



# **MONITORIZACIÓN MOLECULAR DE LA ECOLOGÍA LEVADURIFORME DEL MOSTO AL VINO**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Curso: 2014/15

**Alumno: Álvaro Ramos Ballesteros**  
**Tutores: María Simarro Grande – Violeta Ruipérez Prádanos**

**Grado de Enología**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
5.1. Aislados de levaduras .....	11
5.2. Reactivos.....	12
5.3. Medios de cultivo utilizados.....	13
5.4. Soluciones para la purificación de ácidos nucleicos.....	13
5.5. Soluciones para la electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	14
5.6. Preparación de la solución de zimoliasa.....	15
5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ADN ribosómico.....	16
5.8. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de ADN mitocondrial.....	17
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>27</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>28</b>

## 1. RESUMEN.

La calidad, tipicidad y singularidad de un vino están directamente relacionadas con las poblaciones de levaduras que intervienen en el proceso fermentativo, desde la obtención del mosto hasta el vino.

El presente trabajo fin de grado pretende el análisis de la ecología de las levaduras desde el mosto hasta el vino, en una bodega de la Denominación de Origen Rueda.

En primer lugar se realiza una revisión bibliográfica sobre la gran importancia del estudio de distintas poblaciones microbianas, de su forma de actuar durante la fermentación alcohólica y su impacto en la tipicidad y calidad del vino final. También se explica y detallan las técnicas de biología molecular que se han utilizado para identificar la población levaduriana. Estas técnicas son el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región ribosomal ITS-5.8s que permite la identificación de diferentes géneros y especies de levaduras y el estudio de los RFLP del ADN mitocondrial para la identificación de diferentes cepas de levaduras vínicas del género *Saccharomyces*, que son las levaduras que se imponen en la fermentación alcohólica. Estas dos técnicas están aprobadas por la OIV, organización internacional de la vid y el vino, para este tipo de estudios.

Los resultados obtenidos después del análisis de 51 aislados procedentes de tres momentos distintos del proceso fermentativo mediante las técnicas moleculares mencionadas, permiten la identificación de 11 patrones de restricción diferentes, todos ellos pertenecientes al género *Saccharomyces cerevisiae*. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del ecosistema propio de la bodega en relación con las poblaciones levadurianas que actúan durante el proceso fermentativo.

## 2. INTRODUCCIÓN.

Tradicionalmente la producción de vino se ha llevado a cabo utilizando cepas de levaduras procedentes del viñedo y del ambiente de la bodega.

Las levaduras en el viñedo se encuentran principalmente en la piel de las bayas y más concretamente en los alrededores de las aperturas estomáticas y en las microlesiones, donde se producen exudados. El número de levaduras en una baya justo antes de la cosecha está comprendido entre  $10^3$ - $10^5$  ufc/baya (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Las especies predominantes en la baya son las levaduras de metabolismo estrictamente oxidativo, como el género *Rhodotorula* y también especies con poco poder fermentativo, principalmente especies apiculadas, como *Kloeckera* y *Hanseniaspora*, que suponen más del 75% de las poblaciones de levaduras presentes en el viñedo (Carrascosa *et al.* 2005).

Sin embargo, el género *Saccharomyces* se encuentra fijada en la bodega de elaboración, en superficies, depósitos y demás maquinaria de procesado de la vendimia, de tal forma que se puede considerar la bodega como parte de la ecología de las fermentaciones espontáneas (Hidalgo *et al.* 2011).

La microbiota levaduriana de la uva, las proporciones entre poblaciones, varía en función de la situación geográfica del viñedo, de las condiciones climáticas, del grado de madurez de la uva, del estado sanitario del viñedo, de los tratamientos con fitosanitarios realizados en el viñedo, de las prácticas culturales aplicadas al viñedo, de la aplicación de técnicas de cultivo de agricultura convencional o de agricultura ecológica, y de la variedad de uva (Carrascosa *et al.* 2005). Podemos deducir entonces que el conjunto viñedo-bodega forma un microecosistema específico (Tristezza *et al.* 2012).

Durante las primeras horas de la fermentación alcohólica espontánea, sin adición de levaduras exógenas, se produce una multiplicación de los mismos géneros de levaduras que contiene naturalmente la vendimia, que son los géneros de metabolismo oxidativo y las levaduras de géneros apiculados, anteriormente citados.

Al cabo de las primeras horas de iniciarse el proceso fermentativo, y debido a la presencia de factores selectivos, tales como la anaerobiosis, la presencia de  $SO_2$ , la elevada concentración de azúcares y la creciente concentración de etanol en el medio, hacen que aparezcan los géneros de levaduras *Saccharomyces*, especialmente adaptadas al medio y al proceso fermentativo, multiplicándose hasta poblaciones de  $10^7$  células/ml, realizando casi la totalidad del proceso fermentativo (Hidalgo *et al.* 2011).

El interés del estudio de la ecología de las levaduras en el viñedo, proceso fermentativo y en el vino final, radica en la influencia directa de las levaduras en la calidad del vino final. Las levaduras no solo transforman los azúcares reductores en etanol,  $CO_2$ , y calor, sino que las levaduras forman metabolitos secundarios que tiene una gran influencia en las características organolépticas del vino, dotándole de tipicidad y singularidad.

El papel predominante durante la fermentación de las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y de las especies pertenecientes al género “*Saccharomyces sensa stricto*” (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*) ha provocado que su uso se generalice en las bodegas, lo que puede llegar a sustituir la microbiota natural de la uva (Tristezza *et al.* 2012).

La influencia de las levaduras indígenas que confieren un determinado carácter, singular y que potencian la tipicidad de los vinos y características organolépticas propias, se pierde por el uso de cultivos comerciales de levaduras del género *Saccharomyces*.

Por tanto, el estudio de la dinámica de fermentación natural, puede ser útil para identificar las especies de levaduras indígenas más importantes o interesantes en cada región vitícola, que permita ensalzar los rasgos organolépticos típicos de los vinos de esa región, evitando así la estandarización de los vinos, además de permitir un mejor control de las fermentaciones espontáneas.

Durante el S.XX, se produjeron diversas identificaciones y clasificaciones de levaduras, debidas a autores como Lodder y Kreger Von Rij (1952), Lodder (1970), Kreger Von Rij (1984), Kurtzman y Fell (1998), en sus respectivas ediciones de “The Yeasts. A taxonomic study”. Otros como Barnett *et al.* (1983,1990,2000) en la obra “Yeast: Characteristics and identification”, en las cuales identificaron, agruparon y separaron diferentes levaduras, eculizándose con diferentes vendimias o con vinos, mediante la aplicación del criterio de que las levaduras son identificadas como hongos unicelulares microscópicos que se reproducen por gemación o bipartición, constituyendo un grupo taxonómico complejo y heterogéneo.

Los primeros métodos de identificación y caracterización de levaduras, se basaron en criterios morfológicos, como la forma y tamaño de las células, fisiológicos como la producción de esporas, capacidad de fermentación, asimilación de azúcares, asimilación de nitratos, necesidades vitamínicas o la resistencia a la cicloheximida (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Sin embargo, estos métodos no son útiles en la clasificación de levaduras vínicas, debido a la gran variabilidad intraespecífica y a la dependencia del estado fisiológico de la levadura.

Más adelante, se han utilizado técnicas bioquímicas más avanzadas como la electroforesis de proteínas y el análisis de los patrones de isoenzimas, pero ambas son dependientes del estado fisiológico de las levaduras.

También se han utilizado 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.

Desde los años 80 del S.XX, el avance de la genética y de las técnicas de biología molecular, han permitido utilizar diversas técnicas de análisis del ADN como pueden ser:

- Similitud en la composición de bases del ADN (%mol G+C).
- Porcentaje de homología ADN-ADN.
- Análisis de restricción del ADN genómico o mitocondrial (RFLP).
- Análisis de cariotipos cromosómicos por electroforesis de campo pulsado.
- Análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la ampliación al azar de ADN polimórfico.
- Amplificación de secuencias del genoma entre los elementos  $\delta$  o elementos TY.
- Amplificación de microsatélites o secuencias similares repetidas en ADN genómico.
- Amplificación y posterior restricción enzimática de las zonas ITS1-5.8S-ITS4 del ADN ribosómico.

Actualmente las técnicas para caracterizar e identificar levaduras vínicas han evolucionado a técnicas de biología molecular, independientes del estado fisiológico. Estas técnicas están basadas en el estudio del ADN y ARN, han probado ser adecuadas en el caso de las levaduras vínicas, debido a su rápida aplicación y fiabilidad, que permite garantizar el análisis de poblaciones durante el curso de una fermentación alcohólica.

Con el objetivo de realizar un análisis exhaustivo de la población de levaduras en las distintas etapas de la fermentación alcohólica, utilizaremos dos técnicas de identificación de levaduras. Son técnicas recomendadas por la OIV (Organización internacional de la vid y el vino), para el estudio de las levaduras vínicas. La primera técnica nos permite la diferenciación e identificación a nivel de género y especie, y la segunda nos permite diferenciar e identificar a nivel de cepa.

La primera técnica consiste en la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR y RFLP) del ADN ribosómico. Los genes ribosomales 18S, 5.8S y 26S se agrupan en tándem formando unidades de transcripción, en estas unidades de transcripción, existen espacios internos (ITS 1 e ITS 2) que flanquean el gen 5.8S. Estas regiones ITS, 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 estas técnicas se lleva a cabo mediante PCR-RFLP.

En primer lugar se amplifican los fragmentos específicos, utilizando cebadores o primers:

- Cebador ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')
- Cebador ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA GC-3')

Seguidamente se realiza una digestión con endonucleasas de restricción, en este caso enzima de restricción Hae III. La digestión genera fragmentos que más tarde se separan en función de su peso molecular en un gel de electroforesis, creando un patrón de bandas característico.

Una gran ventaja de esta técnica es que no requiere la purificación previa del ADN, 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.

La segunda técnica que utilizaremos es el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt de la levadura es una molécula entre 65 y 80 Kb y circular en la mayoría de las especies (Orberá Ratón 2004).

El alto índice de polimorfismo lo hace adecuado para la identificación de especies de levaduras, y también para analizar la variabilidad de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el vino. En 1992 A. Querol *et al.*, desarrollaron una técnica evitando tanto el uso de gradientes de cesio, como la purificación de las mitocondrias; y esto fue fundamental para el incremento de la rapidez y facilidad de la ejecución de las técnicas de identificación.

Esta técnica se basa en la diferencia en el contenido de los nucleótidos G-C-A-T entre el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADN nuclear. Por lo tanto en una digestión de ADN total, una enzima de restricción, tendrá un bajo número de puntos de corte en el ADNmt, lo que permitirá visualizarlo como bandas diferenciadas en un gel de electroforesis. Sin embargo, el ADN nuclear tiene un elevado número de puntos de corte para este tipo de enzimas, por lo que su digestión dará lugar a pequeños fragmentos, indetectables en un gel de electroforesis.

Como aspecto importante que se debe tener en cuenta, es que los patrones de bandas que aparecen en el gel de electroforesis dependen del enzima de restricción 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 no conocidas, los enzimas más adecuados son Hinf I y Rsa I (Resolución OIV-OENO 408-2011).

En este caso el enzima utilizado es Hinf I, ya que se dispone de una base de datos mayor, y es la más utilizada en la mayoría de las publicaciones. Debido a la facilidad de ejecución es una técnica que se ha utilizado en numerosas ocasiones para la identificación de levaduras vínicas y está recomendada por la OIV para la identificación de levaduras a nivel de cepa.

En este trabajo de fin de grado se aplican las dos técnicas anteriormente mencionadas, reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR RFLP) del ADN ribosómico y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial, con el objetivo de identificar y caracterizar las levaduras que intervienen en un proceso fermentativo realizado en 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.

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.

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 la fermentación alcohólica) son las más sensibles. Por lo cual en principio en nuestros aislados no aparecerán levaduras de estos tipos.

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

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Por la gran importancia de las cepas de levadura en la composición del vino y en sus características organolépticas, resulta de gran interés poder identificar la sucesión de poblaciones de levaduras a lo largo de la vinificación de fermentaciones espontáneas.

#### **4. OBJETIVOS.**

El objetivo de este trabajo fin de grado es la identificación, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, de la dinámica de poblaciones de levaduras en un proceso de vinificación con fermentación espontánea, desarrollado a partir de uvas de la variedad verdejo, procedentes de una parcela adscrita a la Denominación de Origen Rueda en la localidad de La Seca (Valladolid).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### 5.1. AISLADOS DE LEVADURAS.

El aislamiento de levaduras se realiza mediante siembras en masa de mosto, con distintas diluciones, en medio de cultivo agar-extracto de malta. Las diluciones del mosto fueron de 1/10 hasta 1/10<sup>7</sup>. Junto con el agar-extracto de malta se añadió benomilo, que es un fungicida, para evitar el desarrollo de mohos en los cultivos, importante sobre todo en las primeras etapas del proceso de vinificación, 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 en tubos de ensayo 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. En este trabajo se parte de 51 levaduras aisladas de tres diferentes momentos del proceso fermentativo espontáneo.

En la tabla 1 se recogen los puntos de muestreo, el número de aislados obtenidos en cada uno de ellos y su designación. Estos aislados forman parte de los resultados obtenidos por Toquero (2011) en el desarrollo del proyecto “Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de variedad verdejo en la D.O. Rueda”. La toma de muestras en bodega durante el proceso de vinificación realizado mediante fermentación espontánea. La uva de variedad Verdejo recolectada procede de una única parcela (Parcela 1) de orientación sur, localizada en la D.O. Rueda (Toquero, 2011). También se analizaron dos cepas control pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (F3 y F5), cedidas por la Dra. Rodríguez-Cousiño (Universidad de Salamanca). El análisis mediante RFLP-ADNmt de las mismas ha sido publicado por Esteban & Rodríguez-Cousiño (2008).

La colección de aislados de levaduras se conserva a 4°C, siendo refrescada periódicamente, mediante pases en agar extracto de malta (Agar 3% (p/v)), Extracto de malta 13% (p/v)), en forma de pico de flauta (Requejo, 2014).

El inicio de este trabajo fue la realización de un pase de los aislados objeto de estudio, con el objetivo de partir de cultivos frescos, incubándolos a 25°C, durante 3-5 días, en función del desarrollo de los mismos.

Punto de muestreo	Nº de Aislados	Aislados
Mosto desfangado	17	1301-1317**
Fermentación tumultuosa	17	1501-1517
Final de fermentación	17	1601-1617

**Tabla 1:** Resumen de los aislados analizados en este trabajo

\*\* El aislado 1313 no creció en los pases en agar extracto de malta inoculados a partir de los cultivos de colección.

## 5.2. REACTIVOS.

A continuación se indican los reactivos utilizados refiriendo la casa comercial que los suministró.

- Extracto de malta de OXOID.
- Agar, dextrosa y bacto peptona de DIFCO.
- Benomilo de SIGMA-ALDRICH.
- Enzima zimoliasa 20T (20,600 U/G) de SEIKAGAKU BIOBUSINESS.
- Solución de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M, de tris-HCl 1M PH 7.5 y solución de dodecilsulfato (SDS) al 20% de FISHER SCIENTIFIC.
- Etanol absoluto para biología molecular y acetato potásico de PANREAC.
- Isopropanol puro para biología molecular de SIGMA-ALDRICH.
- Ribonucleasa (ARNasa) pancreática A bovina y enzimas de restricción Hinf I (50U/μl) y HaeIII (10U/μl) de PROMEGA.
- Kit comercial de PCR de ADN polimerasa GoTaq de PROMEGA.
- SimplySafe de EURx.
- Primers ITS 1 e ITS 4 de SIGMA-ALDRICH.
- Agarosa SIGMA-ALDRICH.
- Tampón de carga de muestras de PROMEGA.
- Marcadores de peso molecular 100 pb de BIOTOOLS y 1Kb THERMO SCIENTIFIC.
- Librería de levaduras en medio agar-extracto de malta conservadas en cámara frigoríficas a 4°C.
- Asas de siembra de FISHER SCIENTIFIC.
- Cubetas de electroforesis de BIO-RAD.
- Instrumentos de análisis y documentación de geles Gel Doc de BIO-RAD.

### 5.3 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

#### Medio agar extracto de malta en pico de flauta.

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

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Agar	3%
Extracto de malta	13%
Agua destilada	Hasta completar el volumen

La mezcla se lleva hasta ebullición en el microondas y se agita para que la suspensión se disuelva completamente. Se introducen 6 ml de medio en tubos de ensayo que se esterilizan en el autoclave (30 min a 121°C y 1 atm).

Una vez esterilizados, los tubos se inclinan en un ángulo de 15°C, para que el agar solidifique a temperatura ambiente, formando así un pico de flauta.

#### Medio nutritivo líquido YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose).

El medio YEPD es un medio líquido compuesto por:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Dextrosa	20%
Extracto de levadura	20%
Bacto peptona	20%
Agua destilada	Hasta completar volumen

La mezcla se calienta en el microondas hasta el punto de ebullición momento en el que se retira, se agita para conseguir una homogénea disolución. En cada tubo de ensayo se añaden 2.5 ml del medio y se esterilizan en el autoclave (30 min a 121°C y 1 atm), y se mantiene en cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su utilización.

### 5.4. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACION DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Para la preparación de las siguientes soluciones contamos con soluciones madre de EDTA 0.5M y Tris-HCl 1M y agua destilada purificada, todas esta soluciones son de grado de Biología molecular, que no cuenta con ninguna actividad detectable de ADNasa o ARNasa.

#### Solución 1M Sorbitol, 0.1M EDTA.

Para la preparación de 1 litro de solución 1M Sorbitol 0.1M EDTA; se disuelven en primer lugar 182.7g de sorbitol en 700 ml de agua destilada. Para la esterilización de la disolución se utiliza el autoclave en un ciclo corto de 10 min a 121°C y 1 atm, para evitar la caramelización del sorbitol que es un alcohol polihídrico de azúcar. A

continuación se deja enfriar a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar y se añaden a la solución 200 ml de EDTA 0.5M y agua destilada hasta completar el volumen final de 1L.

#### **Soluciones 50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA y 10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA.**

Para la preparaciones de estas soluciones se partió de las soluciones madres 0.5M EDTA y 1M Tris-HCl ya esterilizadas, y se realizaron todas las operaciones dentro de una campana de flujo laminar y siempre utilizando material estéril.

#### **Solución de acetato potásico 5M.**

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

COMPONENTE	CONCENTRCIÓN
Acetato potásico	492.5g/l
Agua destilada estéril	Hasta completar el volumen

#### **Solución SDS 10%.**

La solución SDS 10% se obtiene diluyendo dos veces en agua la solución comercial de grado biología molecular de FISHER SCIENTIFIC.

### **5.5. SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE ADN 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 destilada de la solución concentrada de TAE 50X

#### **Gel de Agarosa para electroforesis.**

Partimos de un buffer TAE 1X que se ha preparado anteriormente. En el TAE disolvemos agarosa a una concentración de 0.8 g, 1 g ó 1.5 g por cada 100 ml de tampón, dependiendo del tamaño de poro que queremos conseguir en el gel de agarosa. En nuestro caso el tamaño de gel de agarosa se forma con 120-130 ml de tampón. Pesamos la agarosa y la disolvemos en tampón TAE calentando en el microondas y agitando. Es importante que el líquido resultante esté perfectamente transparente, ya que si la agarosa no ha sido correctamente disuelta, el tamaño de poro no será el adecuado además de que el ADN no correrá de una forma adecuada.

Una vez la disolución ha llegado al punto de ebullición se retira rápidamente y se agita para una correcta disolución de la agarosa. Posteriormente se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C, antes de añadir SimplySafe, ya que éste es termosensible, a una concentración de 2.6µl/60 ml de gel. El SimplySafe es un agente intercalante, que se inserta entre las bases de una molécula de ADN y permite la visualización del ADN cuando es expuesto a luz ultravioleta.

Una vez añadido el SimplySafe, el gel se vierte sobre una cubeta con el peine que permitirá formar los pocillos, en este paso es importante que no se creen burbujas antes de que el gel solidifique, para que el ADN corra bien y se pueda visualizar correctamente.

## 5.6. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ZIMOLIASA.

Partimos de zimoliasa liofilizada 20T de la casa comercial SEIKAGAKU BIOBUSINESS, con actividad 1,3-glucano hidrolasa de 20.000 U/g. Necesitamos una concentración de 400 U/ml, por lo cual debemos diluir el enzima en agua destilada esterilizada en la siguiente proporción:

COMPONENTE	CONCENTRCIÓN
Zimoliasa 20T	0.02 g/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, siempre en condiciones de esterilidad, campana de flujo laminar y material estéril. Una vez tenemos las alícuotas las mantenemos congeladas a -20°C.

## MÉTODOS.

Los métodos basados en la biología molecular se han convertido en herramientas útiles para la identificación y caracterización de las levaduras vínicas, ya que solventan en gran medida los inconvenientes de los métodos convencionales. De forma habitual, la mayor parte de los trabajos realizados se centran en el estudio de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, más concretamente en la especie *S. cerevisiae*, dada su vital importancia en el proceso de fermentación alcohólica.

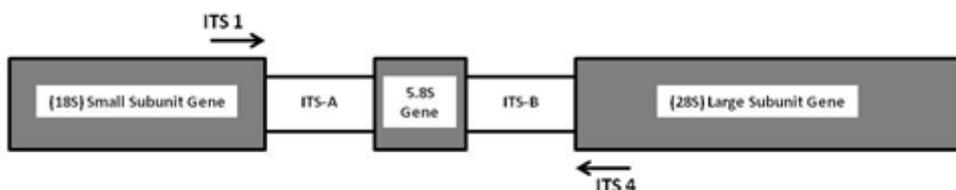
Se pueden distinguir dos tipos de métodos: los métodos de identificación de levaduras de vinificación a nivel de especie y los métodos de identificación o diferenciación a nivel de cepa. Los primeros permiten la determinación del género, e incluso de la especie; y los segundos permiten la caracterización de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* que pueden intervenir en una etapa concreta durante el proceso de vinificación (Esteve- Zarzoso *et al.*, 1999).

A continuación se exponen en más detalle los dos métodos utilizados en este trabajo que se basan en el Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Esta técnica requiere la digestión de material genético procedente de un sitio concreto del genoma de las levaduras, mediante el uso de endonucleasas de restricción. Estas enzimas se caracterizan por reconocer una secuencia de ADN específica, la cual determina un punto de corte como resultado de la actividad enzimática. El patrón de corte de cada enzima dará lugar a una serie de fragmentos de ADN de diferente longitud. Este patrón de corte depende de la secuencia nucleotídica sobre la que las enzimas actúan, la cual es específica del organismo objeto de estudio.

Los fragmentos producto de la digestión se separan y visualizan mediante un gel de agarosa, que en virtud de lo expuesto, revela un perfil de bandas, que es único para un género, una especie, una cepa o un aislado, en función de la finalidad de la técnica. Además, el estudio de la similitud entre perfiles permite establecer correlaciones entre los mismos.

### 5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ADN ribosómico.

Primer	Sequence 5' → 3'
ITS 1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC



Partiendo de ADN total, o directamente del cultivo, se amplifica la región ITS- 5.8S empleando los primers ITS 1 con secuencia (5´- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3´) e ITS 4 con secuencia (5´- TCC TCC GCT TGA TAT GC-3´).

Se prepara un mastermix con volumen final por reacción de 50µl. La composición de la mastermix es la siguiente:

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón 5x	10 µL
25mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10mM dNTP	1 µl
Primers mix (ITS1 & ITS4)	2.5 µl
Agua destilada estéril	33 µl

Por cada reacción se añaden 49.5 µl al microtubo de PCR y se añaden 0.5 µl de enzima GO Taq polimerasa. Cada muestra se resuspende directamente del cultivo en la mezcla anterior, sin necesidad de extracción previa de ADN.

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

- 10 minutos de desnaturalización a 95°C
- 35 ciclos sucesivos de 3 fases cada uno:
  - 1 minuto de desnaturalización a 94 °C
  - 2 minutos de anillamiento a 55.5°C
  - 2 minutos de elongación de la cadena a 72°C
- Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

El producto final amplificado, se carga en un gel de agarosa al 2% en presencia de intercalante (SimplySafe) al 0.005%; no necesita tampón de carga, porque el tampón de reacción de la PCR actúa también como tampón de carga. En la cubeta el ADN es sometido a una corriente eléctrica con voltaje constante. Debido a la carga negativa del ADN, este migra de polo negativo al polo positivo, la velocidad de migración depende del tamaño de los fragmentos del ADN amplificado y del voltaje aplicado, en este caso la fuente se configura a 90V durante 45 min.

El segmento amplificado esperado para el género *Saccharomyces* de 880 pb.

Seguidamente, necesitamos obtener el RFLP mediante digestión de los productos de la PCR con el enzima de restricción del que se conoce un patrón característico para cada especie. En este caso para *Saccharomyces cerevisiae*, utilizamos el enzima de restricción Hae III que debe generar fragmentos de 320+230+180+150 pb.

La digestión se realiza de la siguiente manera:

COMPONENTE	VOLUMEN
ADN obtenido por PCR	5 µl
BSA (1µg/µl)	1 µl
Tampón de enzima 10X	1 µl
Agua destilada estéril	2.5 µl
Enzima Hae III (10U/µl)	0.5 µl

Se incuba la digestión durante 2 horas a 37°C, tras la digestión se añaden a las muestras 2µl de tampón de carga 6X y se introducen en los pocillos de gel de agarosa al 2% en presencia de SimplySafe al 0.005%. En un extremo del gel añadimos el patrón de pesos moleculares de 100 pb. El patrón permite conocer el peso de las bandas por comparación.

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

## 5.8. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DE ADN MITOCONDRIAL.

El análisis de restricción del ADN mitocondrial demuestra ser el método más adecuado para establecer diferencias entre cepas de *S. cerevisiae* (López *et al.*, 2001). El ADN mitocondrial de *S. cerevisiae* es una molécula circular de 65-80 kb. Su análisis mediante RFLP permite la caracterización de diferentes cepas, basándose en el alto grado de polimorfismo que presenta, y en la estabilidad de la misma durante la multiplicación vegetativa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Esta técnica requiere la obtención previa del ADN total de la levadura, el cual incluye el ADN nuclear y el mitocondrial, a partir de un cultivo puro del aislado (Querol *et al.*, 1992; Requejo, 2014). Para la obtención de ADN total partimos de 1.5 ml de un cultivo fresco de levaduras en que ha crecido de la noche a la mañana en un medio líquido

YEPD a 28°C. Se recuperan las levaduras mediante centrifugación (13200 rpm durante 2 minutos) y se lavan dos veces en agua estéril. Se añaden 0,5ml de la solución 1M sorbitol, 0,1M EDTA. Se resuspenden las células mediante agitación en vórtex y se añaden 15 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 ADN se conserva intacto. La muestra se incuba a 37°C durante 30 minutos. Cuando la incubación termina, se recuperan los protoplastos mediante centrifugación (5000 rpm durante 5 min) y se resuspenden en 0.5 ml de una disolución 50mM Tris-HCl pH 7.5, 20mM EDTA. A continuación se añaden 13µl de SDS 10%. Con estas dos soluciones, terminamos de lisar las paredes de los protoplastos y la membrana citoplasmática, liberando así el ADN mitocondrial y nuclear. Para favorecer la lisis se mantiene la muestra a 65°C durante 15 minutos. Una vez terminada la lisis se provoca la precipitación de proteínas y restos de la célula añadiendo 0.2 ml de acetato potásico 5 M y baja temperatura. Primero se incuba en hielo durante 10 min y tras centrifugar a 4°C a 13200 rpm durante 10 min, se incuban las muestras a -20°C durante 5 min. Se vuelven a centrifugar a 4°C a 13200 rpm durante 5 min y se recoge el sobrenadante que contiene el ADN nuclear y mitocondrial.

El sobrenadante se traspara a un microtubo que contiene el mismo volumen de isopropanol (550 µl). El alcohol provoca la precipitación de los ácido nucleicos. Mezclamos por inversión y automáticamente observamos la formación de la hebra de ADN. La muestra se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 13400 rpm y el sobrenadante se descarta. El ADN se lava con etanol al 70% para eliminar las sales. Finalmente, la muestra se resuspende en solución 10mM Tris-HCl pH7.5 y 1mM EDTA donde se mantendrá congelado a -20°C hasta su uso.

Posteriormente, el ADN total es sometido a una digestión enzimática, y el producto de la digestión es separado mediante electroforesis en gel de agarosa. El fundamento de esta técnica reside en las diferentes proporciones G+C y A+T entre el ADN mitocondrial y nuclear. La molécula de ADN mitocondrial se caracteriza por un elevado contenido en A+T (75%), pero además, presenta unas 200 zonas ricas en G+C (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). La digestión del ADN total utilizando endonucleasas de restricción del tipo GCAT, que no reconocen ni secuencias ricas en GC ni secuencias ricas en AT, da lugar a una restricción diferencial entre el ADN mitocondrial y nuclear. De esta forma, el ADN nuclear es altamente digerido, debido al elevado número de puntos de corte que presenta; dando lugar a fragmentos de restricción de pequeño tamaño que no pueden ser resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, la digestión del ADN mitocondrial da lugar a fragmentos de longitud variable, en un número no muy abundante, cuya separación mediante electroforesis en geles de agarosa determina patrones de bandas que definen el perfil específico de una cepa.

Para el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial se digiere el ADN total con el enzima de restricción Hinf I. Conociendo la concentración en la que se encuentra el enzima comercial (50 U/µl) y conociendo la cantidad de ADN que queremos digerir podemos calcular fácilmente la dosis a utilizar.

Generalmente se añade exceso de enzima respecto de la cantidad de ADN, de esta manera se asegura una digestión correcta. En nuestro caso digerimos 40 µg de ADN total y 50U (1 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
Muestras de ADN	40 µg
Enzima Hinf I (50U/µl)	1 µl
Buffer 10X	2 µl
Agua destilada y esterilizada	Hasta completar 20 µl

La digestión se realiza en microtubos a 37°C durante toda la noche (aproximadamente 16 h). Tras la digestión, las muestras se tratan con ARNasa para eliminar el ARN obtenido en la extracción de ácidos nucleicos. El ARN se digirió con ARNasa pancreática a una concentración final de 100 µg/ml e incubamos a 37°C durante 45 minutos, posteriormente 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. Las condiciones de electroforesis son 60V durante 3 horas, seguidamente el gel se introduce en una solución para teñirlo con intercalante, que permitirá ver el patrón de bandas bajo luz ultra violeta. La solución de tinción está compuesta por 450 ml de agua destilada, 50 ml de NaCl 1 M y 50 µl de intercalante. El gel se sumerge durante 45 minutos, posteriormente se destiñe en un baño de agua destilada, esta operación mejora la visualización del patrón de bandas, lo que nos permite identificar mejor los diferentes tipos de levaduras.

Para la visualización de las bandas de ADN 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).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS PRESENTES EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE VINIFICACIÓN

Se han identificado 11 patrones de restricción de ADN mitocondrial diferentes, en el total de 50 aislados analizados, lo que sugiere la presencia de, al menos, 11 cepas de levaduras diferentes a lo largo de la parte del proceso de vinificación seleccionado para este trabajo (imagen 1). El estudio comparativo de los diferentes patrones se plantea primero para cada uno de los puntos de muestreo analizados, designando cada perfil encontrado con un código numérico que hace referencia al punto de muestreo y una letra correlativa, en función de los patrones encontrados en cada punto. Después, se han realizado comparaciones entre los patrones localizados en las distintas fases de muestreo.

El inicio y final de fermentación en bodega presentan la mayor diversidad de patrones, la cual no se mantiene durante la fermentación tumultuosa.

En la etapa del proceso de mosto desfangado, serie 1300-1317, se han identificado cinco patrones de restricción diferentes (13A, 13B, 13C, 13D, 13E), perteneciendo respectivamente 11,1,1,2,1 aislados a cada patrón de restricción. En la imagen 1 aparece el patrón 13F, que se determina por comparación que en realidad es el mismo que el patrón 13A.

El patrón predominante es el 13A con 11 aislados lo que representa el 68.75% de los aislados de la serie. También cabe destacar que hay tres patrones exclusivos de esta primera etapa de la vinificación, que son los patrones 13B (6.25%), 13C (6.25%) y 13E (6.25%), y que el patrón 13D (12.5%) es el mismo patrón que el 15A, que es el mayoritario en la fermentación tumultuosa.

En la etapa del proceso de vinificación fermentación tumultuosa, serie 1500-1517, se han identificado cuatro patrones de restricción diferentes (15A, 15B, 15C, 15D), perteneciendo respectivamente 9, 2, 5, 1 aislados a cada patrón de restricción.

El patrón de restricción predominante es el 15A con el 53% de los aislados, el patrón 15B representa el 11.75% de los aislados de esta etapa, hay que indicar que el patrón 15B es el mismo que el patrón 13A, mayoritario en mosto desfangado. Los otros dos patrones son el 15C (29.4%) y el patrón 15D (5.88%).

En la etapa del proceso fermentativo, final de fermentación, serie 1600-1617, se han identificado cinco patrones de restricción diferentes (16A, 16B, 16C, 16D, 16E), perteneciendo respectivamente 4, 8, 2, 1, 2 aislados a cada patrón de restricción.

El patrón de restricción mayoritario en el final de fermentación es el 16B con el 47% de los aislados de esta etapa de la fermentación, y que es exclusivo de esta fase. Son también patrones exclusivos de esta fase del proceso de vinificación el patrón 16A (23.53%), 16D (5.88%) y 16E (11.75%). Por último decir que el patrón 16C (11.75%) de los aislados en esta etapa es el único patrón de restricción que se conserva durante todo el proceso fermentativo.

Como he comentado anteriormente varios de los patrones indicados para cada punto de muestreo no son exclusivos del mismo, y se repiten en otros puntos de muestreo. El patrón 13A, es igual que el patrón 15B y que el patrón 16C, por lo que este patrón de restricción pertenece a un tipo de levadura que se mantiene desde el mosto desfogado hasta el final de la fermentación. También el patrón 13D es el mismo que el patrón de restricción 15A que es el patrón mayoritario durante la fermentación tumultuosa.

También se analizaron dos cepas control pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (F3 y F5), cedidas por la Dra. Rodríguez-Cousiño (Universidad de Salamanca). El análisis mediante RFLP-ADN mitocondrial de las mismas ha sido publicado por Esteban & Rodríguez-Cousiño (2008). El análisis de las muestras control *S. cerevisiae* F3 y F5, en las mismas condiciones que el resto de los aislados, y la obtención de unos patrones de restricción de ADN mitocondrial iguales a los publicados por Esteban & Rodríguez-Cousiño (2008), permitió confirmar el correcto desarrollo del análisis de los aislados mediante RFLP-ADN mitocondrial, imagen 2.

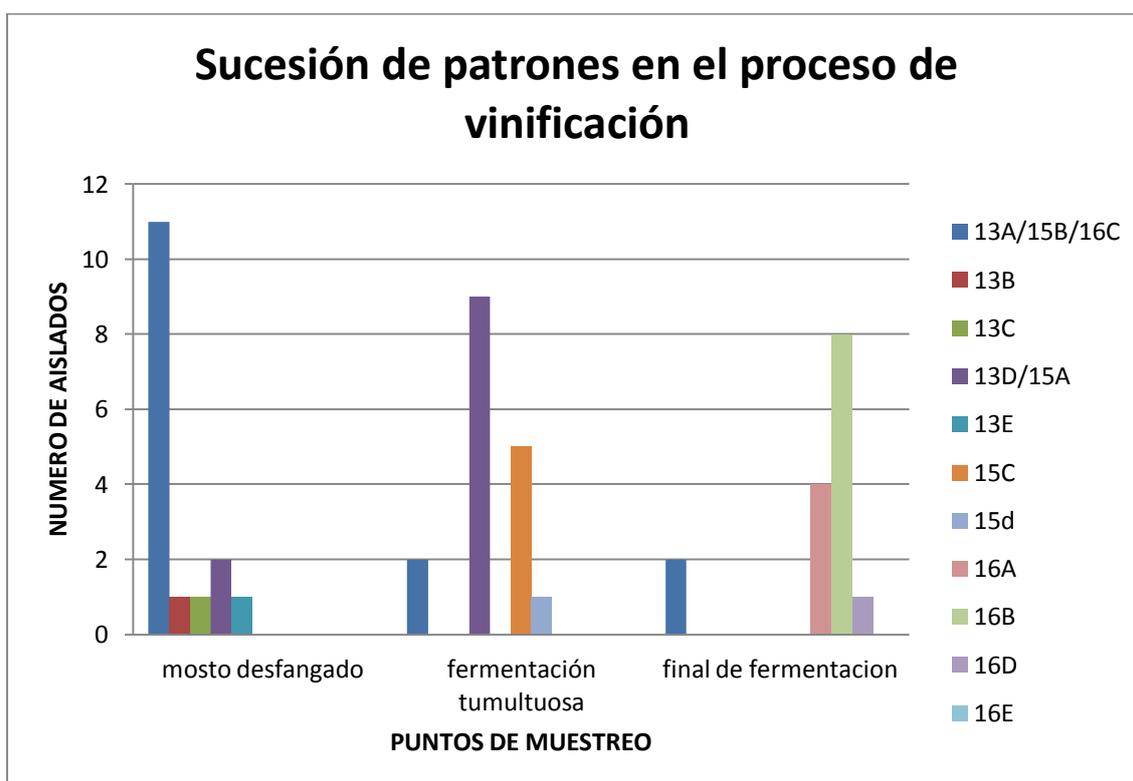
La agrupación observada en relación a la sucesión y repetibilidad de patrones en los diferentes puntos de muestreo pone de manifiesto que los aislados identificados en las etapas de fermentación tumultuosa y final de fermentación no se encuentran en las primeras fases del proceso de vinificación (mosto desfogado), o se encuentran presentes en unas proporciones tales, que no son susceptibles de ser aislados. Exceptuando los patrones 13A, 15B y 16C, que se repiten durante todo el proceso fermentativo aunque no en la misma proporción.

Patrones restricción ADNmt	Aislados
13A	1301, 1304, 1305, 1306, 1308, 1309, 1312, 1314, 1315, 1316, 1317.
13B	1302.
13C	1303.
13D	1307, 1311.
13E	1310.
15A	1501, 1502, 1506, 1508, 1509, 1510, 1515, 1516, 1517.
15B	1503, 1513.
15C	1504, 1507, 1511, 1512, 1514.
15D	1505
16A	1602, 1604, 1606, 1611.
16B	1603, 1607, 1609, 1612, 1613, 1614, 1616, 1617.
16C	1605, 1608.
16D	1615.
16E	1601, 1610.

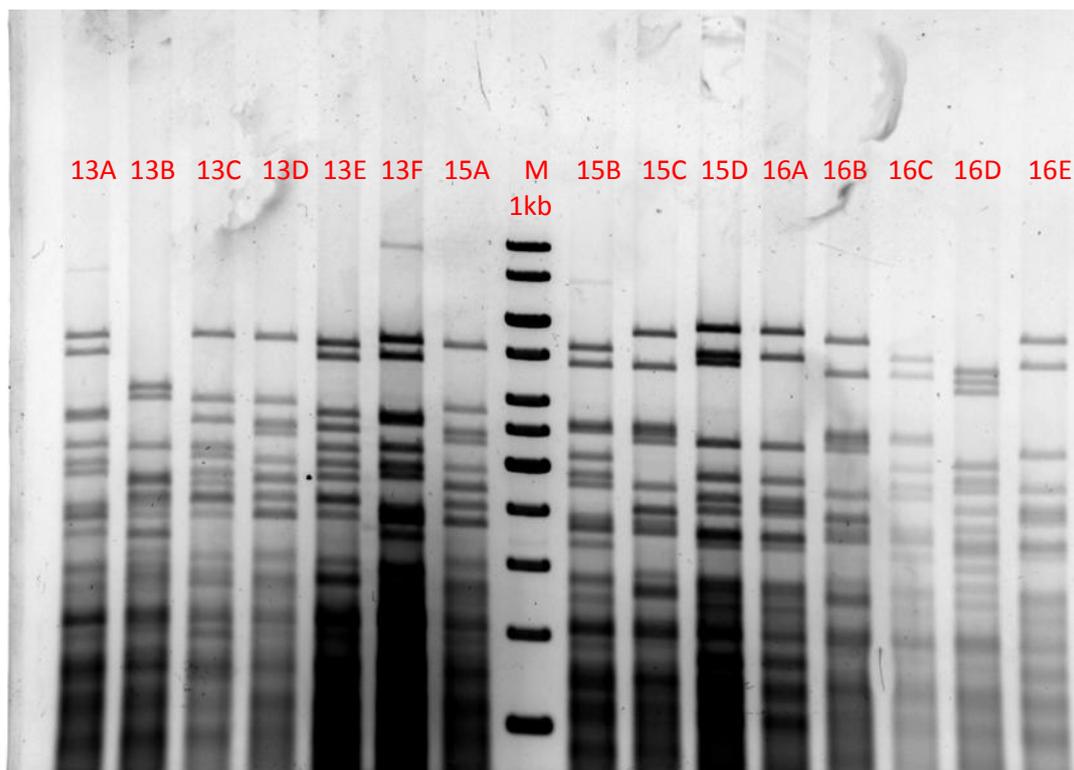
**Tabla 2:** Resumen de los patrones obtenidos y los aislados pertenecientes a cada patrón.

Punto de muestreo	Patrones de restricción	Coincidencias de patrones en distintos puntos de muestreo	Nº aislados en punto de muestreo	% dentro de punto de muestreo	% proceso fermentativo
Mosto desfangado	13A	15B y 16C	11	68.75%	30%
	13B		1	6.25%	2%
	13C		1	6.25%	2%
	13D	15A	2	12.50%	22%
	13E		1	6.25%	2%
Fermentación tumultuosa	15A	13D	9	52.94%	22%
	15B	13A y 16C	2	11.76%	30%
	15C		5	29.41%	10%
	15D		1	5.88%	2%
Final de fermentación	16A		4	23.52%	8%
	16B		8	47.05%	16%
	16C	15B y 13A	2	11.76%	30%
	16D		1	5.88%	2%
	16E		2	11.76%	4%

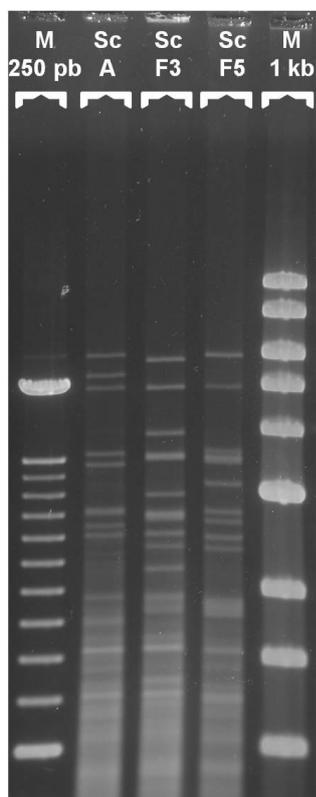
**Tabla 3:** Resumen de los aislados analizados y aislados pertenecientes a cada patrón con porcentajes.



**Figura 1:** Diagrama de barras con la sucesión de patrones en el proceso fermentativo y el número de aislados perteneciente a cada patrón.



**Imagen 1:** Patrones de restricción del ADN mitocondrial de los diferentes aislados. M :Marcador de peso molecular de 1Kb (Thermo Fisher)



**Imagen 2:** Patrones de restricción del ADN mitocondrial de un aislados de *S. cerevisiae* (A), y de los controles *S. cerevisiae* F3 y F5. M: Marcadores de peso molecular de 250 pb (Invitrogen) y de 1 kb (Thermo Fisher).

En paralelo a estos estudios, realizamos análisis moleculares mediante reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de ADN ribosómico. Está ampliamente demostrado que el complejo formado por regiones ITS y el gen 5,8S ARN ribosómico 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 ADN) determinar si las cepas de estudio son o no *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionando una selección previa que nos permitirá comparar más adelante a través del RFLP de ADN mitocondrial la identificación de cepas dentro de esta especie.

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

Se han realizado geles de electroforesis tanto de ADN total sin digerir como de ADN digerido con el enzima Hae III.

Como se ha comentado en la sección de materiales, en el análisis no se ha incluido al aislado 1313 por ausencia de crecimiento en los pases en agar extracto de malta inoculados a partir de los cultivos de la colección.

Esta técnica tiene dos partes: en el primer paso se parte de ADN total o del cultivo del aislado, después se realiza una PCR y obtenemos un fragmento característico de 880 pb. La aparición de este producto indica que la levadura aislada pertenece al género *Saccharomyces*.

El segundo paso consiste en obtener los fragmentos de restricción (RFLP), mediante la digestión del producto de la PCR con el enzima de restricción Hae III, obteniendo un patrón de bandas característico para cada especie. *Saccharomyces cerevisiae* tiene un patrón de banda característico de 320+230+180+150 pb (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

En las imágenes 3,4 y 5 aparecen los dos resultados juntos, primero la amplificación mediante PCR obteniendo un solo fragmento y seguido el resultado de la digestión con el enzima Hae III con las diferentes bandas.

Como resultado del análisis de 104 aislados de *S. cerevisiae*, Segura *et al.* (2010) definieron el patrón 310 + 232 + 173 + 129, y compararon este patrón con el patrón promedio 317 + 226 + 175 + 139 calculado a partir de 9 patrones publicados por otros autores. Dada la variabilidad de valores encontrada, estimaron un parámetro de error de 20 pb, para poder hacer las comparaciones de los patrones objeto de estudio con los patrones publicados. Teniendo en cuenta estas indicaciones y las muestras control *S. cerevisiae* F3 y F5 analizadas en las mismas condiciones que el resto de los aislados, se identificaron los aislados pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

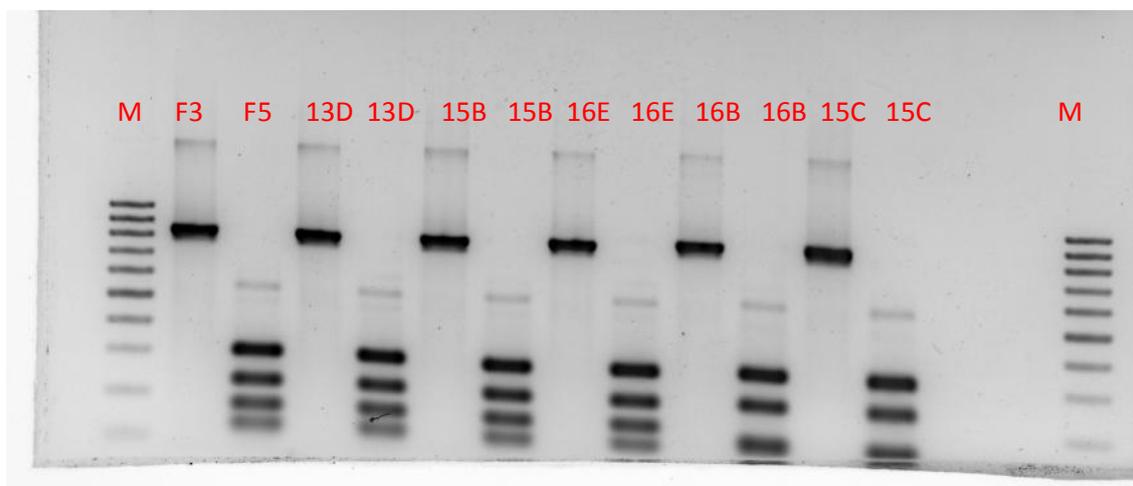
Cabe destacar, que los patrones 15D y 16A, coinciden con los valores de la primera, segunda y última bandas del patrón publicado para *S. cerevisiae*, aunque carece de la tercera banda del mismo (180 pb). Este patrón de restricción fue publicado

recientemente por Tofalo *et al.* (2014) en el desarrollo de un estudio de biodiversidad de levaduras vínicas de un vino producido en la provincia de Teramo (Italia). En este trabajo se llevó a cabo la identificación, mediante PCR-RFLP de la región ITS-5.8S de 430 aislados obtenidos en el final de fermentación.

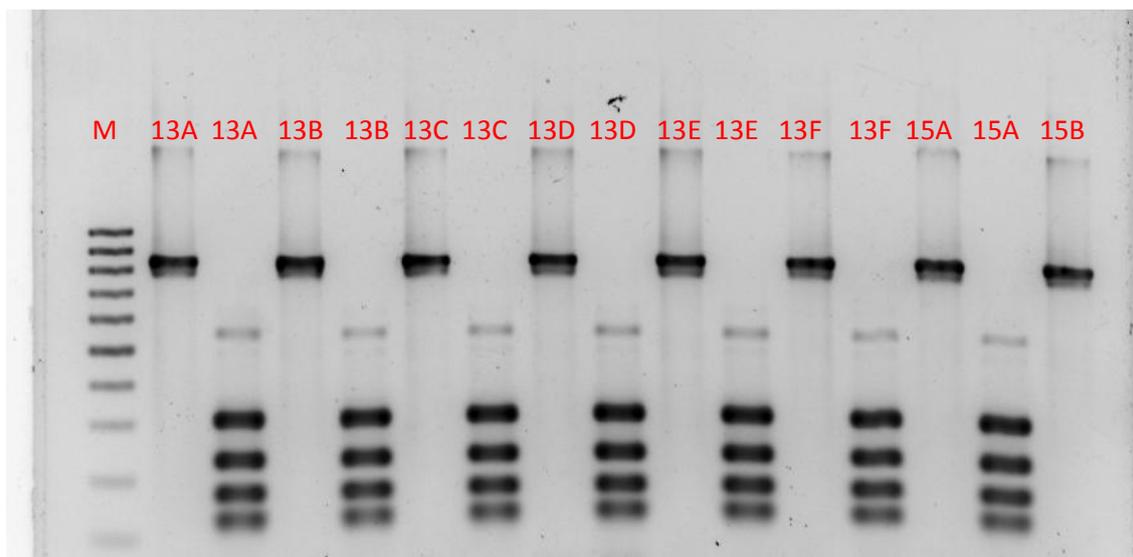
El 3,5% de los aislados analizados, identificados como *S. cerevisiae*, presentaron un nuevo patrón de bandas resultado de las digestiones realizadas con el enzima Hae III. La secuenciación de la región ITS-5.8S de dos aislados y su comparación con la misma secuencia de otro aislado que se ajustaba el patrón característico de *S. cerevisiae*, permitió observar una inserción de un nucleótido C en la posición 138 de la región ITS1. Esta mutación determina la inserción de un nuevo punto de corte para la enzima Hae III, que da lugar a una modificación del patrón de bandas conocido, el cual se transforma en 320 + 230 + 150 + 150 pb. En base a este reciente estudio, los aislados de las diferentes etapas que presentan este patrón de bandas son identificados como *S. cerevisiae*.

Por lo tanto podemos concluir que todos los patrones aislados pertenecen al género *S.cerevisiae*.

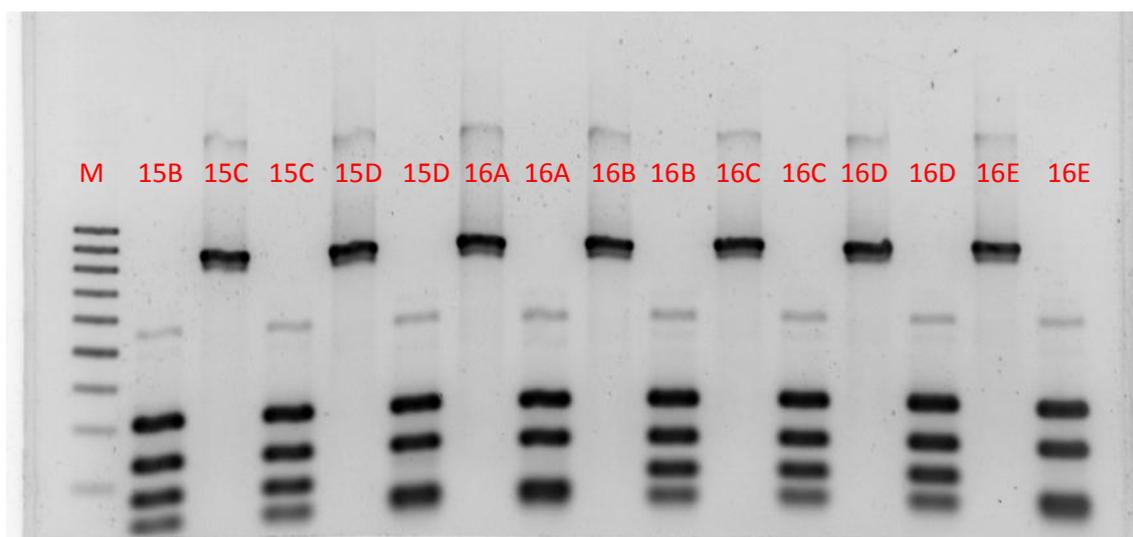
A continuación se exponen todos los geles, con la amplificación del ADN y con la digestión del ADN con el enzima Hae III.



**Imagen 3:** Patrones de bandas, con solo una banda producto de amplificación de ADN mediante PCR, y digestión con enzima Hae III, patrones de cuatro bandas característicos de S.c, F3 y F5 aislados de S.c. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools )



**Imagen 4:** Patrones de bandas, con solo una banda producto de amplificación de ADN mediante PCR, y digestión con enzima Hae III con bandas característico de S.c., M: marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools).



**Imagen 5:** Patrones de bandas, con solo una banda producto de amplificación de ADN mediante PCR, y digestión con enzima Hae III con bandas característico de S.c., M: marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools).

## 7. CONCLUSIONES

El análisis molecular de 50 aislados obtenidos a partir de 3 etapas del proceso de vinificación demuestra la presencia de 11 patrones de restricción de ADN mitocondrial diferentes, que ponen de manifiesto la participación de al menos 11 cepas de levaduras distintas en el proceso de vinificación.

La mayor diversidad de patrones se encuentra en la primera etapa mosto desfogado y en el final de fermentación; mientras que en la etapa de fermentación tumultuosa es donde encontramos la menor diversidad de patrones, destacando la dominancia de una única cepa con más del 50% de los aislados de esta etapa.

Es importante señalar que en la etapa de mosto desfogado no encontramos ningún aislado que no pertenezca al género *Saccharomyces cerevisiae*. Esto puede ser debido a que al mosto se le ha añadido metabisulfito potásico, y las cepas de levaduras no *Saccharomyces* son sensibles a la presencia de este compuesto.

En la etapa mosto desfogado encontramos un patrón dominante, el 13A, con el 68,75% de los aislados. Esto indica que esta cepa tiene un rápido crecimiento y capacidad de adaptación al medio. En las siguientes etapas del proceso fermentativo este patrón se encuentra en muy bajas proporciones, lo que indica que tiene poca tolerancia al etanol y a un medio de cultivo cada vez más tóxico para esta levadura.

En la fermentación tumultuosa los patrones de restricción 15A (53%) y 15C (29,4%) son las levaduras responsables de esta etapa. Estos dos patrones de restricción no aparecen en las siguientes etapas del proceso fermentativo, lo cual lleva a pensar que estas cepas tienen una menor resistencia al etanol y a un medio cada vez más pobre en azúcares fermentables.

En la etapa final de fermentación el patrón de restricción 15B es el mayoritario, con el 47% de los aislados. Que este patrón sea el que domina esta fase del proceso fermentativo indica alta capacidad de resistencia al alcohol.

Todas estas características anteriormente descritas se podrían probar haciendo microvinificaciones e inoculando estas cepas de levaduras para poder así corroborarlo.

Este trabajo es el inicio de un complejo estudio de levaduras vínicas, que comprende varios procesos de vinificación desarrollados a partir de uva recolectada en 5 parcelas diferentes, y en 3 vendimias sucesivas. Estos resultados deben ser confirmados con el análisis de nuevos aislados procedentes de procesos de vinificación realizados a partir de uva recolectada en otras parcelas diferentes durante la misma campaña; así como de aislados de uva recolectada en la misma parcela en campañas de años sucesivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, A., Matallana, E., & del Olmo, M. (2005). Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Microbiología del vino* (pp.19-56). Madrid: AMV EDICIONES.
- Esteban, R., & Rodríguez-Cousiño, N. (2008). 23S RNA-derived replicon as a 'molecular tag' for monitoring wine yeast strains. *Yeast*, 25, 359-369.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., & Querol, A. (2005). Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Microbiología del vino* (pp.148-184). Madrid: AMV EDICIONES.
- Fernández-Espinar, M. T., Llopis, S., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Molecular identification and characterization of wine yeasts. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Molecular wine microbiology* (pp. 111-140). New York: Elsevier Inc.
- Hidalgo P., J. Hidalgo (2011). Transformaciones microbianas. Levaduras, bacterias y virus. Capítulo VIII. 546-623.
- Ibáñez, C., Pérez-Torrado, R., Chiva, R., Guillamón, J. M., Barrio, E., & Querol, A. (2014). Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 129-135.
- Jemec, K. P., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., & Raspor, P. (2001). Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18, 247-259.
- Orberá Ratón T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 15-19.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), 2011. Résolution OIV-OENO 408-2011. Outils de biologie moléculaire pour l'identification de la levure de vinification *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres espèces de levures liées à la vinification. Assemblée Générale, Porto, le 24 juin.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain and characterization. *Systematic Applied Microbiology*, 15, 439-446.
- Requejo Frutos, B. (2014). Ecología de levaduras de la uva al vino. Métodos moleculares de tipado de levaduras. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (1998). *Tratado de Enología*. (1st ed.). Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de Enología*. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones. (1st ed.). Buenos Aires: Hemisferio Sur, (Capítulo 1).
- Rodríguez-Lerma, G. K., Gutiérrez-Moreno, K., Cárdenas-Manríquez, M., Botello-Álvarez, E., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., & Navarrete-Bolaños, J. L. (2010). Microbial ecology studies of spontaneous fermentation: starter culture selection for prickly pear wine production. *Journal of Food Science*, 76(6), M346-M352.

- Segura, G., Luis, E., Kirchmayr, M. R., Flores, B., Ericka, P., Gschaedler, M., & Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *E-Gnosis*, 8, 1-12.
- Tristezza M., Vertrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, Vittorio., Logrieco A., Mita, G., Grieco, F. (2012). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology*, 36(2): 335-42.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2014). Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12.
- Toquero González, B. (2011). Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de variedad Verdejo en la D. O. Rueda. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.