunque en la mayoría de los casos son, sin embargo, cepas de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, en especial *Saccharomyces cerevisiae*, las que finalizan la fermentación alcohólica y consumen la totalidad de los azúcares fermentables del vino. Esto significa que, durante el proceso de fermentación alcohólica del vino las proporciones entre poblaciones varían.

Existe una secuencia en la ecología de levaduras durante la fermentación alcohólica que suele ocurrir en la mayoría de los casos. Durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica las levaduras de metabolismo oxidativo son predominantes y tienen un mayor desarrollo. Este grupo de levaduras formado por los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* y *Rhodotorula* se ven beneficiados por condiciones ambientales de baja temperatura y aerobiosis. Sin embargo, a medida que la fermentación alcohólica avanza las condiciones del mosto-vino cambian, aumentando la temperatura, el contenido alcohólico y se generan condiciones de anaerobiosis. En este momento, el metabolismo oxidativo de las levaduras anteriormente mencionadas se inhibe y *Saccharomyces cerevisiae* toma el relevo. Esta especie de levadura, aislada con poca frecuencia en la microbiota de la uva, se caracteriza por su gran tolerancia a altas temperaturas y su resistencia a grados alcohólicos elevados convirtiéndola en la especie idónea para terminar la fermentación alcohólica (Carrascosa *et al.* 2005).

La microbiota levaduriana de la uva, las proporciones entre poblaciones en el mosto y su dinámica durante la fermentación alcohólica están influenciados por diversos factores. Por una parte, las poblaciones presentes en la uva varían en función de la situación geográfica del viñedo, de las condiciones climáticas, del grado de maduración, del estado sanitario de viñedo, de las técnicas de cultivo, de los tratamientos fitosanitarios y de la variedad de la uva (Carrascosa *et al.* 2005). Por otra parte, todas las operaciones que se realizan en bodega durante el proceso de recolección y vinificación influyen en las poblaciones presentes en el mosto y como consecuencia en la dinámica de fermentación posterior. No debemos olvidar la influencia de la selección de levaduras que se encuentran en el ambiente de la bodega durante todo el año hasta llegar a la época de vendimia. Durante este tiempo se establece una microbiota estable, que puede influir en la dinámica de fermentación (Tristezza *et al.* 2012).

Podemos deducir entonces, que el conjunto del viñedo y de la bodega forman un microecosistema específico. Es el caso de la especie *Saccharomyces paradoxus*, predominante en las fermentaciones de vinos croatas. En la tabla I (ver anexos) queda reflejada la variabilidad de las levaduras indígenas del viñedo en función de la zona vitivinícola.



El interés en el estudio de la ecología de levaduras radica en la influencia directa que ésta tiene sobre la calidad final del vino. Y es que, aparte de transformar los azúcares reductores en etanol, CO₂ y calor, las levaduras producen una serie de metabolitos secundarios que tienen repercusión directa sobre las características organolépticas del vino, tal y como puede apreciarse en la figura I de los anexos.

El papel general de *Saccharomyces cerevisiae*, o de especies pertenecientes al grupo “*Saccharomyces sensu stricto*” (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus* y *Saccharomyces pastorianus*) durante la fermentación ha provocado que su uso industrial se generalice en las bodegas, lo que puede llegar a sustituir la microbiota natural de la uva. (*Tristezza et al. 2012*). De esta manera, la influencia de las levaduras indígenas y su impacto directo sobre el perfil organoléptico de los vinos se pierde. Por tanto el estudio de la dinámica de una fermentación natural puede ser útil para identificar aquellas especies indígenas más interesantes y representativas de cada región particular que permitan ensalzar los rasgos organolépticos de sus vinos y para controlar mejor las fermentaciones espontáneas y evitar la estandarización de los vinos.

En su inicio, los métodos de identificación y caracterización de levaduras se basaban en criterios morfológicos, como la forma y tamaño de las células y fisiológicos, como la producción de esporas, test de fermentación, asimilación de azúcares, asimilación de nitratos, necesidades vitamínicas o la resistencia a cicloheximida (*Ribereau-Gayon et al.*). Sin embargo, estos métodos no son útiles en la clasificación de levaduras vínicas debido a su variabilidad intraespecífica y su dependencia del estado fisiológico de la levadura, reflejado en la figura II de los anexos.

Más adelante se usaron técnicas genéticas basadas en el apareamiento de cepas complementarias, pero en muchos casos especies fuertemente relacionadas llegaban a aparearse aunque sin ser capaces de producir progenie viable.

También se usaron con este fin técnicas bioquímicas, como la electroforesis de proteínas y el análisis de patrones de isoenzimas; ambas dependientes del estado fisiológico de la levadura.

Actualmente las técnicas para caracterización e identificación de levaduras vínicas han evolucionado hacia técnicas de biología molecular, independientes de su estado fisiológico. Estas técnicas basadas en el estudio de las moléculas de DNA y/o RNA, han probado ser adecuadas en el caso de levaduras vínicas debido a su rápida aplicación y su fiabilidad, que permite realizar el análisis de poblaciones durante el curso de la fermentación alcohólica. Se trata de técnicas dependiente de cultivo y recomendadas por la OIV (Organización Internacional del Vino) para el estudio de levaduras vínicas.

Con el objetivo de realizar un análisis exhaustivo de la población de levaduras desde el viñedo hasta las últimas etapas de la fermentación alcohólica utilizaremos dos técnicas en el estudio, la primera con diferenciación e identificación a nivel de género y especie, y la segunda a nivel de cepa.



Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del DNA ribosómico.

Los genes ribosomales 18S, 5,8S y 26S se agrupan en tándem formando unidades de transcripción. En estas unidades de transcripción existen dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2), que flanquean el gen 5,8S. Estas regiones ITS (espaciadores internos transcritos, en inglés *internal transcribed spacers*), que se transcriben pero no se procesan, son hipervariables, lo que ha permitido utilizarlas para la identificación de diferentes géneros y especies de levaduras.

La aplicación de esta técnica se lleva a cabo mediante PCR-RFLP. En primer lugar se amplifican los fragmentos específicos utilizando los cebadores ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y seguidamente se realiza la digestión con endonucleasas de restricción diferentes tales como CfoI, Hae III, Hinf I, DdeI y MboI. En este caso se eligió HaeIII. La restricción crea fragmentos que más tarde se separarán en función del peso molecular en un gel de electroforesis creando patrones de bandas. Existen bases de datos on-line de dichos patrones, como GenBank, que permitirán la identificación de las levaduras. Una de las ventajas de esta técnica es que no requiere la purificación previa del DNA, sino que se realiza directamente a partir del cultivo celular. Esta técnica está recomendada por la OIV para el análisis de levaduras a nivel de especie.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA).

El DNA mitocondrial (mtDNA) levaduriano es una molécula de entre 65 y 80 kb y en la mayoría de las especies es circular (*Orberán Raton, 2004*). Su alto índice de polimorfismo lo hace adecuado para la identificación de especies de levaduras y también para analizar la variabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* del vino. En 1992 Querol *et al.* desarrollaron la técnica evitando tanto el uso de gradientes de cesio como la purificación de las mitocondrias. Esto llevó a un aumento en la rapidez y facilidad de ejecución.

La técnica se basa en la diferencia en el contenido de los nucleótidos G-C-A-T entre el DNA mitocondrial (mtDNA) y el nuclear. El mtDNA es rico en A+T (75%) y poco abundante en G+C (20%). Así pues, en una digestión de DNA total, una enzima de restricción con diana por ejemplo, GANTC (N simboliza cualquier base) o GGCC, tendrá un bajo número de puntos de corte en el mtDNA lo que permitirá visualizarlo como bandas definidas en un gel de agarosa. Sin embargo, el DNA nuclear tiene un elevado número de puntos de corte para esos enzimas por lo que tras su digestión quedará reducido a pequeños fragmentos indetectables en un gel de agarosa.

Como punto importante, se debe tener en cuenta que los patrones de bandas que aparecen en el gel de electroforesis dependen del enzima y de la especie de levadura. Para *Saccharomyces cerevisiae*, los enzimas más adecuados son Hinf I y Hae III (*Carrascosa et al. 2005*) aunque si se realizan digestiones de poblaciones desconocidas los enzimas más adecuados son Hinf I ó Rsa I (*RESOLUCIÓN OIV-OENO 408-2011*). En este caso el enzima utilizado es Hinf I ya que dispone de una base de datos mayor y es el más utilizado en la mayoría de las publicaciones. Debido a la facilidad de ejecución es una técnica que se ha utilizado en muchas ocasiones



para la identificación y caracterización de levaduras vínicas, y está recomendada por la OIV para la diferenciación a nivel de cepa.

INTRODUCCIÓN

En nuestro trabajo desarrollaremos las dos técnicas anteriormente mencionadas, reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del DNA ribosómico y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial, con el objetivo de identificar y caracterizar las levaduras autóctonas de una bodega en la Denominación de Origen Rueda.

El estudio se ha llevado a cabo en colaboración con una bodega perteneciente a dicha denominación de origen donde se trabaja con fermentaciones espontáneas. Es decir, no se inoculan levaduras comerciales, por tanto estamos seguros de realizar un estudio sobre las cepas indígenas autóctonas presentes en la uva y en la bodega.

Como se ha comentado en los antecedentes, la microbiota levaduriana de la uva varía en función de la situación geográfica del viñedo, de las condiciones climáticas, del grado de maduración, del estado sanitario de viñedo, de las técnicas de cultivo, de los tratamientos fitosanitarios y de la variedad de la uva. Por este motivo el aislamiento de cepas se realizó durante tres campañas diferentes 2010, 2011 y 2012, ya que el estudio de una sola campaña no sería suficientemente representativo.

Se estudian cinco parcelas distintas que se vinificaron por separado con el fin de poder determinar posibles diferencias relacionadas con los tipos de suelos y características propias de cada una de éstas. La metodología de toma de muestras es la misma en las tres campañas y en cada una de las parcelas y queda reflejada en la tabla 1.

TOMA DE MUESTRAS		
LABORATORIO SIN SO ₂	Mosto recién estrujado	Fermentación tumultuosa
LABORATORIO CON SO ₂	Mosto recién estrujado	Fermentación tumultuosa
BODEGA	Mosto desfangado	Inicio de fermentación tumultuosa
		Fin de fermentación

Tabla 1 resumen de los momentos de muestreo en las tres fermentaciones diferenciales. Fuente propia.

En cada parcela hay distintos momentos de muestreo que quedan indicados en la tabla anterior. La intención es conocer a fondo el desarrollo de las poblaciones y las proporciones entre ellas, que van variando a medida que la fermentación alcohólica avanza y el medio es más restrictivo. Y valorando al mismo tiempo la influencia debido al procesado de la uva durante la vendimia.

La recogida de uva para las fermentaciones diferenciales y los siguientes procedimientos para la extracción del mosto en laboratorio se realizaron en condiciones de esterilidad, de tal manera que no hubiera contaminaciones externas.



Este estudio ecológico se diferencia de otros en su exhaustividad al contemplar todas las posibilidades. Las poblaciones de levaduras se ven modificadas como consecuencia de los tratamientos de la uva y el mosto en vendimia. Una de las operaciones más influyentes es el sulfitado, que en mostos blancos es mayor ya que están menos protegidos frente a oxidaciones. En particular, las levaduras de metabolismo oxidativo (dominantes durante los primeros estadios de las F.A) son las más sensibles. Para analizar la influencia que el sulfitado tiene sobre la flora levaduriana en este ecosistema en concreto se realizan dos microvinificaciones diferenciales en laboratorio, una con mosto sulfitado y otra sin sulfitar.

A continuación en la figura 1 se muestra un diagrama de flujo en el que se muestran las fermentaciones diferenciales llevadas a cabo y los momentos de muestreo en cada una de ellas.

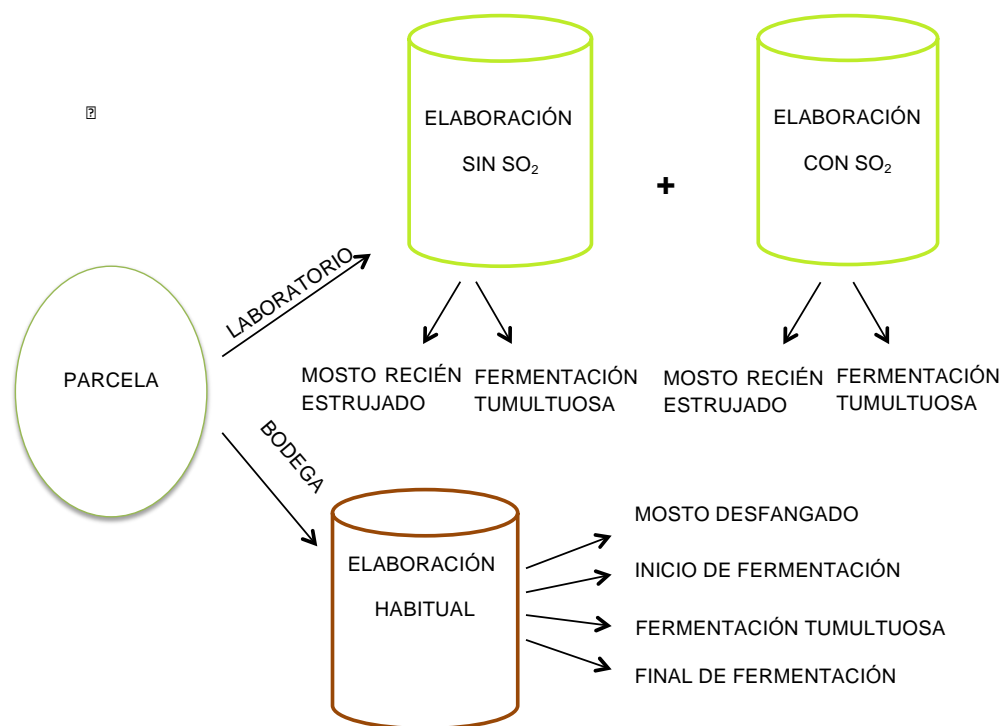


Figura 1: Diagrama de flujo de Toma de muestras. Fuente propia.

También se tiene en cuenta la influencia de las poblaciones estables que se encuentran en el ambiente de la bodega. De forma paralela, se toman muestras del mosto-vino de la bodega, para conocer la influencia de esta microflora estable sobre la dinámica de poblaciones.

El aislamiento de levaduras se realiza mediante siembras en masa de mosto a distintas concentraciones en medio de cultivo agar-extracto de malta. Las concentraciones del mosto fueron de 10^{-1} hasta 10^{-7} y junto con el agar se añadió



benomilo que es un fungicida para evitar el desarrollo de mohos en los cultivos importante sobre todo en las primeras etapas de del proceso fermentativo debido a las condiciones de aerobiosis.

Después de cultivar las placas en una estufa a 28°C durante 48-72h, las colonias independientes vuelven a aislarse en agar-extracto de malta, esta vez en medio sólido y con siembra en estría para asegurarnos de obtener células de forma independiente.

Por último, las colonias aisladas se recopilaron en tubos con medio agar-extracto de malta en forma de pico de flauta por razones de espacio y comodidad. Como resultado tenemos entre 14 y 17 levaduras aisladas por cada momento de toma de muestra de cada fermentación individual. Lo que hacen un total de 112-136 levaduras seleccionadas por cada parcela en una campaña, como puede observarse en la tabla 2.

PARCELA	N° DE LEVADURAS AISLADAS EN LOS DIFERENTES MOMENTO FERMENTATIVO								TOTAL PARCELA
	1	1M	2	2M	3	4	5	6	
1	14	14	17	17	17	17	17	17	130
2	17	17	17	15	16	17	17	17	131
3	17	17	15	15	16	17	17	17	131
4	17	14	17	17	17	17	17	17	133
5	17	17	15	15	14	15	15	17	125

Tabla 2 resumen del total de muestras recogidas durante la campaña 2012. Proyecto Fin de Carrera de Guillermo Simó (2013) Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de la variedad Verdejo en D.O Rueda.

Después del aislamiento de las levaduras se somete cada una a distintas pruebas de carácter fisiológico y bioquímico, con el objetivo de recopilar información sobre las características de su actividad metabólica antes de la identificación y caracterización. Estas pruebas son; poder fermentativo, acidez volátil, fenómeno killer y crecimiento en medio selectivo de lisina.



Mientras que el poder fermentativo y la acidez volátil son pruebas que evalúan el metabolismo levaduriano y su nivel de adecuación en una fermentación alcohólica, la prueba de la lisina se considera un medio de identificación.

Esta prueba consiste en la siembra de las levaduras en un medio cuya única fuente de nitrógeno es la lisina. Las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* necesitan otras fuentes de nitrógeno a parte de la lisina para crecer, por lo tanto las placas en las que aparezcan colonias se considerarán levaduras *No-Saccharomyces*. Este es un método rápido y sencillo mediante el cual realizar la primera diferenciación entre levaduras.

El factor *killer* responde a un fenotipo determinado de levaduras que segregan una toxina que puede ser letal para otras levaduras. De esta manera, las levaduras capaces de producir la toxina reducen la competencia por los recursos y tienen más posibilidades de dominar el proceso fermentativo. Existen además levaduras que no siendo capaces de producir la toxina son resistentes a ésta. A cada levadura se le aplicaron dos tests, uno para determinar si era productora de la toxina y otro para saber si era sensible a ésta.

Ambos tests tienen la misma dinámica. El test para determinar la producción de la toxina consiste en hacer crecer cada levadura frente a una cepa que sabemos que es sensible, y el test de sensibilidad consiste en hacer crecer cada levadura frente a una cepa que sabemos que produce la toxina. Las cepas utilizadas para esta prueba fueron la cepa sensible (*Saccharomyces cerevisiae* 1414) y la cepa *killer* (*Saccharomyces cerevisiae* 1443) que se obtuvieron directamente de la CECT. (Colección Española de Cultivos Tipo).

La relevancia práctica de esta prueba reside en el conocimiento de esta habilidad por si en el futuro se aislara alguna de las cepas para utilizarlas como inóculo en la fermentación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la efectividad de la toxina no asegura la implantación de una determinada cepa de levadura, ya que esta depende de factores como: la velocidad de implantación, el momento de inoculación o las condiciones del medio que favorezcan o inhiban la acción de la toxina.

Estos resultados han quedado recogidos en los Proyectos Fin de Carrera de Guillermo Simó (2013) *Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de la variedad Verdejo en D.O Rueda*, y de M^a Beatriz Toquero (2011) *Influencia del terruño en la población levaduriforme de los viñedos de la variedad Verdejo en la D.O. Rueda*.



OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es la puesta a punto de técnicas de biología molecular para la identificación de levaduras vínicas de distintas parcelas en distintos momentos de la fermentación en varias campañas para establecer la ecología de levaduras en una bodega de la D.O. Rueda.

Objetivos específicos:

1. Puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del DNA ribosómico (DNAr) ITS-5,8S. Ello nos permitirá la identificación de diferentes géneros y especies de levaduras.
2. Puesta a punto del estudio del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del DNA mitocondrial (mtDNA). Ello nos permitirá analizar la variabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* del vino.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. REACTIVOS

A continuación se indican los reactivos utilizados junto con la casa comercial que los suministró:

- El extracto de malta de OXOID.
- El agar, la dextrosa y la bacto peptona de DIFCO.
- Benomilo de SIGMA-ALDRICH.
- El enzima zimoliasa 20T (20,600 U/g) de SEIKAGAKU BIOBUSINESS.
- Las soluciones de ácido etildiaminotetraacético (o EDTA) 0,5M, de Tris-HCl 1M PH 7.5 y de dodecilsulfato sódico (o SDS) al 20% de FISHER SCIENTIFIC.
- Etanol absoluto para biología molecular y el acetato potásico de PANREAC.
- El isopropanol (también llamado 2-propanol) puro para biología molecular de SIGMA-ALDRICH.
- La ribonucleasa (RNasa) pancreática A bovina y las enzimas de restricción Hinf I (10 U/ml) y Hae III de PROMEGA.
- La solución madre TAE 50x (2M Tris-acetato y 50mM EDTA) para geles de electroforesis de PROMEGA.
- Kit comercial de PCR de DNA polimerasa GoTaq de PROMEGA.
- RedSafe de iNtRON.
- Los primers o cebadores ITS1 e ITS4 de SIGMA-ALDRICH.
- La agarosa de SIGMA-ALDRICH.
- Tampón de carga de las muestras de PROMEGA.
- Marcadores de peso molecular de FERMENTAS.
- Librería de levaduras en medio agar-extracto de Malta conservadas en cámara frigorífica a 4°C.
- Las asas de siembra de FISHER SCIENTIFIC.
- Cubetas de electroforesis de Bio-Rad.
- Instrumento de análisis y documentación de geles Gel Doc de Bio-Rad.

2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Medio agar-Extracto de malta en pico de flauta

La composición del medio de cultivo sólido de levaduras es la siguiente:

Componente	Concentración
Agar	30 g/l
Extracto de malta	130 g/l
Agua destilada	Hasta completar el volumen

La mezcla se lleva a punto de ebullición en el microondas y se agita bien la suspensión para que el agar se disuelva completamente. Se introducen 6 ml de la mezcla en tubos de ensayo que se esterilizan en el autoclave (30 minutos a 121°C y 1



atm). Una vez estériles se inclinan en un ángulo de 10° aproximadamente para que el agar solidifique a temperatura ambiente durante 30 minutos, formando un pico de flauta.

Medio de cultivo agar-extracto de malta con benomilo

Si en alguno de los casos los cultivos con el medio anterior aparecen contaminaciones por hongos filamentosos, se prepara un segundo medio agar-extracto de malta un fungicida, benomilo. Este pertenece al grupo químico de los bencimidazoles. Preparamos el medio de la misma forma que el anterior, pero en este caso el medio de cultivo se esteriliza en el autoclave antes de añadirlo a los tubos de ensayo. Una vez estéril, el medio debe ser enfriado a 45°-60°C en un baño de agua antes de añadir el benomilo (a una concentración de 55 mg por 100 mL de medio), ya que es termosensible.

Medio nutritivo líquido YEPD (del inglés *Yeast Extract Peptone Dextrose*)

Al contrario que el primero, el medio YEPD es un medio líquido compuesto por:

Componente	Concentración
Dextrosa	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Bacto peptona	20 g/l
Agua destilada	Hasta completar el volumen

La mezcla se calienta en el microondas hasta la ebullición, momento en el que se retira inmediatamente. En cada tubo se introducen 2,5 ml que se esterilizan en el autoclave (30 min a 121°C y 1 atm) y se mantienen en cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su uso.

3. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la preparación de las siguientes soluciones contamos con las soluciones madre EDTA 0,5M y Tris-HCl 1M y agua, todas ellas de grado Biología Molecular que no muestran ninguna actividad detectable de DNAsas o RNAsas.

Solución 1M Sorbitol, 0,1M EDTA

Para la preparación de 1 litro de solución 1M Sorbitol 0,1M EDTA, se disuelven en primer lugar 182,7 g de Sorbitol en 700 mL de agua destilada. Para su esterilización se utiliza un ciclo corto de 10 minutos (a 121° y a 1 atm) para evitar la caramelización, ya que el sorbitol es un alcohol polihídrico azúcar. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de flujo laminar se añaden 200 ml de la solución EDTA 0,5M y agua hasta completar 1 L de volumen final.

Solución 50mM Tris-HCl, 20mM EDTA

Partiendo de la solución madre 0,5M EDTA y 1M Tris-HCl ya esterilizadas, y realizando todas las operaciones dentro de una campana de flujo y con material estéril se mezclan los siguientes componentes:



Componente	Concentración
EDTA 0,5M	4% v/v
Tris-HCl 1M	5% v/v
Agua destilada estéril	Hasta completar el volumen

Solución 10mM Tris-HCl y 1mM EDTA

Del mismo modo que la anterior, se parten de las dos soluciones madre y se realizan todas las operaciones en condiciones y con material estéril.

Componente	Concentración
EDTA 0,5M	0,2% v/v
Tris-HCl 1M	1% v/v
Agua destilada estéril	Hasta completar el volumen

Solución de acetato potásico 5M

Componente	Concentración
Acetato potásico	492,5 g/l
Agua destilada estéril	Hasta completar el volumen

El acetato potásico se pesa y se disuelve en agua destilada. Después la solución se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 30 min y 1 atm.

Solución SDS 10%

La solución de SDS al 10% se obtiene diluyendo a la mitad en agua la solución de SDS al 20% comercial de grado Biología Molecular de FISHER SCIENTIFIC.

4. SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

Tampón de electroforesis TAE (Tris, acetato y EDTA) 1x

El tampón de electroforesis 1x se obtiene haciendo una dilución 1/50 en agua de la solución concentrada TAE 50x.

Gel de agarosa para electroforesis

Partimos del buffer TAE 1x que hemos preparado anteriormente. En él, disolvemos la agarosa a una concentración de 0,8 g, 1 g o 1,5 g por cada 100 ml de tampón. En nuestro caso, nuestro tamaño de gel se forma con 160 ml de tampón. Pesamos la agarosa para obtener la concentración necesaria y la disolvemos en el tampón TAE calentando en el microondas y agitando. Es importante que el líquido quede completamente transparente. Si la agarosa no se disuelve bien el tamaño de poro no será el adecuado y además el DNA no correrá bien. Un vez ha llegado al punto de ebullición se retira rápidamente. Se deja enfriar hasta 55°C antes de añadir RedSafe, ya que es termosensible (a una concentración de 2,6µl/60ml de gel). RedSafe es un agente intercalante, que se inserta entre las bases de una molécula de DNA y permite visualizar el DNA cuando se expone a una luz ultravioleta.



Una vez añadido el RedSafe el gel se extiende sobre la cubeta con el peine que servirá para formar los pocillos. Se hace con cuidado de no crear burbujas que no desaparecerán si el gel se solidifica.

5. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ZIMOLIASA

Partimos de la zimoliasa liofilizada 20T con una actividad 1,3- β -glucano hidrolasa de 20.000 U/g. Para llegar a la concentración requerida de 400 U/mL debemos diluir el enzima en agua destilada y esterilizada en la siguiente proporción:

Componente	Concentración
Zimoliasa 20T	0,02g/ml
Agua destilada estéril	Hasta completar el volumen

Las cantidades requeridas del enzima, en función del volumen de la alícuota se pesan en una balanza de precisión. Después, disolvemos la zimoliasa en la cantidad de agua destilada estéril requerida en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y materiales estériles) y mantenemos a -20°C en el congelador.

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO AERÓBICO DE LEVADURAS

Para asegurar que obtenemos levaduras en condiciones óptimas de crecimiento, se resiembran las levaduras de la librería en medio de agar-extracto de malta. Todo el proceso se hace en cabina de flujo laminar, con proximidad de mechero Bunsen y uso de guantes y asas de siembra estériles desechables, todo lo cual evitará posibles contaminaciones.

Se dejan en crecimiento a 28 °C durante 3 a 5 días observando que no aparecen contaminaciones por mohos; de ser así se pasan los cultivos afectados a placa de Petri con medio suplementado con benomilo; se practica siembra de estría por agotamiento y se deja crecer durante 3 días a 28 °C; si no hay contaminaciones se vuelven a cultivar las levaduras en tubo de pico de flauta.

Para el análisis del DNA mitocondrial por RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) debemos asegurarnos de que las levaduras estén en fase de respiración, no de fermentación, con lo que aumenta el número de mitocondrias y el contenido mtDNA será mayor. Al ser las levaduras anaerobias facultativas debemos facilitar su crecimiento en condiciones respiratorias mediante agitación constante que permita la adecuada aireación del cultivo. Las levaduras son sembradas desde el tubo pico de flauta al medio líquido YEPD anteriormente preparado con un asa de siembra y tomando las precauciones de esterilidad mencionadas anteriormente. Es importante recordar que siempre hay que identificar las muestras rotulando en los tubos la denominación de la muestra y el día de siembra. Finalmente, colocamos los tubos dentro de una gradilla de forma inclinada y esta gradilla se instala en el agitador. La inclinación de los tubos es muy importante para asegurar el crecimiento de las levaduras en condiciones de aerobiosis.



Figuras 2 y 3: agitador y disposición de los tubos durante el periodo de incubación. Fuente propia.

En un principio, el crecimiento se prolongaba durante 24h a 28°C y 220 rpm, sin embargo a medida que la técnica se desarrolló y comparando con reseñas bibliográficas se establecieron 12h de crecimiento. De esta manera la cantidad de mtDNA es suficiente para todas las especies de levaduras (ya que existen diferencias en la velocidad de crecimiento) y la duración del proceso se reduce considerablemente. El crecimiento ha sido el adecuado cuando comprobamos que el medio está turbio lo que indica que las levaduras están en suspensión, y no se han depositado en el fondo.

2. EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL

El protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales utilizado está basado en el descrito por Querol *et al.*, pero presenta algunas modificaciones notables. Para la extracción de ácidos nucleicos totales se debe trabajar en condiciones de esterilidad y con rapidez para minimizar el riesgo de contaminación con otros ácidos nucleicos y la degradación de los ácidos nucleicos extraídos.

Se comienza extrayendo 1,5 ml del medio YEPD y traspasándolo a un microtubo eppendorf de 2 ml. La muestra se centrifuga a 13.400 rpm en una microcentrífuga de mesa durante 2 min de tal manera que en el fondo quedan depositadas las células de levadura y el sobrenadante, compuesto por el medio de cultivo YEPD que es retirado. A continuación lavamos las células de levadura con 1ml de agua destilada esterilizada, agitando y centrifugando después (2 min a 13.400 rpm). El agua se descarta y se añaden 0,5 ml de la solución 1M sorbitol, 0,1M EDTA. Se resuspenden las células mediante agitación en vórtex y se añaden 20 µl de la solución de zimoliasa (a 400 U/mL) cuya finalidad es la rotura de las paredes celulares de las levaduras. Al añadir la disolución 1M sorbitol, 0,1M EDTA al mismo tiempo que el enzima de lisis, permitimos la estabilización osmótica del protoplasto (célula sin pared celular). De esta forma la célula no explota al ser digerida por el enzima y el DNA se conserva intacto. La muestra se incuba a 37°C durante 30 minutos.

Cuando la incubación termina, volvemos a centrifugar, esta vez a menos velocidad (5.000 rpm) pero durante más tiempo (5 min). El sobrenadante es descartado y el



pellet se resuspende en 0.5 ml de una disolución 50mM Tris-HCl pH 7.5, 20mM EDTA. A continuación se añaden 13 μ l de SDS 10%. Con estas dos soluciones, terminamos de lisar las paredes de los protoplastos, liberando así el DNA mitocondrial y nuclear. Para favorecer la lisis se mantiene la muestra a 65°C durante 5 minutos. Una vez terminada la lisis se provoca la precipitación de proteínas y restos de la célula utilizando acetato potásico y baja temperatura (-20°C).

Una vez precipitados los restos de células y proteínas, la muestra se centrifuga y el sobrenadante (que contiene el DNA nuclear y mitocondrial) es extraído y traspasado a un microtubo eppendorf que contiene el mismo volumen de isopropanol. El alcohol provoca la precipitación de los ácido nucleicos. Mezclamos por inversión y automáticamente observamos la formación de la hebra de DNA. La muestra se centrifuga durante 10 minutos a 13.400 rpm y el sobrenadante se descarta. El *pellet*, que contiene la muestra de DNA es lavado con etanol al 70%. De esta manera se eliminan las sales. Como último paso, la muestra se resuspende en solución 10mM Tris-HCl pH7,5 y 1mM EDTA donde se mantendrá congelado a -20°C hasta su uso. El volumen de solución necesario en este último paso dependerá del tamaño del pellet. Habitualmente son necesarios entre 30-40 μ l.

Durante la extracción de ácidos nucleicos totales también se obtiene RNA que es necesario digerir ya que interfiere en la cuantificación de DNA. El RNA se digirió con RNasa A pancreática a una concentración final de 100 μ g/ml a 45°C durante una hora. A continuación es necesario eliminar la RNasa y el RNA degradado. Se añaden 400 μ l de la solución 10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA y un 10% de este volumen de NaCl 5M. Por último, más del doble de este volumen de etanol absoluto (900 μ l). Mezclamos toda la disolución pipeteando y dejamos precipitar a -20°C 4h como mínimo. Más tarde la muestra se centrifuga durante 30 minutos a 4°C y 12.000 rpm, tras este proceso el sobrenadante se retira. Se vuelve a suspender en la solución 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA.

Para poder calcular la cantidad de enzima necesaria en la digestión con el enzima Hinf I es preciso conocer la concentración de DNA que contienen las muestras. Para ello se utiliza el espectrofotómetro nanodrop (figura 4).

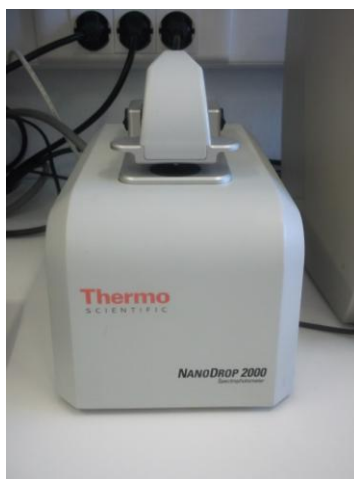




Figura 4 Espectrofotómetro nanodrop. Fuente propia.

Para ello, se diluyen las muestras 1:5 en 10 μl totales y ponemos 1 μl lo más centrado en el lector posible. La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo la absorbancia a 260 nm y comparando con un blanco. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de DNA de 50 ng/ μl . La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A260/A280 para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del DNA y el RNA puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0.

3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP) DEL DNA RIBOSÓMICO

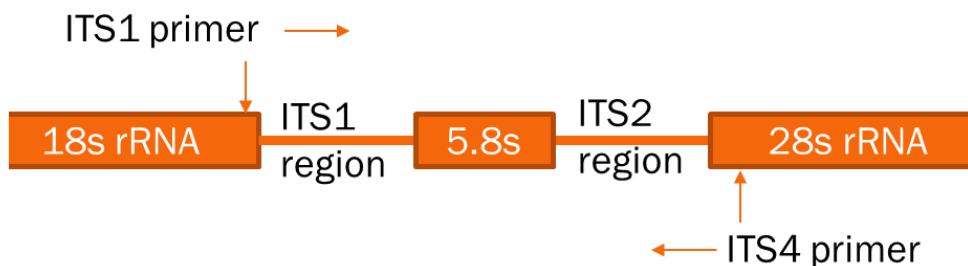


Figura 5 extraída de la página web <http://wpamushroomclub.org/education/introduction-dna-barcoding/>

En primer lugar, a partir de DNA total (o bien a partir de cultivo) se amplifica la región ITS-5,8S empleando los primers ITS1 e ITS4 de secuencia 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') y (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' respectivamente. Se prepara un mastermix con volumen suficiente para todas las muestras a ensayar teniendo en cuenta que el volumen final por reacción será de 50 μL . La composición del mastermix es como sigue:

Componente	Volumen
Tampón 5x	10 μl
25 mM MgCl_2	3 μl
10 mM dNTP	1 μl
Agua destilada estéril	Hasta 48,5 μl

Por cada reacción se añade al microtubo de PCR 48,5 μl de Mastermix y 0,5 μl de enzima Go Taq DNA polimerasa. Cada colonia a analizar se puede resuspender directamente en la mezcla anterior sin extracción previa del DNA. También se puede optar por añadir 50 ng de DNA en 1 μl de volumen. Las condiciones de PCR son las siguientes:

- ◆ 10 minutos de desnaturalización a 95°C.
- ◆ 35 ciclos sucesivos de 3 fases cada uno:



- o 1 minuto de desnaturalización a 94°C.
- o 2 minutos de anillamiento a 55,5°C.
- o 2 minutos de elongación de la cadena a 72°C.
- ◆ Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

El producto amplificado se carga en un gel de agarosa al 1% sin necesidad de usar RedSafe puesto que el tampón de reacción de la PCR contiene un colorante con afinidad por el DNA que permite seguir la migración de la muestra durante la electroforesis. En la cubeta, el DNA es sometido a un campo eléctrico con velocidad constante. Debido a la carga negativa del DNA, este migra del polo negativo al polo positivo. La velocidad de la migración depende del tamaño de los fragmentos. En este caso la fuente se configura a 100 V durante 30 min. El fragmento amplificado debe ser de 880 pb.

Seguidamente es necesario obtener el RFLP mediante la digestión de los productos de las PCRs con un enzima de restricción del que se conozca un patrón característico para la especie. Nosotros usamos Hae III que debe generar fragmentos de 320, 230, 180 y 150 pb en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Se digieren con este enzima 5 µl del producto de PCR en el tampón adecuado en 10 µl de volumen total de la siguiente manera:

Componente	Volumen
DNA obtenido por PCR	5 µl
BSA (1 µg/ µl)	1 µl
Tampón del enzima 10x	1 µl
Agua destilada estéril	2,5 µl
Enzima Hae III (10 U/µl)	0,5 µl

Se incuba la digestión durante 2 horas a 37°C. Tras la digestión se añaden a las muestras 2 µl de tampón de carga 6x y se introducen en los pocillos del gel de agarosa al 1,5% en presencia de RedSafe. En un extremo del gel, se añade el patrón de peso molecular 100 pb. El patrón permite conocer el peso de las bandas por comparación. Para la visualización de las bandas de DNA con luz ultravioleta y la adquisición de imágenes con calidad digital se utilizó un instrumento Bio-Rad Gel Doc (software Quantity One 9.2).

4. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

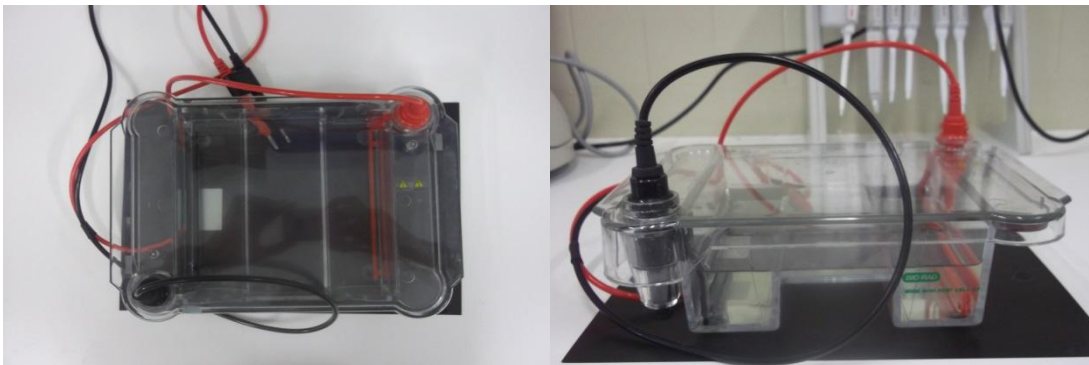
Para el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del DNA mitocondrial se digiere el DNA total con el enzima de restricción Hinf I. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que se necesita para digerir 1 µg de DNA. Conociendo la concentración en la que se encuentra el enzima comercial (10 U/µl) y conociendo la cantidad de DNA que queremos digerir podemos calcular fácilmente la dosis a utilizar. Generalmente se añade exceso de enzima respecto de la cantidad de DNA, de esta manera se asegura una digestión correcta. En nuestro caso digerimos 30 µg de DNA total y 40U (4 µl) de enzima de restricción. El tampón



específico del enzima debe añadirse en una proporción de un 10% de la reacción total de digestión.

Componente	Cantidad
Muestra DNA	30 μg
Hinf I 10 U/ μl	4 μl
Buffer 10x	4 μl
Agua destilada esterilizada	Hasta completar 40 μl de digestión

La digestión se realiza en microtubos eppendorf a 37°C durante 4 horas. Tras la digestión se añaden a las muestras 6 μl de tampón de carga 6x y se introducen en los pocillos del gel de agarosa al 0,8%. En un extremo del gel, se añade el patrón de peso molecular 1 kb. El patrón permite conocer el peso de las bandas por comparación. En este caso, la fuente se configura a 90V y a 60-80 minutos.



Figuras 6 y 7: Cubeta para la electroforesis de gel de agarosa. Fuente propia.

Para la visualización de las bandas de DNA con luz ultravioleta y la adquisición de imágenes con calidad digital se utiliza un instrumento Gel Doc de Bio-Rad (software Quantity One 9.2).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP) DEL DNA RIBOSÓMICO

Está ampliamente demostrado que el complejo formado por regiones ITS y el gen 5,8 rRNA es muy útil para determinar relaciones filogenéticas, permitiendo identificar mediante el uso de enzimas de restricción levaduras a nivel de género y especie.

Se trata de una técnica relativamente sencilla y rápida que permite (sin necesidad de extracción previa de DNA) determinar si las cepas de estudio son o no *Saccharomyces cerevisiae*, pudiendo de esta forma confirmar el test de la lisina, proporcionando una selección previa que nos permitirá comparar más adelante a través del RFLP de mtDNA la identificación de cepas dentro de esta especie.

El protocolo utilizado se basa en los estudios de Esteve Zarzoso *et al.* de 1999.

Se han realizado geles de electroforesis tanto de DNA total sin digerir como de DNA digerido con la enzima Hae III. Se muestra un ejemplo de cada uno de estos geles en las figuras 8 y 9 respectivamente.

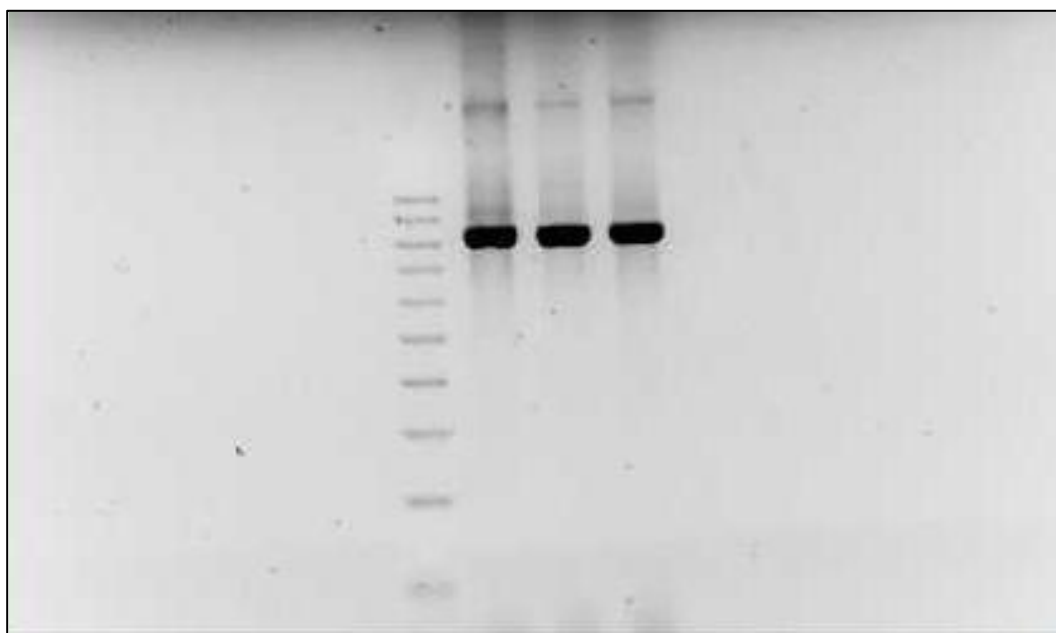


Figura 8 gel de electroforesis de DNA total tras PCR del rDNA. Fuente propia.

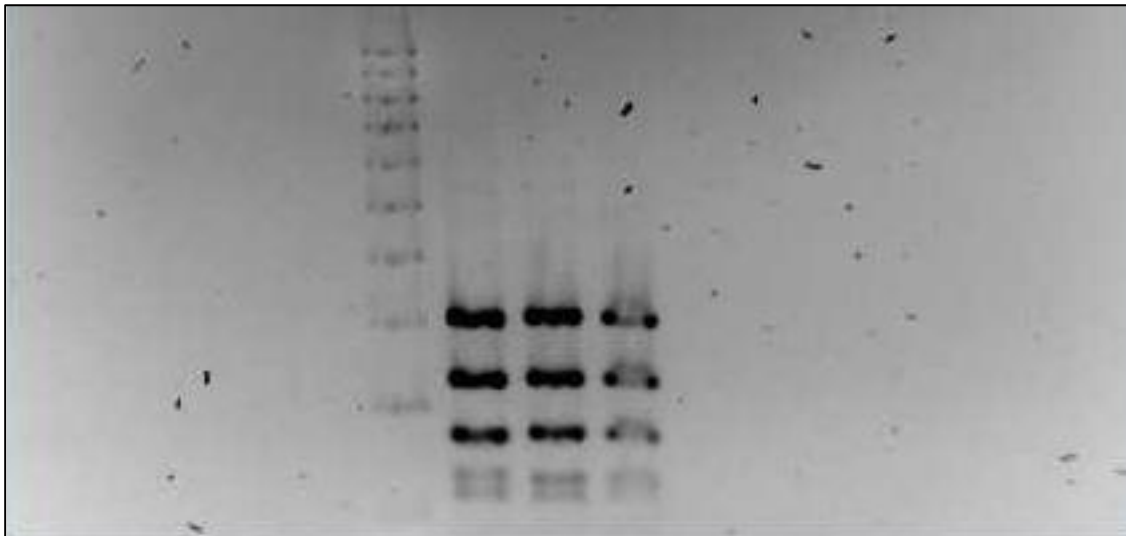


Figura 9 gel de electroforesis PCR-RFLP tras digestión con la enzima Hae III. Fuente propia.

2. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

El DNA mitocondrial levaduriano presenta una gran variabilidad de secuencia, lo que la convierte en un instrumento valioso para la identificación de distintos géneros y especies de levaduras, así como también analizar la variabilidad de las cepas de *S. cerevisiae*. En 1992 Querol *et al.* desarrollaron un método para el análisis del polimorfismo del mtDNA que se basa en la diferencia en el contenido de los nucleótidos G-C-A-T entre el DNA mitocondrial (mtDNA) y el nuclear. El mtDNA es rico en A+T (75%) y poco abundante en G+C (20%). Así pues, en una digestión de DNA total, una enzima de restricción con diana por ejemplo, GANTC (N simboliza cualquier base) o GGCC, tendrá un bajo número de puntos de corte en el mtDNA lo que permitirá visualizarlo como bandas definidas en un gel de agarosa. Sin embargo, el DNA nuclear, tras la digestión con esas enzimas, quedará reducido a pequeños fragmentos indetectables en un gel de agarosa.

Nosotros hemos puesto a punto un protocolo a partir del protocolo original de Querol y de otros protocolos convencionales proporcionados por distintos laboratorios. El protocolo se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos y se diferencia de los protocolos convencionales en que eliminamos la RNasa y los fragmentos de RNA degradado mediante precipitación y también incluimos la cuantificación del DNA total obtenido.

El principal problema con el que nos encontramos en la puesta a punto de la técnica fue que en los geles de electroforesis observábamos grandes diferencias en la cantidad de DNA entre las diferentes muestras, y en las que el DNA era muy abundante no se observaba digestión y en las que había poco DNA no podían visualizarse las bandas como puede observarse en la figura 10.

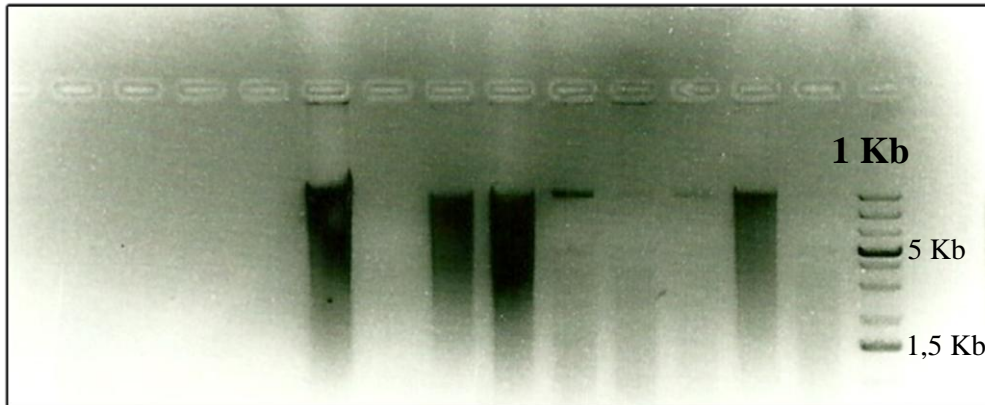


Figura 10 Resultado gel de electroforesis tras RFLP mtDNA, con poca digestión. Fuente propia.

Cuantificamos el DNA usando un espectrofotómetro nanodrop y confirmamos la gran variabilidad en la cantidad de DNA obtenido en las distintas muestras (desde 50 μg hasta 500 μg totales). A pesar del tratamiento con RNasa la relación de absorbancias 260nm/280nm era superior a 2, lo que indicaba que los fragmentos de RNA degradado interferían en la cuantificación del DNA. Así pues introdujimos el precipitar el DNA con cloruro sódico y etanol tras la digestión con RNasa. Mediante este procedimiento eliminábamos la RNasa y los fragmentos de RNA degradado. Solamente el DNA mitocondrial y nuclear precipitan en esas condiciones. Resuspendíamos de nuevo el pellet en solución 10mM Tris-HCl y 1mM EDTA, recuantificábamos el DNA y digeríamos con las unidades adecuadas de Hinf I. Tras varias digestiones determinamos que la cantidad adecuada de DNA total a digerir era de 30 μg y las unidades de enzima 40 U. Ello conllevó numerosos ensayos de digestión y gels de electroforesis.

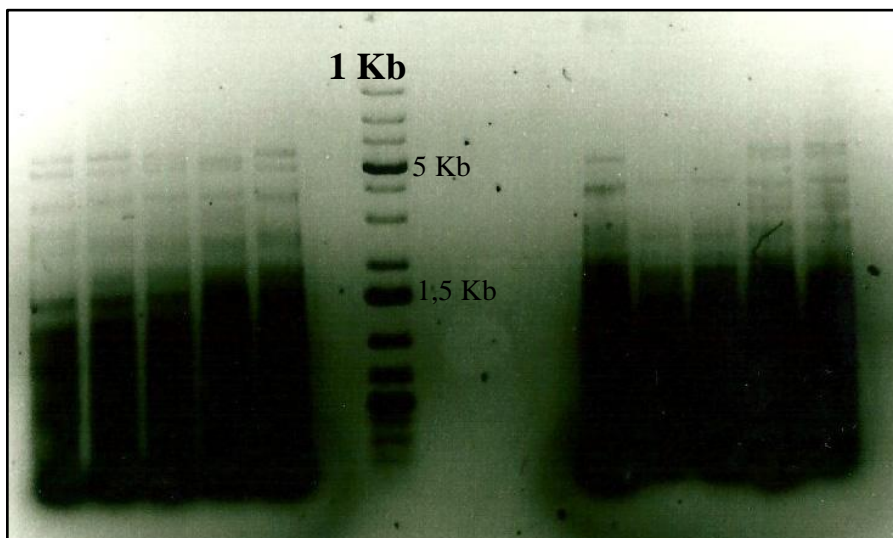


Figura 11 Resultado gel de electroforesis tras RFLP mtDNA, con digestión apropiada tras cuantificación. Fuente propia.



Universidad de Valladolid

ECOLOGÍA DE LEVADURAS DE LA UVA AL VINO. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPADO DE LEVADURAS

Consideramos que la técnica ha sido puesta a punto con éxito y que estamos en disposición de iniciar la identificación de las cepas de *S. cerevisiae* involucradas en las distintas fases de la fermentación del estudio en el que se enmarca este trabajo de fin de grado. Para ello contamos con diferentes patrones de corte con el enzima Hinf I procedentes de diferentes cepas y que están registradas en la base de datos de Genbank.



CONCLUSIONES

Podemos concluir que se ha conseguido el principal objetivo planteado al inicio del trabajo: la puesta a punto de técnicas de biología molecular para la identificación de levaduras vínicas.

Concretamente, las conclusiones que se derivan de este trabajo son:

1. Hemos puesto a punto la reacción en cadena de la polimerasa y análisis polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del DNA ribosómico (DNAr) ITS-5,8S.
2. Hemos puesto a punto del estudio del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del DNA mitocondrial (mtDNA). Nuestro protocolo introduce cambios notables durante el proceso de la purificación del DNA total que consisten en la eliminación de la RNasa y de los fragmentos digeridos de RNA y ajustar adecuadamente la cantidad de unidades de enzima requeridas para digerir adecuadamente el DNA nuclear y mitocondrial. Demostramos que estos cambios garantizan el éxito de la técnica.

Estos resultados son importantes y permitirán de forma inmediata el análisis de nuestra librería completa de levaduras.



BIBLIOGRAFÍA

1. Carrascosa A.V., Muñoz R., González R. 2005. Microbiología del vino.
2. Tristezza M., Vertrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, Vittorio., Logrieco A., Mita, G., Griego., F. 2012. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region.
3. Orberán Ratón T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico.
4. Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Environmental Microbiology* 58(9): 2948.
5. RESOLUCIÓN OIV-OENO 408-2011. Herramientas de biología molecular para identificar la levadura de vinificación *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies de levadura relacionadas con la vinificación.
6. RESOLUCIÓN OIV-OENO 370-2012. Lignes directrices pour la caractérisation des levures de vinification du genre *Saccharomyces* isolées de milieux vitivinicoles.
7. Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Campus di Macchia Romana, Potenza 85100, Italy.*
8. Suárez-Lepe J.A., Íñigo Leal B. Microbiología enológica: fundamentos de vinificación.



ANEXOS

Tabla I.

		Etapa fermentiva										Etapa aeróbica		
		1.ª fase			2.ª fase			3.ª fase						
		Kl. apiculata	C. pulcherrima	H'spora guilliermondii	Zigo-sacch. veronae	T'spora rosci	T. bacillaris	Sacch. ellipsoideus	Sacch. pastorianus	Sacch. oviformis	Sacch. mangini	Sacch. beticus	Sacch. cheresiensis	Sacch. montuliensis
Zona Norte	Navarra	100	60	0	0	8	0	100	30	0	20	0	0	0
	Rioja	92	50	0	0	60	0	100	30	20	20	0	0	0
	Aragón	84	17	0	8	8	17	100	25	33	67	15	5	0
	Panadés	70	0	0	8	24	87	100	20	12	54	10	0	0
Zona Centro	Mancha	86	10	0	24	38	0	100	10	35	58	5	0	0
	Extremadura	82	0	0	87	37	0	100	0	46	41	5	10	0
Zona Sur	Jerez	50	0	65	20	45	0	100	0	25	100	63	10	5
	Condado-Aljarafe	38	0	54	24	53	0	100	0	24	100	70	15	15

Tabla resumen de la distribución de levaduras en algunas de las zonas vitivinícolas más importantes de España. (Suárez-Lepe)

Figura I.

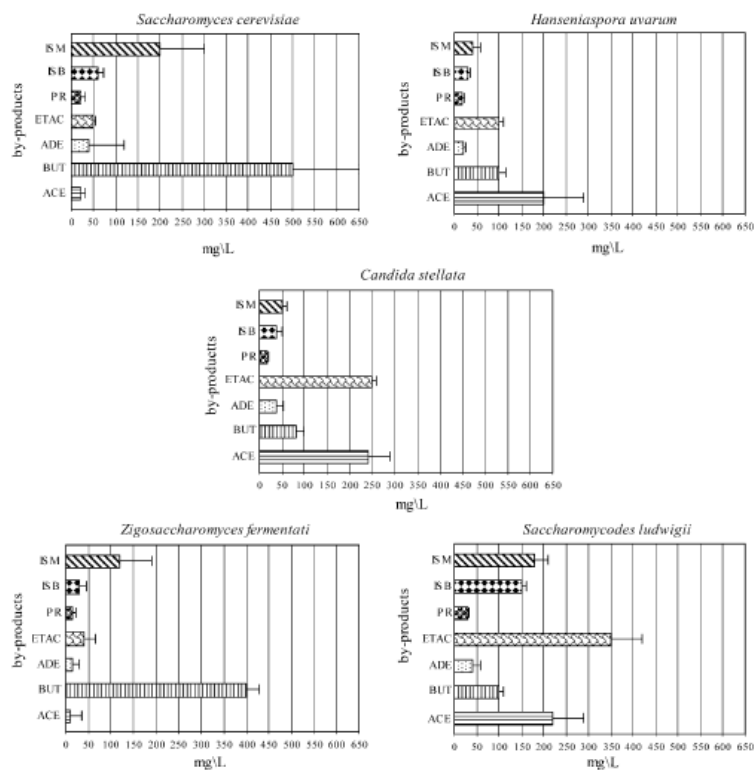


Fig. 1. Aromatic profile characterizing different wine yeast species: ISM= isoamyl alcohol; ISB= isobutanol; PR = *n*-propanol; ETAC=ethyl acetate; ADE=acetaldehyde; BUT=2,3-butane diol; ACE=acetoin.

Tabla resumen: Diferencias en la producción de metabolitos por parte de levaduras durante el proceso fermentativo. Romano et al. 2003.

