



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Titulación
Grado en Enología

***Identificación y Caracterización de
Microorganismos Alterantes del Vino en
Bodega: Revisión de Aplicaciones de las
Nuevas Técnicas Moleculares***

Alumno/a: Sandra Sanz Heras
Tutor/a: Elena Hidalgo Rodríguez

Julio de 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

- 2.1. SUCESIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL VINO
- 2.2. LAS ALTERACIONES DEL VINO Y SUS CAUSAS
- 2.3. RECURSOS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRECISA Y PRECOZ DE MICROORGANISMOS
- 2.4. JUSTIFICACIÓN

3. OBJETIVOS

4. METODOLOGÍA

- 4.1. RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA
- 4.2. LECTURA Y CLASIFICACIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA
- 4.3. REDACCIÓN DEL TEXTO

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1. TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ENOLÓGICA

- 5.1.1. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ANTERIORES AL DESARROLLO DE LA PCR
- 5.1.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DERIVADAS DE LA PCR

5.2. CASOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LOS VINOS

- 5.2.1. ALTERANTES DE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA O PERFIL SENSORIAL. CASO DE *BRETTANOMYCES/DEKKERA*
- 5.2.2. ALTERANTES DE LA SEGURIDAD SANITARIA DE LOS VINOS
 - a) ALTERANTES DE LA SEGURIDAD SANITARIA DE LOS VINOS MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS EN EL VINO
 - b) MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORAS DE MICOTOXINAS EN EL VINO
 - c) MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS IMPLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE CARBMATO DE ETILO EN EL VINO

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

7. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

Los microorganismos que se establecen en el viñedo, y especialmente en la superficie de la uva, posteriormente pasan a formar parte de la microbiota de la bodega y del mosto o del vino en sus distintas etapas de elaboración. Estos microorganismos, mediante sus actividades metabólicas, marcan las cualidades sensoriales del producto final, y en determinadas ocasiones, pueden modificarlas notablemente. Por un lado, pueden causar alteraciones en el perfil organoléptico del vino, y por otro lado pueden producir determinadas sustancias tóxicas, que alteran su calidad sanitaria. En ambos casos, el vino no es apto para su consumo.

La identificación microbiológica comúnmente se realiza mediante técnicas dependientes de cultivo, que se basan en la siembra previa de la muestra en medios de cultivo de enriquecimiento o en medios selectivos, con los cuales obtenemos colonias, de los microorganismos contenidos en la muestra. Seguidamente, hay que aislar. Una vez aislados, se procede a la caracterización de especies mediante pruebas bioquímicas y observación al microscopio. Sin embargo, la identificación por estos métodos presenta una serie de inconvenientes: por un lado, determinados microorganismos pueden estar en estado viable no cultivable (VNC), y, por otro, no permiten caracterizar a nivel intraespecífico, lo cual puede resultar muy relevante.

Por estos motivos, y gracias a los avances en biología molecular, se están desarrollando continuamente métodos de identificación basados en el estudio molecular del ADN, y que resultan independientes de cultivo y de alta precisión, también a nivel de cepa o de individuo. Gracias a estas técnicas podemos detectar de forma más precoz, precisa y sensible la presencia o ausencia de un tipo de microorganismo concreto o el total de todos los microorganismos contenidos en una muestra ambiental, en este caso, de una muestra de vino.

El presente trabajo, que sigue el modelo de revisión bibliográfica, se centra en la descripción de las nuevas tecnologías actualmente disponibles para la identificación y caracterización de microorganismos implicados en el deterioro de los vinos, mediante técnicas de biología molecular, fundamentalmente secuenciación de ADN y ARN y PCR y sus derivadas, y en él se analizan las posibilidades y las limitaciones de dichas técnicas a través del análisis de una serie de casos particulares.

2. INTRODUCCIÓN

Para llevar a cabo la identificación y caracterización de microorganismos alterantes de los vinos, debemos tener en cuenta una serie de antecedentes, que describimos a continuación.

2.1. SUCESIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL VINO

La fermentación vínica es un complejo ecosistema microbiano, en el que una sucesión de levaduras, bacterias lácticas, bacterias acéticas y hongos filamentosos, procedentes de la propia uva o del ambiente, tanto de campo, como de las superficies de la bodega, impulsan la transformación del mosto en vino mediante sus actividades metabólicas (Aranda *et al.*, 2005). En la Figura 1 se muestran la evolución y la variabilidad microbiana de las distintas especies durante las distintas etapas de elaboración de vinos (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975 y 2000; Davis *et al.*, 1986; Pardo *et al.*, 1992).

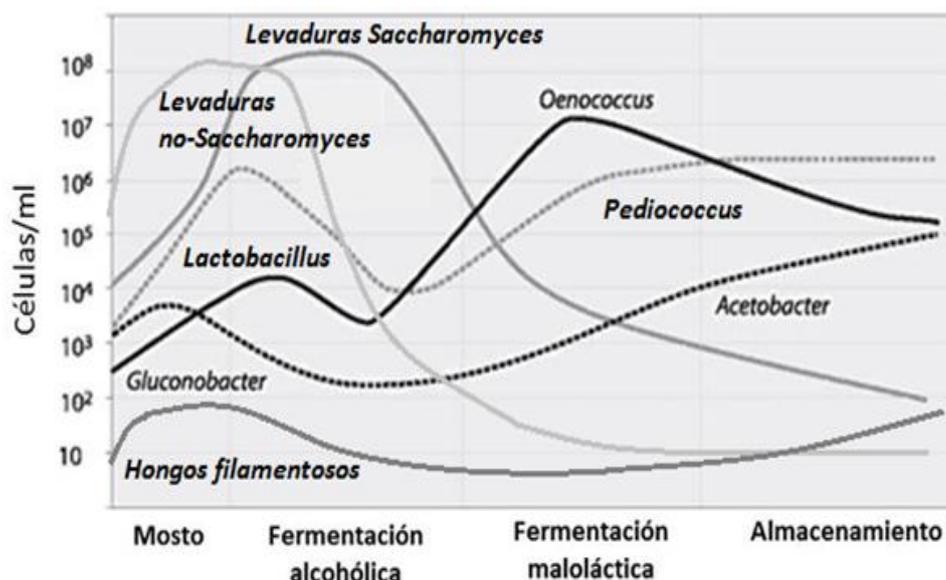


Figura 1. Evolución de los principales géneros de levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas durante las principales etapas en la elaboración del vino. (Fuente: Elaboración propia, elaborada y adaptada a partir de la publicada por Krieger, 2005)

Entre estos organismos, las levaduras son responsables de llevar a cabo el proceso metabólico principal, la fermentación alcohólica, ruta catabólica que consiste en la transformación de los azúcares presentes en el mosto en etanol y CO_2 . La fermentación alcohólica es el resultado de la acción combinada de varias especies de levaduras que se suceden durante dicho proceso. Comienzan con el crecimiento de especies de levaduras procedentes de la superficie de la uva y del ambiente de bodega y pertenecen a los géneros, *Kloeckera*, *Torulaspora*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, denominadas en conjunto como no-*Saccharomyces* o levaduras de bajo poder fermentativo (Ciani *et al.*, 2004; Malandra *et al.*, 2003; Aranda y *et al.*, 2005). La viabilidad de estas especies de levaduras se ve disminuida conforme avanza la fermentación. Al mismo tiempo que éstas van desapareciendo, las levaduras del género *Saccharomyces* o de alto poder fermentativo, principalmente de la especie *S. cerevisiae*, empiezan a multiplicarse hasta convertirse en las únicas responsables de la fermentación alcohólica (Carrascosa *et al.*, 2005; Combina *et al.*, 2005; Le June *et al.*, 2006).

El siguiente grupo de microorganismos que interviene en el proceso son las bacterias ácido lácticas (BAL) que están presentes en la piel de la uva (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983) y en las superficies de la bodega (Peynaud *et al.*, 1959; Wibowo *et al.*, 1985). Las especies de bacterias ácido lácticas más frecuentes en mosto y en vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Vaughn *et al.*, 1957; Radler 1963). Estas están presentes a lo largo de la vinificación en números relativamente bajos (10^2 - 10^3 UFC/ml), debido a la competencia metabólica con las levaduras y a las características generadas en el medio (Lonvaud-Funel, 1999). Una vez concluye la fermentación alcohólica, la concentración de levaduras disminuye progresivamente y, con ello, la competencia generada con las bacterias lácticas, permitiendo que éstas se multipliquen hasta poblaciones en ocasiones, cerca de $10^6 - 10^8$ UFC/ml (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Estas bacterias ácido lácticas producen algunas transformaciones en el vino, de las cuales la más interesante es la llamada *fermentación maloláctica* (FML) o desacidificación biológica del vino, que consiste en la descarboxilación del ácido L-málico del vino, a ácido láctico y CO_2 . Esta reacción disminuye la acidez fija del vino, es decir convierte la acidez astringente y

verde, típica del ácido málico, en una acidez más suave y dulce propia del ácido láctico (Heinick-Kling *et al.* 1994). Estudios realizados en varios países indican que la especie *Oenococcus oeni* es la predominante en la realización de la fermentación maloláctica, aunque la composición de las bacterias ácido lácticas presentes en el mosto de uva al principio de la fermentación alcohólica está dominada por cepas de *Lactobacillus*, y por *Pediococcus* al final de fermentación maloláctica (Wibowo y col, 1985).

Por último, la presencia de bacterias ácido acéticas (BAA) y hongos filamentosos en mostos y vinos, depende mayoritariamente de la calidad sanitaria de la uva. Uvas podridas por exceso de lluvias, o contaminadas con *Botrytis cinerea*, producen mostos con poblaciones muy elevadas de bacterias acéticas y hongos filamentosos. En el mosto, las especies mayoritarias de bacterias ácido acéticas son *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter acetii* y *Acetobacter pasteurianus*, mayoritarias también de la uva. Durante la fermentación alcohólica, como consecuencia de las fuertes condiciones de anaerobiosis impuestas por el metabolismo de las levaduras, las posibilidades de proliferación de las bacterias acéticas son prácticamente nulas, debido a la alta dependencia del oxígeno que presentan para su desarrollo. Al final de la fermentación alcohólica, las especies mayoritarias de bacterias ácido acéticas pertenecen al género *Acetobacter*, por tener éstas una mayor facilidad para metabolizar etanol como fuente de carbono a diferencia de *Gluconobacter oxydans*, que asimila la glucosa inicial del mosto (González *et al.*, 2005). En cuanto a los hongos filamentosos, los más comunes en las uvas son *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre noble o gris en uva (Bayonove, 1989) y especies pertenecientes a los géneros, *Uncinula*, *Alternaria*, *Plasmopora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Oidium*, *Cladosporium* y *Trichoderma*, que infectan a las uvas y pueden afectar a las características organolépticas y sanitarias de los mostos y vinos (Amerine *et al.*, 1980; McGrew, 1982). Respecto a la presencia de hongos filamentosos en el vino, es escasa debido a las condiciones de anaerobiosis de la fermentación y las condiciones del medio como, el contenido alcohólico elevado o la presencia de anhídrido sulfuroso, el cual puede penetrar en las células y, dependiendo de su concentración, puede provocar la muerte de estos hongos, acción fungicida, o inhibir temporalmente su actividad, acción fungistática (Pardo *et al.*, 1989; Querol *et al.*, 1990). Estos hongos filamentosos aparecen en mayor concentración en mostos, disminuyendo progresivamente a niveles muy bajos conforme avanza la fermentación alcohólica. Sin embargo, estos pueden estar presentes en el corcho de los vinos embotellados y en las barricas, generando diversos compuestos perceptibles incluso en cantidades muy bajas, y que pasan al vino, alterándolo. Además, durante la fase de maduración del fruto pueden generar toxinas que pasan al mosto y permanecen durante todo el proceso fermentativo, a pesar de que el microorganismo causante ya no aparezca en el vino (Fleet, 1984 y 2003).

2.2. LAS ALTERACIONES DEL VINO Y SUS CAUSAS

Los propios microorganismos encargados de la transformación del mosto en vino y por lo tanto considerados beneficiosos, a su vez, pueden causar alteraciones en los vinos debido a su proliferación en un momento inadecuado y a la producción de metabolitos que pueden alterar la calidad sensorial o incluso causar efectos adversos a la salud (Flanzy, 2000; Carrascosa *et al.*, 2005). La presencia de determinados microorganismos está regulada por una serie de normativas a tener en cuenta, ya que el vino se encuadra dentro de la definición de alimento según el Reglamento (CE) N° 178/2002 y la Ley 24/2003 de la Viña y del Vino. Por lo tanto, las empresas elaboradoras de vino se asegurarán y verificarán, que en todas las etapas de la producción, transformación y distribución, sus productos cumplen los requisitos de calidad y seguridad de acuerdo a la legislación alimentaria (Suarez *et al.*, 2004). Para cumplir con la legislación, las empresas alimentarias incorporan distintos mecanismos

de control, como la implantación de sistemas APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) con el principal objetivo de elaborar alimentos seguros (Forsythe *et al.*, 1998; IFST 1993). La seguridad alimentaria tiene una prioridad a nivel internacional y no hay ningún grado de tolerancia sobre la presencia de patógenos o cualquier otro peligro en los alimentos. Tradicionalmente, se ha considerado que la Higiene de los Alimentos debe velar por el cumplimiento de tres aspectos: i) ser seguro ii) mantener unas características químicas, físicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas y iii) cumplir las especificaciones nutricionales declaradas en su etiquetado ya que, de hecho, su misión fundamental es garantizar que los alimentos sean aptos para el consumo humano. El Código Alimentario Español define “*alimento alterado*” como todo aquel que “*durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente, sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo*”. De esto se deduce que un alimento alterado puede ser inocuo, pero no apto para el consumo. Por el contrario, también puede suceder que un alimento con unas propiedades sensoriales y nutricionales adecuadas represente un riesgo para la salud pública (Codex Alimentarius, 2007; OIV, 2006).

En un mercado tan competitivo como es el enológico, las alteraciones de los vinos pueden derivar en un grave problema económico para la empresa, ya que puede hacer rechazable su producto. Las principales alteraciones vínicas surgen a partir de peligros con distintos orígenes. A menudo estas causas no actúan aisladamente, sino que suelen actuar conjuntamente.

- **Físicos:** Los principales agentes físicos que alteran las propiedades organolépticas de los vinos son la luz y la temperatura.
- **Químicos:** Los vinos ven alteradas sus características por la actividad enzimática de los microorganismos presentes en el propio vino y otras reacciones químicas inherentes a su composición.
- **Biológicos:** Las alteraciones se producen por efecto del crecimiento, y su correspondiente actividad metabólica, de bacterias, levaduras y hongos filamentosos o por la acción de insectos, como la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), que suele ser portadora de bacterias ácido acéticas.

Los peligros más importantes son los producidos por contaminaciones microbiológicas, que proceden mayoritariamente de las materias primas empleadas en la elaboración del vino y que contienen su propia microbiota natural o de la falta de higiene en las operaciones de procesado y distribución, en las que puede contaminarse con una gran variedad de microorganismos. La composición química del vino y las condiciones en las que se encuentre pueden favorecer el crecimiento y predominio de alguno de ellos y conducir, por consiguiente, a la alteración del vino. La alteración no solo se debe al crecimiento microbiano, sino también a la producción de metabolitos finales que pueden originar olores, colores y/o sabores desagradables, gas, limosidad (pérdida de la textura normal) o pueden provocar riesgos para la salud humana (Forsythe *et al.*, 1998).

Los principales microorganismos causantes de alteraciones a nivel organoléptico son: levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias acéticas, y proceden tanto de la uva como del ambiente de la bodega. En la Tabla 1 se recogen los principales géneros, así como su origen y las alteraciones que causan.

Tabla 1: Principales microorganismos causantes de alteraciones organolépticas en vinos. (Elaboración propia)

FAMILIA	GÉNERO	ORIGEN	ALTERACIÓN
LEVADURAS	<i>Brettanomyces/Dekkera</i>	Uva Ambiente de bodega Barricas de crianza	Producción de fenoles volátiles "Sabor a ratón" (por la producción de acetamida)
	<i>Saccharomyces</i>	Ambiente de bodega	Velo o Flor Refermentaciones
	<i>Rhodotorula</i>	Uva Ambiente de bodega	Velo o Flor
	<i>Cándida/Metschnikowia</i>	Uva Ambiente de bodega	Velo o Flor
	<i>Kloeckera/Hanseniaspora</i>	Uva Ambiente de bodega	Aumento de la acidez volátil Producción de acetato de etilo
	<i>Schizosaccharomyces</i>	Uva Ambiente de bodega	Desacidificación del vino
	<i>Torulaspota</i>	Uva Ambiente de bodega	Velo o Flor
	<i>Pichia</i>	Uva	Velo o Flor Refermentaciones
	<i>Hansenula</i>	Uva	Velo o Flor Refermentaciones
	<i>Zygosaccharomyces</i>	Uva Ambiente de bodega	Velo o Flor Refermentaciones
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	<i>Pediococcus</i>	Uva Ambiente de bodega	Picado láctico Ahilado Vuelta Amargor Fenoles volátiles
	<i>Oenococcus</i>	Ambiente de bodega	Picado láctico Olores desagradables
	<i>Lactobacillus</i>	Uva Ambiente de bodega	Picado láctico Ahilado Vuelta Amargor Fenoles volátiles
	<i>Leuconostoc</i>	Uva Ambiente de bodega	Picado láctico Ahilado Amargor
BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS	<i>Gluconobacter</i>	Uva	Picado acético
	<i>Acetobacter</i>	Ambiente de bodega	Ahilado Picado acético

Por otro lado, los peligros que afectan a la seguridad sanitaria del producto se pueden dividir según las distintas etapas de elaboración.

- I. **Recepción de la uva:** Se detecta un peligro por la presencia de micotoxinas de podredumbre. Las micotoxinas (etimológicamente procedentes de las palabras *griegas mikes = hongo* y *toxican = veneno*) son productos metabólicos de determinados hongos filamentosos que actúan como fuertes venenos contra otros organismos o grupos de organismos, si bien no ejercen acción nociva contra los microorganismos productores (Shotwell *et al.*, 1969). La micotoxina mayoritaria en bebidas fermentadas como el vino, es la ocratoxina A (OTA). Se trata de un metabolito secundario producido por ciertos hongos filamentosos que están presentes en el suelo y en las materias orgánicas y que se expanden y se desarrollan en las uvas durante la fase de maduración. La formación de OTA en las uvas se debe principalmente a la contaminación de las bayas por ciertas especies de *Aspergillus carbonarius* (Cabañes *et al.*, 2002) y, con menor frecuencia, por *Aspergillus niger* y especies del género *Penicillium* (Bau *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2002). Se consideran hongos oportunistas porque colonizan las bayas dañadas a consecuencia de una deficiente protección fitosanitaria o heridas, provocando la llamada “podredumbre negra” (WHO technical Report Series, 1991 y 1995). Los estudios realizados por el Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Aditivos Alimentarios (WHO Food Additives series, 2001y 2007), por el Comité Científico de la Comisión Europea (European Commission) sobre presencia de aflatoxinas y ocratoxina A en alimentos y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), sobre los efectos tóxicos de la OTA, demuestran que esta micotoxina está relacionada con diferentes efectos nefrotóxicos, inmunotóxicos, genotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos y neurotóxicos. Respecto a la actividad carcinogénica, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta micotoxina en la categoría 2B, es decir, como posible carcinógeno humano (IARC, 1993). Los límites máximos en determinados productos alimenticios están regulados por La Organización Mundial de la Salud. la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) ha establecido el límite de OTA en vino en $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, Según el Reglamento (CE) 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006 (Reglamento (CE) N° 1881/2006).

- II. **Fermentación alcohólica:** Durante esta etapa se detecta un peligro por la producción de carbamato de etilo, (CE) o uretano, que es un éster del ácido carbámico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCONH}_2$) resultante de la reacción de esterificación de éste con el alcohol etílico (Mira de orduña y col. 2000a). Aunque el principal precursor del carbamato de etilo en vino por reacción con el etanol es la urea excretada por las levaduras, otros precursores del carbamato de etilo que también reaccionan con el etanol, son los productos de degradación de la arginina (como la citrulina y el carbamil-fosfato), llevada a cabo por parte de diversas especies de bacterias ácido lácticas mediante la vía de la arginina deiminasa (ADI) (Figura 2). *Oenococcus oeni* presenta una capacidad variable de degradación de arginina y los genes de la ruta ADI se encuentran en gran cantidad de sus cepas. Sin embargo, algunas cepas de especies consideradas contaminantes, como *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc oeni* y *Lactobacillus buchneri* acumulan mayores cantidades de citrulina que *O. oeni* (Araque *et al.*, 2009).

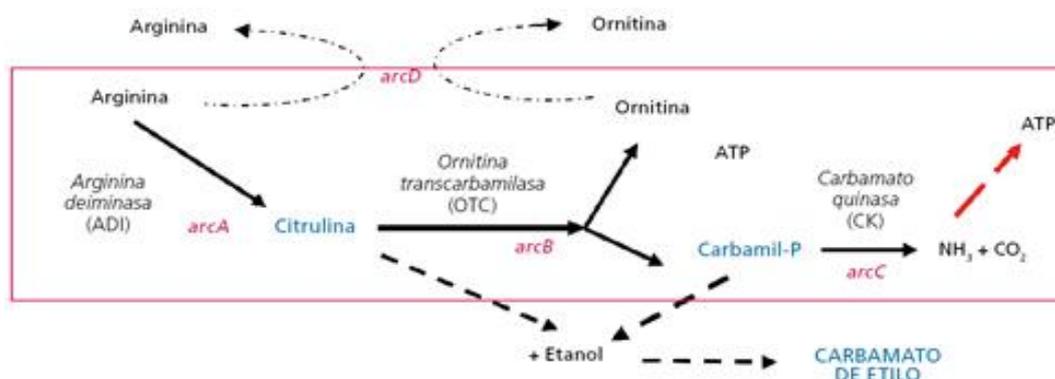


Figura 2. Ruta de la arginina deiminasa de las bacterias lácticas, con la posible acumulación de citrulina y carbamil-fosfato, precursores de la producción de carbamato de etilo mediante reacción con etanol. Nombres de los genes de la ruta ADI se indican en rojo (Fuente: Araque *et al.*, 2009)

Durante la fermentación el aminoácido arginina presente en el mosto se halla en una concentración entre 0,1-2,4 g/L y puede llegar hasta los 10 g/L durante la fermentación. En la fase de crecimiento aeróbico de la levadura, dicho aminoácido es transformado en citrulina, que se acumula dentro de la levadura. Esta reacción se lleva a cabo tomando el nitrógeno imínico de la arginina que, por acción de una transaminasa, se cambia por un carbonilo, dando lugar a la citrulina. Una vez alcanzada la concentración máxima de este compuesto en el interior de las levaduras, es liberado al medio. Allí, las bacterias ácido lácticas lo hidrolizan formando ácido carbámico que pasa al medio y en presencia del alcohol producido origina el carbamato de etilo (Ough *et al.*, 1988; Monteiro *et al.*, 1989; Teymo-Larsson, 1989; Ough *et al.*, 1990; Liu y Pilone, 1998).

El carbamato de etilo, debido a su ligera lipofilia puede penetrar en el sistema nervioso central donde ejerce una acción sedante y anestésica. Además, es una sustancia clasificada como genotóxica y probable carcinógeno en humanos (grupo 2A) por la IARC (IARC 1993). Como medidas de control es necesario controlar los niveles de carbamato de etilo en vinos en caso de exportación en países que han establecido limitaciones a su presencia en vino: en Estados Unidos es obligatorio desde 1988 determinar el nivel de CE presente en las bebidas fermentadas, para que no supere el límite de 15 ppb establecido por la FDA. También, la FAO/OMS Comité Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos determinó en su 25ª reunión (La Haya, 22-26 de marzo de 1993) los límites legales de CE permitidos en bebidas alcohólicas: 30 µg/L en vinos de mesa, 100 µg/L en vinos generosos, 150 µg/L en destilados y aguardientes y 400 µg/L en licores.

- III. **Fermentación maloláctica:** Durante esta etapa, las principales sustancias de interés son las aminas biógenas (AB), compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular que poseen actividad biológica, producidas principalmente por las bacterias ácido lácticas (Lonvaud-Funel, A. 2001). Las principales aminas biógenas asociadas al vino son las siguientes: putrescina, histamina, tiramina y cadaverina (Lehtonen, 1996; Soufleros *et al.*, 1998; Vazquez-Lasa *et al.*, 1998) y, en menor medida, la feniletilamina y la isoamilamina. Según su estructura química, pueden agruparse en aminas alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aminas aromáticas (tiramina y feniletilamina) o aminas heterocíclicas (histamina y triptamina) (Silla Santos, 1996) y según el número de grupos amino se clasifican en monoaminas (histamina, feniletilamina y tiramina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina y agmatina). Las AB se originan por la descarboxilación de un aminoácido precursor, a partir de enzimas descarboxilasas específicas que sintetizan ciertos microorganismos (Figura 3).

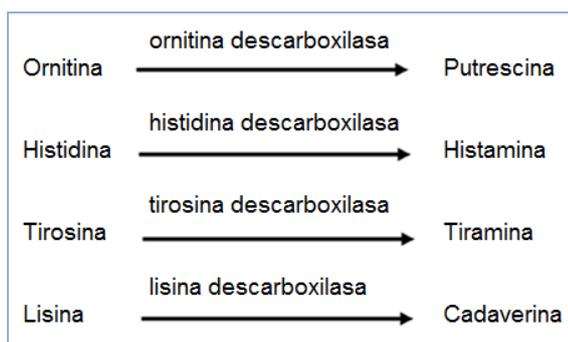


Figura 3. Producción de aminas biógenas asociadas al vino a partir de la descarboxilación de aminoácidos mediante las enzimas indicadas (Elaboración propia)

La putrescina se sintetiza por dos rutas alternativas; a partir de la ornitina mediante descarboxilación o a partir de la arginina, en dos reacciones sucesivas de descarboxilación y desaminación. La Espermidina y la espermina se sintetizan sucesivamente a partir de putrescina (Pegg, 1988).

Se han caracterizado diversas especies de bacterias lácticas como productoras de aminas biógenas que incluyen *Lactobacillus hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *Pediococcus parvulus* (Landete *et al.*, 2005 y 2007a). Algunas cepas de *O. oeni* también pueden producir ciertas cantidades de aminas biógenas como la histamina y, en menor grado, la putrescina, aunque las especies mayoritariamente responsables de que se produzcan elevados contenidos de estas dos aminas biógenas en vino son *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus* (Landete *et al.*, 2007b).

La cantidad de AB depende de la microbiota presente en la bodega, la presencia de los precursores y de parámetros técnicos de la elaboración, como son la acidez del mosto o el vino y medidas tomadas en la corrección de SO₂. Son sustancias que pueden desencadenar reacciones alérgicas, principalmente la histamina y, en menor grado, la tiramina, o producir desviaciones organolépticas, como es el caso de la putrescina o la cadaverina. Las intoxicaciones agudas más frecuentes son las causadas por la histamina, que cursa con náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión, palpitaciones, enrojecimiento y dolor de cabeza (Shalaby., 1996) y por la tiramina, que produce hipertensión, migraña, náuseas, vómitos, taquicardia y aumento en la glucemia. Actualmente en España no existe reglamentación al respecto, aunque sí se han recomendado umbrales máximos de histamina en vinos en Alemania (2 mg/L), Bélgica (5-6 mg/L), Francia (8 mg/L) o Suiza (10 mg/L) Países Bajos (3 mg/l) como valores máximos tolerables en el vino (OSEC, 2002).

2.3. RECURSOS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRECISA Y PRECOZ DE MICROORGANISMOS

La dinámica de la ecología microbiana de los viñedos, las uvas y el vino se estudian desde los años 1970 (Barnett *et al.*, 1972). Los métodos analíticos utilizados en el aseguramiento de la calidad microbiológica de los alimentos utilizan técnicas clásicas de microbiología, basadas en el cultivo y crecimiento de los microorganismos presentes en el alimento en medios de enriquecimiento, seguidos de su aislamiento e identificación mediante una serie de criterios morfológicos y fisiológicos. De esta manera, es posible detectar y/o cuantificar la presencia de microorganismos en alimentos, ya sean patógenos, fundamentalmente bacterias, o no patógenos pero alterantes de la calidad de los alimentos, que suelen ser hongos filamentosos, levaduras o también bacterias.

Sin embargo, la detección e identificación de microorganismos mediante esta tecnología puede tardar varios días, lo cual es muy limitante en un contexto de producción industrial, en el que se requieren respuestas rápidas para identificar y corregir los posibles problemas de forma inmediata, como es el caso de las bodegas. Por otra parte, los resultados obtenidos no suelen ser cuantitativos, es decir, nos informan de la presencia o ausencia en la muestra del microorganismo objeto de análisis, pero no sobre la cantidad del mismo, lo que puede ser muy relevante para tomar decisiones. Esto se debe fundamentalmente a la necesidad de utilizar técnicas de enriquecimiento, en las que hay que cultivar los microorganismos para que se multipliquen hasta alcanzar una cantidad de células fácilmente detectable. Así, y debido a las condiciones que se imponen al cultivo, la cantidad de colonias identificadas después del enriquecimiento no es representativo de la cantidad inicial de células presentes en la muestra. (Proyecto Genoma España, 2002). Esto significa que si las condiciones ambientales no son óptimas para su desarrollo, la célula puede adoptar un mecanismo de supervivencia, que le permite mantener su actividad metabólica pero desactivando los mecanismos de replicación. Por lo tanto, permanecen viables, pero no pueden crecer y formar colonias por lo que se consideran *viables no cultivables* (VNC). Sin embargo, en algunos casos, estas células pueden retornar al crecimiento activo cuando las condiciones ambientales vuelven a ser adecuadas, recuperando su capacidad para replicarse y su actividad metabólica. A partir de estas células ya viables y cultivables, es posible identificar las colonias sobre los medios de cultivo (Oliver, 1993). Varios estudios han demostrado que, que tanto levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *Brettanomyces bruxellensis*, como bacterias ácido lácticas y acéticas pueden entrar en estado de VNC al ser sometidas a determinados tipos de estrés (A. Mas, 2005; Millet y Lonvaud, 2000).

Por otro lado, la identificación de las distintas especies es a veces ambigua, ya que se basan principalmente en el estudio del fenotipo, y éste depende de las condiciones ambientales y del estado de desarrollo del microorganismo (A. Carrascosa *et al.*, 2005). Y, además, la identificación resultante de este tipo de metodologías no llega a nivel intraespecífico, de cepa o de individuo, en el que se producen diferencias importantes en cuanto a su incidencia, tanto positiva como negativa, en el vino final.

Estos hechos abren paso al estudio la ecología microbiana por métodos genéticos mediante el uso de técnicas de biología molecular alternativas e independientes de cultivo (Metzker, 2010; Nichols, 2007). Conseguir identificar cepas concretas de un microorganismo puede ser muy importante, entre otras cosas, para identificar el origen de una contaminación y para adoptar medidas correctoras. Recientemente, la utilización de técnicas moleculares basadas en el material genético supone una ventaja respecto a las técnicas clásicas basadas en el cultivo. Estas técnicas permiten la caracterización precisa y precoz de microorganismos mediante secuenciación masiva y/o amplificación por PCR del ADN contenido en la muestra, además de cuantificar las poblaciones mediante qPCR e identificar funciones concretas mediante al análisis del ARN mensajero de las enzimas correspondientes. Las técnicas moleculares utilizadas incluyen análisis como la restricción del DNA mitocondrial (Martorell *et al.*, 2006), PCR-RFLP (Dias 2003; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), PCR-RAPD (Martorell *et al.*, 2006) y PCR con cebadores específicos (Cocolin *et al.*, 2010).

Entre las limitaciones de estas técnicas, podemos citar los siguientes: Aunque algunas de estas técnicas son cuantitativas, en algunas ocasiones puede resultar necesario un paso de enriquecimiento previo a la extracción del ADN, de forma que resultan semicuantitativas. Por otro lado, estas técnicas reducen el tiempo de análisis con respecto a las técnicas de cultivo, al usar como diana el ADN, se detectan tanto células vivas, lo que incluye a las células VNC, como células muertas, pudiendo dar lugar a una sobreestimación del número de microorganismos en la muestra (Andorra *et al.*, 2010). Para paliar estos inconvenientes en la medida de lo posible, se estudia

como alternativa al ADN, el ARN. Este se degrada más rápidamente que el ADN, y es un buen indicador de viabilidad celular, ya que el ARN celular solo está presente en microorganismos vivos, mientras que el ADN puede permanecer intacto durante años a pesar de que el microorganismo haya perecido. Por ello, se está tendiendo al uso de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), para la detección específica y cuantificación de microorganismos directamente del vino en cada una de sus etapas de elaboración. El problema principal de la qPCR a partir tanto de ADN como de ARN es que la qPCR solo permite detectar y cuantificar los microorganismos diana para los cuales hayamos diseñado cebadores de amplificación específicos y se desconoce si dichos microorganismos son los únicos implicados en el deterioro del vino.

En la actualidad, el estudio de la diversidad microbiana puede realizarse mediante una nueva técnica molecular denominada secuenciación masiva *HTS* (de sus siglas en inglés *High Throughput Sequencing*), diseñada principalmente para la identificación de toda la microbiota contenida en la muestra, lo que se conoce como metagenómica. La metagenómica es análoga a la genómica (el estudio del conjunto de ADN de un organismo), con la diferencia de que no se ocupa de un único genoma, de un clon u organismo cultivado o caracterizado en el laboratorio, sino de toda la comunidad microbiana presente en una muestra ambiental. En el sentido estricto, *meta* proviene del griego “más allá”, de ahí que el término significa literalmente “más allá del estudio del genoma” (Gilbert y Dupont, 2010). De esta forma se obtiene una enorme cantidad de información genética del genoma colectivo de la comunidad microbiana; es decir, el material genético de las células vivas, el ADN de los microorganismos en estado de latencia, el ADN de los organismos muertos y el ADN extranuclear de todos ellos (Vieites *et al.*, 2010). Consiste en la secuenciación en paralelo de genomas enteros o de genes particulares que se utilizan como marcadores moleculares, para todas las especies albergadas en la muestra, tras la extracción directa de ácidos nucleicos de la matriz que se esté estudiando. Entre sus principales usos destacan los siguientes: determinar la presencia o ausencia de microorganismos; analizar el total y la proporción de cada uno de los organismos que componen la comunidad; y, predecir sus roles funcionales en el ecosistema, mediante las llamadas etiquetas de genes ambientales, es decir, fragmentos de genes que codifican dominios conservados o motivos de familias de proteínas únicos para cada especie (Schmeisser *et al.*, 2007; Vietes *et al.*, 2009; Davenport y Burkhard, 2013;). Toda la información así generada, extremadamente grande, se almacena en bancos de datos ambientales, que sirven de referencia de comparación y que permiten la identificación concreta de las especies presentes en las matrices analizadas, así como llevar a cabo estudios de asociación entre especies y alteraciones (Obregon-Tito *et al.* 2015; Marmioli *et al.*, 2007).

Las técnicas de *HTS* se han aplicado ampliamente también al estudio de la fermentación de alimentos o su deterioro microbiano (Ercolini, 2013) y, recientemente, se ha puesto de manifiesto la capacidad y potencial de estas técnicas para detectar contaminaciones en alimentos y su posible trazabilidad en el entorno en el cual se procesan dichos alimentos (Ercolini *et al.*, 2013). La ventaja indudable que las técnicas *HTS* aportarían al estudio del deterioro en el vino es que, al obtener miles de secuencias para una única muestra, se puede tener una descripción detallada de todos los microorganismos presentes en el deterioro y el cambio poblacional previo a la proliferación de un determinado microorganismo responsable de la alteración, con lo que podría tener carácter predictivo. Además, permiten procesar cientos de muestras simultáneamente y se pueden realizar tanto a partir de DNA como de RNA, con lo que se podría tener información no solo de los microorganismos presentes, como de los metabólicamente activos en el momento del deterioro. Por otro lado, mediante la metatranscriptómica (derivada de la transcriptómica, que estudia todos los genes que se están transcribiendo en un determinado momento, en muestras ambientales) se podría tener información de las interacciones metabólicas que se producen entre los distintos microorganismos implicados en el deterioro del vino.

Recientemente, se ha creado una plataforma de análisis genómico para el viñedo y el vino, denominada WineSeq basada en secuenciación masiva de ADN, diseñada para monitorizar las comunidades microbianas que interactúan a lo largo del proceso de vinificación. Según declaran sus creadores, “las principales bacterias y levaduras implicadas en el proceso, son unas 10 especies. Actualmente, podemos analizar la comunidad microbiana entera, habiéndose identificado hasta la fecha un total de 400 especies microbianas diferentes, entre bacterias y levaduras, en mosto, en un estudio en el que han participado 20 de las principales bodegas de España procedentes de las DO de Toro, Ribera del Duero y La Rioja.

2.4. JUSTIFICACIÓN

Basándose en los antecedentes revisados en la introducción, parece clara la necesidad de identificar los distintos microorganismos implicados en la elaboración del vino mediante técnicas de genética molecular. En los últimos años, estas técnicas han cambiado la visión sobre la diversidad microbiana, ya que permiten describir y monitorear la sucesión de los microorganismos. Aplicándolas al vino, contribuirán a producir vinos en condiciones más controladas y a asegurar su calidad, permitiendo identificar los peligros potenciales de origen biológico, de forma precoz y precisa.

Los datos concretos que ya se están generando son de distinta índole:

- Datos fiables sobre la diversidad y la identidad taxonómica, a nivel de especie, cepa o incluso de individuo, de los microorganismos presentes en el vino en cada etapa de su producción.
- Datos cuantitativos que describan cambios en las poblaciones de cada categoría taxonómica durante la producción y la cadena de distribución.
- Información sobre el origen de los microorganismos en el producto
- Estudios de correlación entre el crecimiento y la actividad de los organismos individuales y la calidad y seguridad del producto. Los alimentos fermentados contienen generalmente microbiotas complejas, que, hasta ahora, eran difíciles de describir y de estudiar experimentalmente.

3. OBJETIVOS

Las alteraciones del vino pueden tener su origen en factores físico-químicos, en cuyo caso suelen denominarse quiebras, o pueden tener su origen en la acción de microorganismos en cuyo caso hablamos de enfermedades (Peynaud, 1989; Biol *et al.*, 1992; Navarre, 1994). Para cada etapa del proceso de elaboración de vinos se identifican “peligros biológicos”, siendo objeto de interés tanto los organismos causantes de alteraciones en la calidad organoléptica del producto como los organismos alterantes de la seguridad por la producción de toxinas y otros metabolitos nocivos o potencialmente nocivos para el consumo humano.

En este trabajo, nos hemos fijado como objetivo, la revisión de los siguientes aspectos:

1. Revisar las herramientas moleculares actualmente disponibles para identificar de forma precisa y precoz los microorganismos presentes en muestras complejas, como son las distintas etapas de la elaboración del vino.
2. Revisar los casos documentados sobre la aplicación de estas herramientas al análisis de peligros, biológicos y químicos, asociados a la calidad y seguridad de los vinos, y en particular:
 - a. La correlación entre la presencia y/o ausencia de microorganismos y las enfermedades de un vino y sus posibles relaciones causa-efecto
 - b. La identificación precoz de microorganismos productores de aminos biógenas, carbamato de etilo y micotoxinas.

4. METODOLOGÍA

4.1. RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se ha realizado una revisión no sistemática, referente a las técnicas moleculares utilizadas actualmente en identificación y caracterización de microorganismos alterantes del vino en bodega, destacando a la vez sus aplicaciones.

La búsqueda se llevó a cabo en las bases de datos Science Direct, Springer Journal, Medline y Web of Science utilizando las siguientes palabras clave: *molecular identification, organoleptic defects in wines, massive sequencing, microorganisms in wines, biogenic amines, mycotoxins*, y las siglas RFLP, AFLP, PCR, qPCR, entre otras.

4.2. LECTURA Y CLASIFICACIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Después de leer los artículos recopilados, se han clasificado en tres categorías:

- Artículos generales sobre técnicas de identificación molecular;
- Artículos sobre alteraciones o enfermedades de los vinos vino;
- Artículos sobre efectos de las alteraciones de los vinos sobre la salud humana;

A la vista de esta clasificación, se ha organizado el presente TFG en dos partes:

1) Descripción exhaustiva de las metodologías moleculares disponibles y utilizadas en bodega para mejorar el conocimiento y control de los microorganismos implicados en las alteraciones del vino.

2) Descripción de los casos descritos en la bibliografía sobre alteraciones del vino debidas a la presencia de microorganismos en dos aspectos fundamentales:

- a) Las enfermedades del vino que provocan alteraciones organolépticas haciendo especial hincapié en la contaminación por *Brettanomyces bruxellensis*
- b) La presencia de toxinas para la salud humana, utilizando como caso ejemplar los microorganismos productores de ocratoxina o los productores de aminas biógenas.

4.3. REDACCIÓN DEL TEXTO

Para la redacción nos hemos basado en el documento titulado “Para empezar a entendernos” (Fernández *et al.*, 2008)

El modelo de documento utilizado y la relación de referencias bibliográficas citadas (30-50) se ha realizado en función de la normativa establecida y aprobada por el comité del grado de enología respecto al formato de los trabajos bibliográficos que se presenten como TFG, aunque no entre en vigor hasta el curso 2018/2019.

Según esta normativa, el número máximo de referencias bibliográficas que se pueden citar es de 30. En este caso, y debido a que en este caso, la bibliografía consultada era muy superior a ese número, he aplicado los siguientes criterios de citación:

- i) Actualidad de la información consultada, citando en el texto siempre los de mayor actualidad.
- ii) Análisis objetivo de la temática y alcance de la misma.
- iii) Relevancia de los autores y número de citaciones o referencias. La relación completa de artículos recopilados se recoge en el Anejo I.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los microorganismos que producen alteraciones en los vinos pueden agruparse en numerosas categorías como ya hemos visto en la Tabla 1 y en distintos momentos del proceso de elaboración del punto 2.2 de la introducción.

Por otro lado, y tal como se ha establecido en el punto 2.3 de la introducción, la identificación precisa y precoz de los organismos que producen las alteraciones, así como la cuantificación de las poblaciones y el estudio de su estado funcional son aspectos vitales para comprender la ecología microbiana del vino y poder controlar mejor el proceso. En esta tarea son fundamentales la comprensión y aplicación de las técnicas moleculares basadas i) en la PCR, o sus derivadas, como la qPCR, ii) la secuenciación masiva apoyada en la bioinformática y iii) el análisis del RNA mensajero de las funciones enzimáticas que se quieren analizar.

En esta sección revisamos en el punto 5.1., el estado de la cuestión (“estado del arte”) de las tecnologías moleculares actualmente disponibles para estudiar la microbiota del vino y en el punto 5.2., dos de las alteraciones más importantes, como ejemplos de las posibles aplicaciones de las nuevas tecnologías de identificación molecular descritas en el apartado 2.3 de la introducción: (i) alteraciones que provocan problemas en la calidad organoléptica y (ii) presencia de sustancias tóxicas que alteran la seguridad sanitaria del producto.

5.1. TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ENOLÓGICA

Actualmente, el origen, el desarrollo y la sucesión de las distintas especies de levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y hongos filamentosos, descritas en la Figura 1, puede seguirse utilizando técnicas moleculares específicas, basadas fundamentalmente en la secuenciación de ADN y en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) y sus derivadas, como la qPCR, que permiten la diferenciación, tipificación e incluso su cuantificación a nivel de cepa.

La historia de la secuenciación del ADN comienza en 1977 cuando se publicaron los primeros métodos de secuenciación del ADN, desarrollados por un lado por Sanger y, por otro, por Maxam y Gilbert. Estos métodos, denominados de primera generación, se basan en la secuenciación directa de fragmentos cortos de ADN (entre 400-800pb), que es actualmente una de las herramientas fundamentales para el estudio de la diversidad biológica. Por primera vez, se pudieron establecer diferencias entre especies, poblaciones e individuos en base a su genotipo, en lugar de la apariencia externa o fenotipo, y se constató que organismos muy próximos, como las distintas cepas de una misma especie de bacterias o levaduras, presentaban diferencias en su genotipo y, por consiguiente, en sus características.

A finales de los años 80 se llevan a cabo una serie de descubrimientos e inventos, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, en inglés), práctica que permite la amplificación exponencial de un fragmento de ADN definido por sus secuencias flanqueantes (Mullis, 1990); la *Taq* Polimerasa, enzima termoestable que puede utilizarse en la PCR (Innis *et al.*, 1988; Carballeira *et al.*, 1990); o el marcaje del ADN con fluorocromos, método de detección utilizado para identificar los distintos tipos de fragmentos de ADN sintetizados “*de novo*” e “*in vitro*”(Prober *et al.*, 1987; Igloi, 1998). Estas técnicas requieren conocer *a priori* algunas secuencias de los organismos de estudio, presentando mayor dificultad cuando se trabaja con especies o comunidades microbianas poco conocidas. Son métodos sensibles y específicos, además rápidos, reproducibles, eficientes, fiables y económicos. De este modo surge la siguiente revolución en el estudio de los microorganismos y de las interacciones entre éstos y de éstos con el medio. Por otro lado, utilizando estos métodos moleculares puede

realizarse la identificación después de aislar el microorganismo de interés, después de un enriquecimiento o incluso, directamente, sin necesidad de realizar un cultivo previo.

Aunque la secuenciación se empezó a utilizar en 1977, el gran motor del desarrollo de las técnicas de secuenciación y análisis del ADN fue el Proyecto Genoma Humano iniciado en 1990. Este gran proyecto planeaba la secuenciación completa del genoma humano con el fin de conocer todos los genes y su posición relativa en los cromosomas (mapeo genético). Surgió así la necesidad de secuenciar de forma más rápida y barata, por lo que se crearon plataformas de secuenciación automática y de alto rendimiento de ADN, también conocidas como secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (Schadt *et al.*, 2010; Niedringhaus *et al.*, 2011; Pareek *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Entre estas plataformas, las más extendidas son la 454 Life Sciences de Roche®, las diferentes plataformas de Illumina® y las plataformas de Life Technologies el SOLiD® (por sus siglas en inglés “Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection”) y la Ion Torrent™ (Knief, 2014). Los sistemas de secuenciación masiva se basan en la obtención masiva de datos, en el orden de Gigabases o Terabases. Son métodos dependientes de una etapa de amplificación vía PCR para la intensificación de la señal tras la cual se secuencian en paralelo millones de fragmentos de ADN de múltiples individuos, haciendo posible el desarrollo de proyectos de secuenciación a corto plazo, lo que garantiza una alta precisión y rendimiento, así como el abaratamiento de los costes. Desde el punto de vista del estudio de la diversidad biológica, la secuenciación masiva permite, entre otras aproximaciones, desarrollar de manera relativamente sencilla un gran número de marcadores genéticos en casi cualquier especie, que se pueden utilizar para estudios filogenéticos, de diversidad, o de mapeo genético; para la determinación de patrones de expresión y de regulación génica; o para la identificación de especies de microorganismos presentes en muestras ambientales, llegando a discernir entre cepas o genotipos intraespecíficos (Baird *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Davey *et al.*, 2011;).

A pesar de sus innegables ventajas, la secuenciación masiva también presenta una serie de limitaciones que van superándose conforme se desarrollan nuevas mejoras tecnológicas. Una de las mayores limitaciones se debe a que, en determinadas ocasiones, la caracterización a nivel de cepa no es posible, por lo que se deberán complementar con las técnicas moleculares independientes de cultivo anteriormente mencionadas. Por otro lado el manejo del elevado volumen de datos generado en cada experimento (Zhao *et al.*, 2013), requiere un exhaustivo manejo de técnicas de análisis estadístico basado en complejos algoritmos que se conocen como técnicas bioinformáticas avanzadas. Además, la ingente cantidad de información biológica que se genera mediante esta tecnología se recoge en enormes bases de datos, que solo se pueden explotar con programas bioinformáticos cada vez más complejos y potentes. Así, se han desarrollado los recursos de las ciencias “ómicas”, que permiten comparar, organizar y analizar los datos generados, para especies ya conocidas y especies nuevas (López de Heredia y Vázquez-Poletti, 2016). El sufijo “-ómica” hace referencia al estudio de todas las moléculas del mismo tipo presentes en un organismo dado y en unas circunstancias dadas. Así, la genómica, la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica, estudian, respectivamente, todos los genes, las proteínas, los transcritos (RNA mensajeros) o presentes en un organismo en unas condiciones particulares. A estas tres últimas ciencias también se las agrupa bajo la denominación de “genómica funcional”, ya que permiten analizar la expresión diferencial de los genes y su regulación, a través de todos los productos de la expresión de los genes (Wilmes y Bond, 2006; Turnbaugh y Gordon, 2008; Gilbert y Hughes, 2011).

Además de la secuenciación que ya ha quedado descrita en el apartado 2.3, las principales técnicas actualmente disponibles para la identificación y cuantificación de microorganismos en el vino se enumeran a continuación. En cada caso se cita alguna

de las aplicaciones que se han llevado a cabo en vino. Es importante resaltar que el uso de estas técnicas en los distintos ámbitos es muy cambiante, ya que constantemente se desarrollan nuevas técnicas, nuevas variantes o se producen mejoras en algunos aspectos, por lo que algunas de ellas han caído en desuso, en favor de otras más eficaces, más específicas o más abordables económicamente. Para ordenar este epígrafe, se han agrupado las técnicas desarrolladas antes de la PCR (5.1.1) y las técnicas derivadas de la PCR (5.1.2.).

5.1.1. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ANTERIORES AL DESARROLLO DE LA PCR

Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH): Con esta técnica, los microorganismos son detectados específicamente como consecuencia de la unión de sondas de ADN marcadas con un fluorocromo, con fragmentos de ADN o ARN específicos del microorganismo. Es posible la identificación simultánea de varios microorganismos, pero se debe tener en cuenta que pueden existir problemas de accesibilidad a ciertas regiones del ARN, causados por proteínas ribosómicas o problemas en la permeabilización celular. Después de la unión de la sonda con las secuencias diana, se pueden cuantificar las señales emitidas con una cámara sensible a la luz, conectada a un analizador digital de imágenes. Es una técnica que permite diferenciar especies dentro de una misma muestra, utilizando sondas específicas para cada especie y diferentes fluoróforos. Permite la detección de levaduras (Stender *et al.*, 2001) y bacterias alterantes del vino (Blasco *et al.*, 2003) (Figura 4).

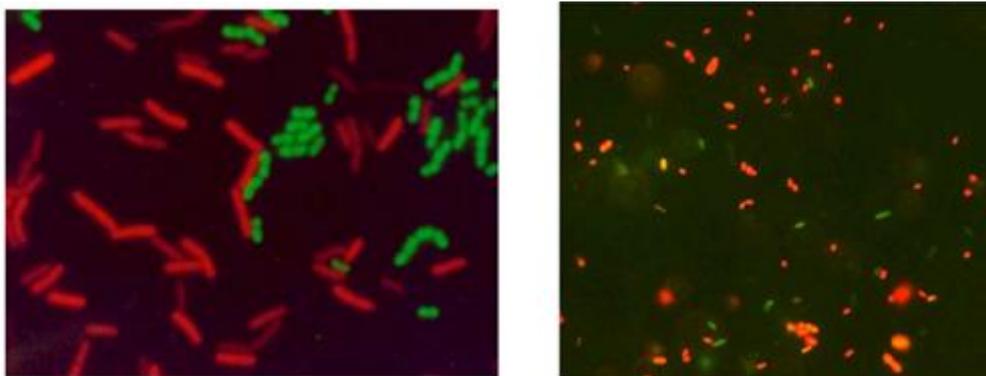


Figura 4. A la derecha, imagen obtenida por FISH de bacterias lácticas en un vino. *Lactobacillus plantarum* hibridados con la sonda LU2 marcada con rodamina (rojo) y *Lueconostoc mesenteriodes* con fluoresceína; A la izquierda Fotografía de fluorescencia de la evolución de las bacterias ácido acéticas en un vino. Se aprecian las células muertas en rojo y las vivas en azul. (Fuente: Bottari *et al.*, 2006)

Esta técnica se ha utilizado para el seguimiento de la población bacteriana durante la vinificación y guarda de vinos (Sohier y Lonvaud-Funel, 1998) La técnica FISH y usando la sonda específica de la familia *Acetobacteraceae* (AABr), permite la detección de células viables no cultivables (Bottari *et al.*, 2006), y para estudiar la diversidad poblacional de levaduras durante la fermentación (Xufre *et al.*, 2006).

Cariotipo o separación de cromosomas en PFGE: La técnica se basa en la separación de cromosomas en electroforesis de campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis) que provoca una reorientación molecular del ADN, que es diferente dependiendo de su tamaño molecular. Las diferentes cepas de una misma especie presentan una gran variabilidad en número y tamaño de cromosomas, presentando cariotipos diferentes. Existen varios trabajos centrados en la caracterización de levaduras mediante el análisis de este tipo de polimorfismos. El primer cariotipo electroforético completo fue realizado en *Saccharomyces cerevisiae* (Carle y Olson, 1985), separándose sus 16 cromosomas con tamaños comprendidos entre 200 kb y más de 2Mb. Recientemente, y ante la estandarización de nuevas técnicas, la

cariotipificación de cromosomas de levaduras resulta muy útil para generar perfiles específicos para la caracterización de cepas, sin embargo los polimorfismos presentes entre diferentes especies, restringe su uso en el análisis de un gran número de levaduras contaminantes; además, la complejidad y larga duración del proceso, junto con el equipamiento especializado necesario, limitan aún más su aplicabilidad para la caracterización rutinaria en levaduras (El Hage & Houseley, 2013). Esta técnica se puede utilizar para tipificar cepas de *Dekkera bruxellensis* aisladas de vino (Mitrakul *et al.*, 1999) y prevenir las grandes pérdidas económicas que deja el deterioro del vino por esta levadura. La cariotipificación mediante PGFE, también se aplica en la identificación de cepas de interés en las fermentaciones vnicas (Puig *et al.*, 2000). Ferreira y colaboradores, (2009) evaluaron la diversidad y dinámica de la población de levaduras durante la fermentación.

Análisis de perfiles de restricción del ADN mitocondrial: El análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha desarrollado en *S. cerevisiae* basado en las diferencias en el contenido de G+C existentes entre el ADN nuclear (ADNn) y el ADNmt, ya que en el ADNn este es de un 40%, mientras que en el ADNmt es solo de un 20%. Esto permite realizar un análisis de restricción al ADN total, utilizando las enzimas específicas para reconocer las regiones ricas en G+C: el ADNn sufre numerosas rupturas, generándose numerosos fragmentos de muy pequeño tamaño, los cuales no se discriminan en geles de agarosa. De esta manera, mediante una electroforesis de ADN total digerido con estas endonucleasas solo se observan los fragmentos correspondientes al ADNmt ubicados según su tamaño y mostrando perfiles específicos (Querol *et al.* 1992; Orberá T., 2004) (Figura 5).

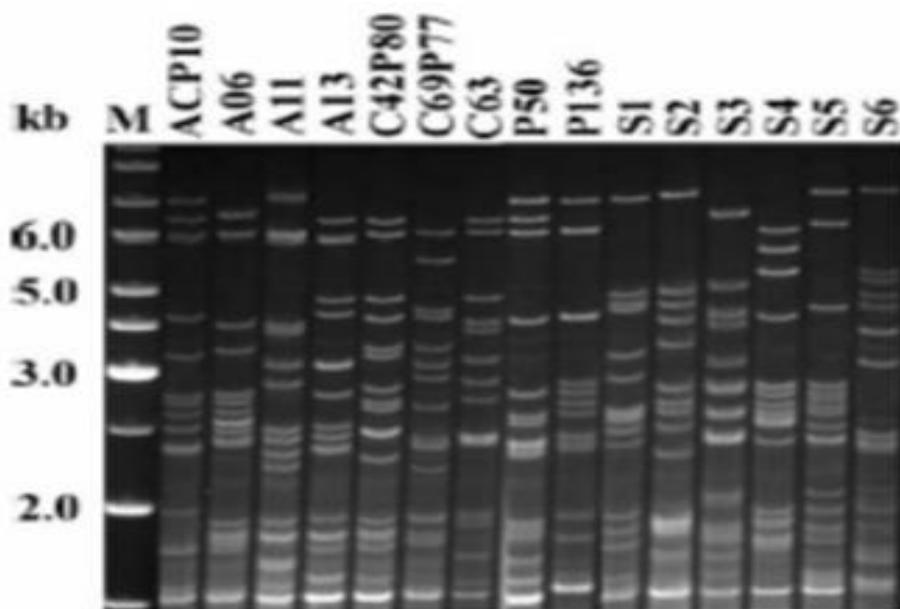


Figura 5. Perfiles de restricción (enzima *Hinf* I) el ADN mitocondrial de cepas de *Saccharomyces* aisladas de fermentaciones espontáneas de mostos (Fuente: Schuller *et al.*, 2005)

Esta técnica permite diferenciar cepas no solo dentro del género *Saccharomyces*, sino sobre otras levaduras de interés enológico como, *Brettanomyces* o *Zygosaccharomyces*. (Vezinhet *et al.*, 1990; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2009). Investigadores de la Universidad de Valencia demostraron la utilidad de la técnica para determinar la autenticidad de las cepas comerciales que se usan en las fermentaciones dirigidas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Fernandez-Espinar *et al.*, 2003), así como también para realizar el seguimiento a las fermentaciones y diferenciar las cepas comerciales de la flora nativa contaminante.

5.1.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DERIVADAS DE LA PCR

Reacción en cadena de la polimerasa o PCR: Utilizando un termociclador (horno termostático que permite definir con altísima precisión las temperaturas y los tiempos de exposición del ADN a ellas) se separan las dos cadenas de ADN, unirles fragmentos específicos de ADN que se usan como cebadores o iniciadores y copiar literalmente y con alta precisión las dos hebras de una región particular del ADN, obteniéndose una copia de dicha región. Este proceso se repite de forma cíclica, lo que da como resultado una amplificación exponencial del fragmento del ADN inicial comprendido entre las secuencias complementarias de las secuencias de interés y se generan millones de copias de la región original. Posteriormente estos fragmentos amplificados se someten a electroforesis, que inicialmente eran en gel de poliacrilamida y posteriormente en otros polímeros y en soportes capilares, y se separan según su carga y tamaño (Mullis, 1990). Esta técnica se emplea en la caracterización e identificación de levaduras (Cocolin *et al.*, 2002). y bacterias vínicas (Bartowsky *et al.*, 1999), también en estudios de biodiversidad (Amann *et al.*, 1996) (Figura 6).

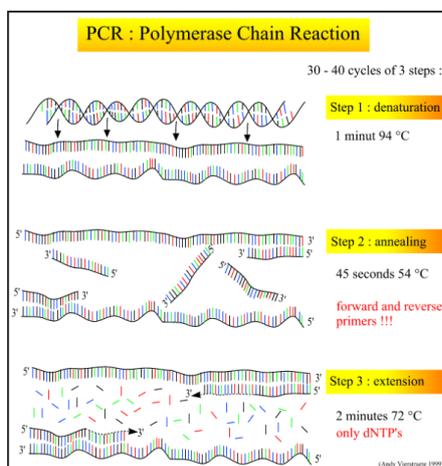


Figura 6. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las temperaturas y los tiempos indicados pueden variar dependiendo de las características del ADN que se desee amplificar (Fuente: Andy Vierstraete, 1999)

PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR): La qPCR es una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación, cuando se usan cebadores marcados. La PCR cuantitativa ofrece la posibilidad de detectar, en tiempo real, el nivel de amplificación de una secuencia de interés, con el objeto de estimar la cantidad de esa secuencia presente en la muestra original. En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Un punto que debe tenerse en cuenta al utilizar esta técnica es que no diferencia entre células viables y no viables debido a que el ADN sigue presente aún después de la muerte celular. A diferencia de la PCR convencional, la qPCR es más rápida y menos laboriosa ya que no requiere la visualización de los productos obtenidos en gel, y esto además reduce el riesgo de contaminación post-PCR (Heid *et*

al., 1996; Schaad y Frederick, 2002). Por otra parte, la qPCR tiene un mayor rango de amplificación de la molécula diana, siendo la detección del ADN diana más precisa (Jordan, 2000; Kabir *et al.*, 2003). Esta técnica se ha utilizado para la cuantificación de bacterias acéticas (González *et al.*, 2003) y levaduras (Hierro *et al.*, 2006), directamente del vino. Otras aplicaciones de esta técnica para la cuantificación y detección de microorganismos del vino han sido: detección de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* (Phister *et al.*, 2003), *S. cerevisiae* (Martorell *et al.*, 2005), y determinar cuantitativamente la concentración de bacterias lácticas pertenecientes a especies de *Oenococcus oeni* en vinos (Neeley *et al.*, 2005). Esta técnica permite la cuantificación directa de microorganismos perjudiciales para el vino tanto durante, como al final de la vinificación y después del embotellado (Martorell *et al.*, 2005; Phister *et al.*, 2003).

Microsatélites: Los microsatélites son regiones que contienen repeticiones en serie de secuencias cortas de nucleótidos. Estas regiones están distribuidas a lo largo del genoma de la mayoría de los eucariotas y son altamente variables entre especies. Este elevado polimorfismo hace que los microsatélites sean unos buenos marcadores moleculares para la identificación intra e ínter específicas. La variabilidad de estas secuencias es detectada mediante la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Se obtienen entonces perfiles de amplificación que permiten distinguir cepas de una misma especie (Carro *et al.*, 2007). Los carriles 3, 5 y 6 corresponden con individuos de la misma cepa, mientras que el resto de carriles muestran el perfil de otras cepas distintas, como producto de la dinámica de la poblacional del interior de un tanque fermentativo (Figura 7).

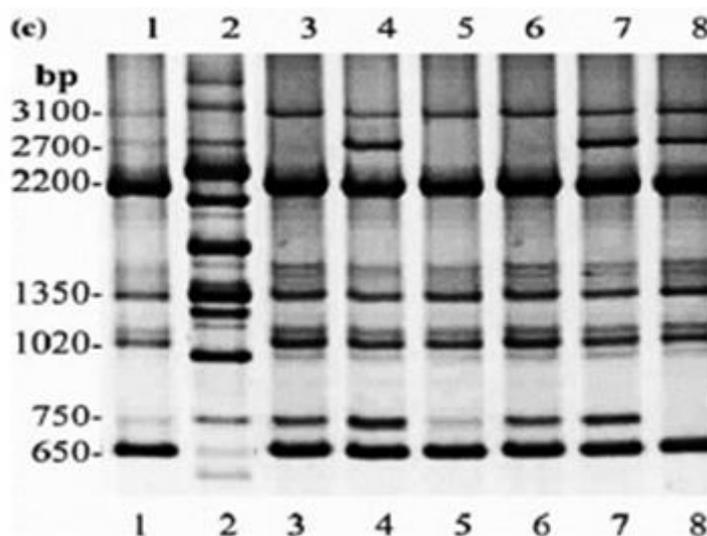


Figura 7. Patrones moleculares microsatélites de 8 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. (Fuente: Da Silva Filho *et al.*, 2005)

Esta técnica es usada con frecuencia para la descripción de especies nuevas (Valente *et al.*, 2012; Praet *et al.*, 2015) y caracterización intraespecífica tales como *Candida milleri* (Vigentini *et al.*, 2014) y *Torulasporea delbrueckii* (Canónico *et al.*, 2015).

Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR): La técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic ADN-PCR) consiste en amplificar determinadas regiones del ADN mediante la utilización de oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria. Estos oligonucleótidos hibridan de manera frecuente con diferentes lugares del genoma, lo que permite la amplificación de fragmentos de ADN que resultan muy polimórficos (Figura 8). Para cada cepa se obtiene un número determinado de amplificaciones (amplicones) de diferente tamaño, lo que permite diferenciar entre cepas. La gran ventaja de esta técnica es que no es necesario disponer de

información previa de ninguna secuencia determinada. Sin embargo, su principal inconveniente es la baja reproducibilidad de los resultados. Se ha utilizado esta técnica en estudios de implantación de cepas *Saccharomyces cerevisiae*, para estudios taxonómicos del grupo *Saccharomyces* y también para la caracterización de estirpes no-*Saccharomyces* (Baleiras Couto *et al.*, 1994). A medida que se han ido conociendo más secuencias de todo tipo de organismos, esta técnica ha ido perdiendo su ventaja y ha ido cayendo en desuso.

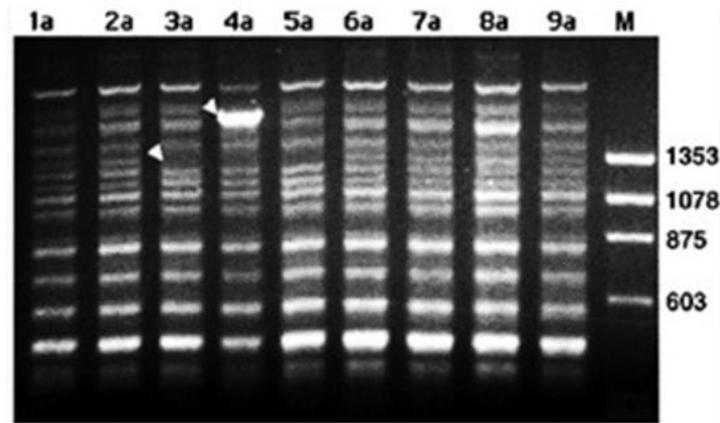


Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa con perfiles de amplificación mediante RAPD obtenido con 9 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Carril M: marcador de peso molecular. Las flechas indican las bandas polimórficas. (Fuente: Gallego *et al.*, 2005)

Análisis de la secuencia del ADN ribosómico: Los genes ribosómicos junto con las regiones que los separan, ya sean transcritas (espaciadores internos transcritos o ITS, de Internal Transcribed Spacer) o no transcritas (regiones externas o NTS, de Non-Transcribed Sequences) presentan una secuencia bastante conservada a nivel de género y especie en los organismos eucariotas (Figura 9).

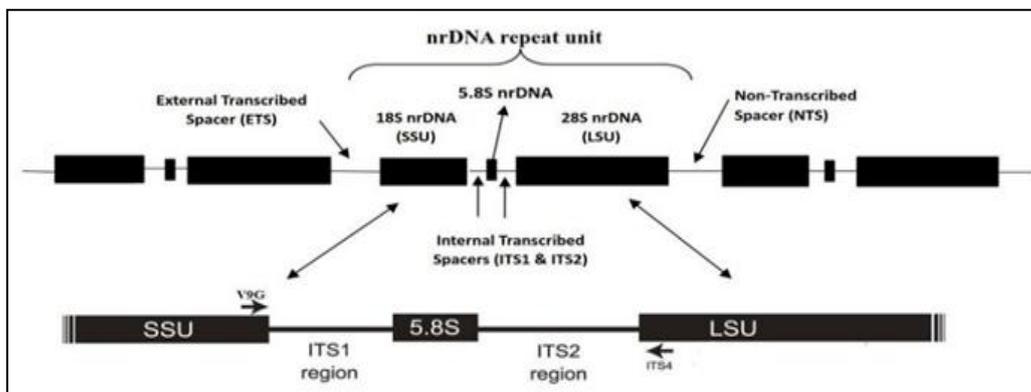


Figura 9. Representación gráfica de los genes del ADNr de hongos y ubicación de distintos cebadores para su amplificación por PCR (imagen modificada de White *et al.*, 1990).

Estas regiones se amplifican por PCR, utilizando cebadores específicos de las regiones más conservadas. La diferencia entre secuencias se detecta mediante un análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando endonucleasas de restricción diferentes, tales como *Cfo* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Dde* I, *Mbo* I. Estas enzimas realizan una digestión para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes, los cuales se separan mediante electroforesis en geles de agarosa en función de la masa o a la carga eléctrica de las muestras según la técnica utilizada. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para cada ADN donde los sitios de restricción varían según los individuos (Figura 10).

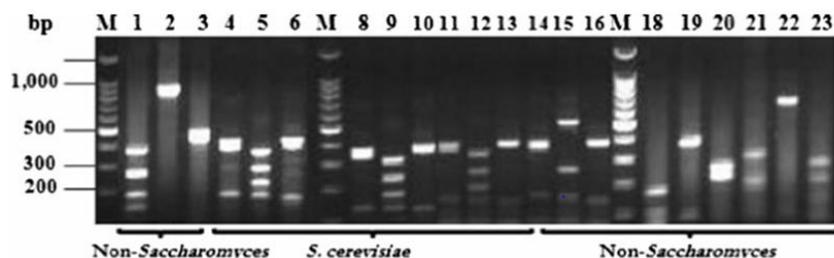


Figura 10. Perfil RFLP de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y de levaduras *no-Saccharomyces*. M; escala de ADN de 100pb. Carriles 1, 4, 8, 11, 14, 18 y 21, digestión de PCR con *Cfo* I. Carriles 2, 5, 9, 12, 15, 19 y 22, digestión de PCR con *Hae* III. Carriles 3, 6, 10, 13, 16, 20 y 23, digestión de PCR con *Hinf* I. (Fuente: Orberá, 2004)

Esta técnica fue utilizada por Guillamón *et al.* (1998) para la identificación rápida de las levaduras del vino, y luego se extendió a las levaduras asociadas con otros alimentos y bebidas (de Llanos *et al.*, 2004; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000). Por ejemplo, la enzima *Dde* I permite diferenciar entre *Hanseniaspora uvarum* de *H. guilliermondii*, como fue señalado por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y Cadez *et al.*, 2002; mientras que la enzima *Mbo* I es necesaria para distinguir *Cándida zemplinina* de *C. stellata* (Sipicki, 2004). Debido a la gran variabilidad que presentan estas regiones, se trata de análisis genéticos muy útiles para establecer relaciones filogenéticas y diferenciar especies y cepas de levaduras (Carro *et al.*, 2007; Hierro 2007).

Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP): La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) se basa en la amplificación selectiva mediante PCR de una parte del total de fragmentos de restricción obtenidos mediante la digestión total del ADN de un organismo. La detección del polimorfismo se observa en un gel de poliacrilamida o a través de electroforesis capilar. Esto genera perfiles específicos cada individuo, como por ejemplo los carriles 1, 3, 5, 7, 9 corresponden al perfil específico de cepas de *Cándida zemplinina*, el 2, 4, 6, 8, 10 a cepas de *Hanseniaspora uvarum*, el 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y los carriles 18, 19 y 20 a cepas de *Hanseniaspora vineae* (Figura 11).

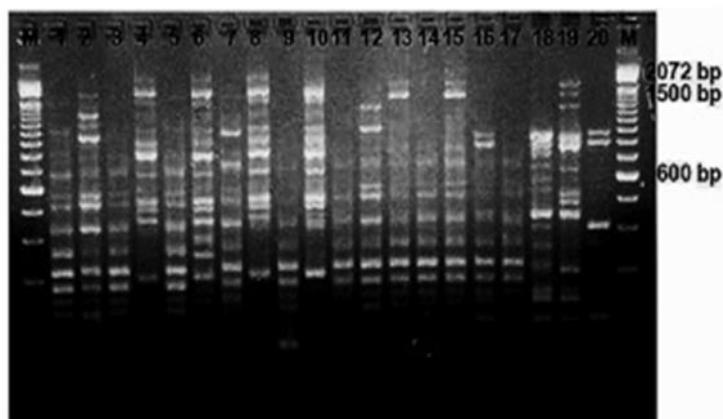


Figura 11. AFLP simplificado en gels de agarosa. Carril M: marcador de peso molecular. (Fuente: Esteve- Zarzoso *et al.*, 2010)

Los AFLPs son una técnica útil para discriminar levaduras a nivel cepa-específico (de Barros *et al.*, 1999). Es una técnica muy sensible y reproducible, pero requiere alta inversión y personal especializado, por lo que no es muy utilizada en enología (Baselga *et al.*, 2015).

Secuencias delta (δ): Estos elementos son secuencias de 330 pares de base que están distribuidos de manera frecuente en el genoma de las levaduras. Su número y posición en el genoma de las levaduras son específicos de cada cepa y estables aproximadamente durante 50 generaciones. La variabilidad intraespecífica que otorga el número y la localización de estos elementos fue aprovechada por Ness *et al.*, (1993) para diseñar iniciadores específicos ($\delta 1$ y $\delta 2$) para la amplificación por PCR de las regiones delta, útiles para diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores muestran que la estabilidad de los elementos δ es suficiente para aplicar esta técnica como método de identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial. Algunos de estos trabajos muestran la gran variabilidad que revela esta técnica entre aislados de la especie *S. cerevisiae* con respecto a otras técnicas muy resolutivas como el análisis de restricción del ADNmt y la electroforesis de cromosomas (Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Pramateftaki *et al.*, 2000).

Es de resaltar que los elementos delta (δ) no están presentes en levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que esta técnica está limitada para *Saccharomyces cerevisiae* (Carro *et al.*, 2007), como se puede observar en la figura 12, el carril 1 es el marcador del peso molecular, los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 corresponden a los perfiles moleculares de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mientras que el carril 9 corresponde a alguna cepa de *Cándida*, por lo que hay ausencia de bandas.

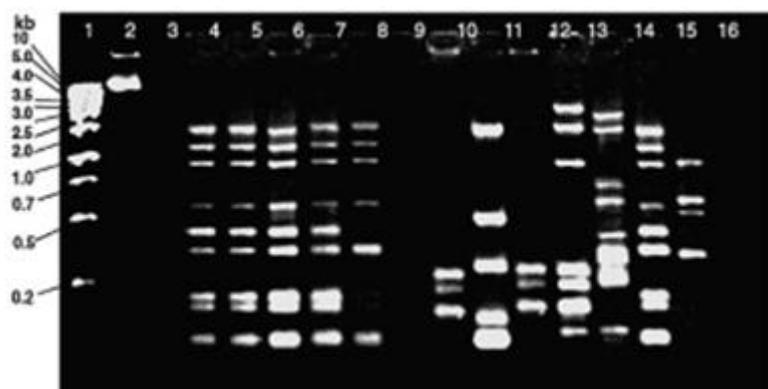


Figura 12. Identificación de cepas mediante huella genética del perfil molecular interdelta, obtenido a partir del ADN genómico de levaduras nativas de tanques fermentativos, por amplificación vía PCR con primers específicos de secuencias de los elementos delta (δ) (Fuente: Vasquez *et al.*, 2016).

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) o con gradiente de temperatura (TGGE): La aplicación de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) es quizás la técnica más comúnmente utilizada para obtener las “huellas digitales” (fingerprinting), realizada sin necesidad de cultivo en placa. La DGGE y la TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura) están basadas en la separación de productos de la PCR con igual tamaño pero diferentes secuencias, característicos de los productos de amplificación de genes ribosómicos mediante cebadores específicos. Los agentes desnaturizantes son una mezcla de urea y formamida para el DGGE y la temperatura para el TGGE (Cocolin *et al.*, 2000). Con ambas técnicas es posible separar incluso fragmentos que difieren en una sola base. Por ejemplo, en las figuras 13 A y B para la amplificación se utilizaron los cebadores NL1-NL2. En la figura A se muestran los perfiles moleculares de cepas tipo de levaduras. Del 1 al 7: *Candida stellata*, *Pichia anómala*, *Kluyveromyces thermotollerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* y *Brettanomyces anomalus*. En la figura B se muestra Perfiles DGGE obtenidos de cepas tipo de levaduras, y mosto al inicio de fermentación. Del 1 al 5: *Kluyveromyces thermotollerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis*, muestra de mosto al inicio de fermentación.

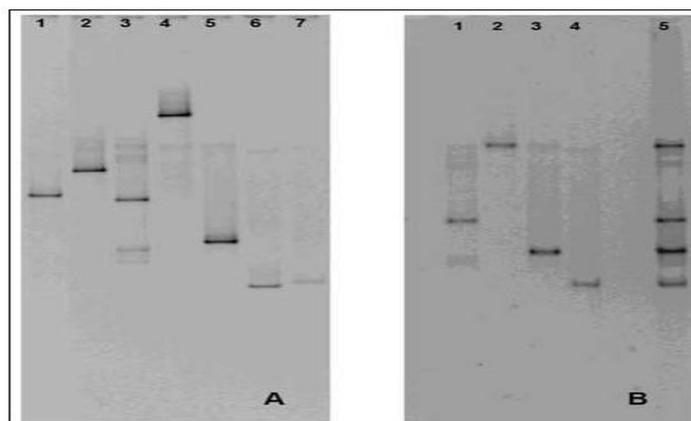


Figura 13. A: Perfiles DGGE obtenidos de cepas tipo de levaduras.
B: Perfiles DGGE obtenidos de cepas tipo de levaduras, y mosto al inicio de fermentación. (Fuente: Cocolin *et al.*, 2000)

El DGGE ha sido utilizado para evaluar la diversidad de levaduras en fermentaciones procedentes de uvas afectadas por *Botrytis* (Millet *et al.*, 2000), confirmar la presencia de *Brettanomyces bruxellensis* y *Brettanomyces anomalus* en muestras de vino (Cocolin *et al.*, 2004) y para examinar bacterias durante la fermentación vínica (López *et al.*, 2003).

5.2. CASOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LOS VINOS

A continuación, se presentan una serie de casos prácticos en los que se han aplicado técnicas moleculares independientes de cultivo o de secuenciación masiva, para el estudio de la microbiota presente en vinos, concretamente, sobre los microorganismos causantes de desviaciones organolépticas, en particular *Brettanomyces/Dekkera* (5.2.1) o alterantes de la calidad sanitaria de los vinos por la presencia de alguna sustancia tóxica (5.2.2). Esta información aparece ampliada con más detalle en el Anejo 2, en el cual aparecen recogidas las técnicas moleculares adoptadas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino para la identificación de microorganismos.

5.2.1. ALTERANTES DE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA O PERFIL SENSORIAL. CASO DE *BRETTANOMYCES/DEKKERA*

Como ya se ha mencionado anteriormente, los principales microorganismos que pueden llegar a producir desviaciones organolépticas pueden ser propios de la uva o contaminantes. Entre estos microorganismos se encuentran distintas especies de levaduras aerobias oxidativas de etanol, levaduras anaerobias facultativas no oxidativas de etanol, bacterias ácido acéticas y bacterias ácido lácticas. En este apartado, nos centraremos en los artículos que muestran el uso de técnicas concretas para caracterizar levaduras pertenecientes a los géneros *Brettanomyces/Dekkera*, ya que suponen la mayor tasa de contaminación en vinos.

Al igual que el apartado 5.1 en primer lugar se citan las técnicas anteriores a la PCR y después las posteriores a la PCR.

Entre los métodos moleculares anteriores a la PCR, el RFLP-PCR es el que más se ha utilizado para la identificación de levaduras *Brettanomyces bruxellensis* y *Dekkera bruxellensis* en vinos. Se trata de un método dependiente del cultivo porque requiere la extracción de ADN a partir de un cultivo puro. Se basa en la amplificación de regiones específicas de las unidades de repetición del ADN, como los espaciadores transcritos internos, ITS1 e ITS2 o el gen ARNr 5,8S situado entre los espaciadores. En la figura 14 se representan genes del ADN ribosómico, regiones que contienen secuencias con

alto grado de conservación, y secuencias intergénicas, que presentan una gran variabilidad genética entre cepas de la misma especie ya que no acumulan mutaciones, permaneciendo intacta en cada individuo.

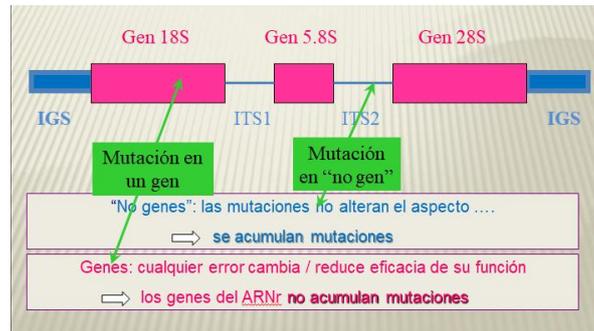


Figura 14. Esquema de las regiones de los genes ribosómicos con alto nivel de conservación y secuencias intergénicas. (Fuente: Imagen cedida por E. Hidalgo)

En la mayoría de los casos, los productos amplificados por PCR de cepas de la misma especie y del mismo género tienen tamaños moleculares idénticos, y las especies del mismo género tienen tamaños similares. Aun siendo del mismo tamaño, la secuencia de estas regiones amplificadas difiere dependiendo de las especies.

Aunque distintos autores han utilizado los enzimas de restricción que mejor se comportaban en cada caso, (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Ratón, 2004) utilizaron dos enzimas de restricción el *Hae* III y *Hinf* I. La correspondiente identificación de los perfiles obtenidos se realizó utilizando patrones de cepas conocidas de *Brettanomyces* spp. y *Saccharomyces* spp. En la figura 15 se observan los perfiles de restricción de los amplificados de la región 5.8S-ITS, en la imagen de la derecha digeridos con la enzima *Hinf* I y en la imagen de la izquierda con la enzima *Hae* III, confirmando que ambas son aptas para definir los perfiles moleculares de *Brettanomyces*, puesto que las bandas coinciden con las del patrón de *Brettanomyces* en ambos casos.

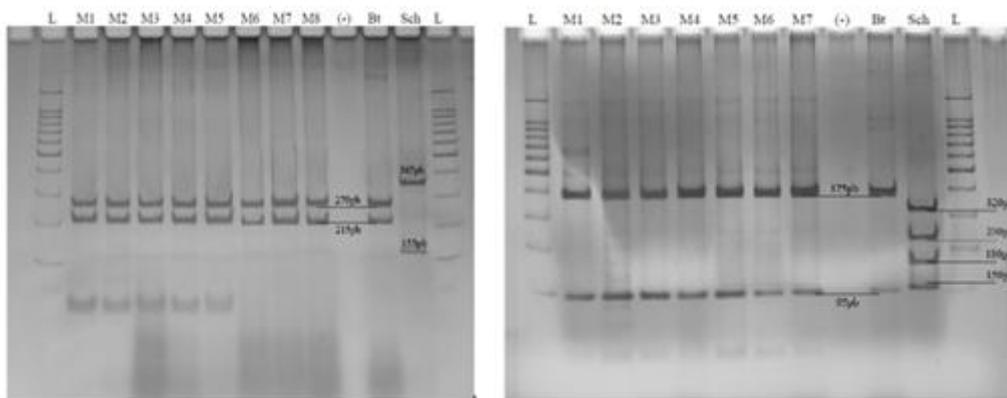


Figura 15. En la imagen de la derecha Minigel de poliacrilamida de los perfiles de restricción de los amplificados de la región 5.8S-ITS digeridos con *Hinf* I. En la imagen de la izquierda Minigel de poliacrilamida de los perfiles de restricción, de los amplificados de la región 5.8S-ITS digeridos con *Hae* III. (Fuente: Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999)

En cuanto a los métodos moleculares posteriores a la PCR, se ha utilizado con éxito la PCR cuantitativa o qPCR. Esta técnica permite la detección y la cuantificación de levaduras a nivel de especie en mosto o vinos de una forma rápida, específica y sensible, con unos límites de detección inferiores a 10 UFC/mL. (Tofalo *et al.*, 2012, Willenburg *et al.*, 2012). No requiere de un enriquecimiento previo de la muestra. Además, permite identificar microorganismos en estado VNC. En el caso revisado, se utilizaron cebadores universales de levaduras designados en los campos variables D1/D2 del gen ARNr 26S. La cuantificación es posible a partir de la determinación del

número de ciclos de polimerización necesarios para superar una señal umbral. Cuanto más elevada sea la concentración de ADN de la especie objetivo en la muestra, menor será el número de ciclos necesarios para traspasar el umbral. Las curvas de calibración permiten una cuantificación precisa. Esta técnica se ha usado para el recuento de células de *Zygosaccharomyces* con límites inferiores a 5 UFC/mL (Rawsthorne *et al.*, 2006). También se ha usado para la identificación y cuantificación de distintas levaduras en fermentaciones mixtas, utilizando cebadores específicos de para *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Dekkera bruxellensis*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima* (Zott *et al.*, 2010).

Sin embargo, como ya se ha dicho anteriormente, esta técnica no permite distinguir entre células vivas y muertas. Esto se ha resuelto mediante el uso de bromuro de etidio monoácido (EMA) y bromuro de propidio monoácido (PMA) para la detección de ADN por qPCR en tiempo real de células vivas solamente (Andorrà *et al.*, 2010; Rawsthorne y Phister, 2009b). El PMA es un agente de intercalación de ADN capaz de penetrar en la membrana de las células muertas, al ser ésta más permeable, unirse al ADN e impedir su replicación (Vendrame *et al.*, 2014).

Otro método alternativo de solución para este inconveniente es la aplicación de la RT-qPCR. Esta técnica está dirigida a la replicación del ARN mensajero (ARNm), moléculas mucho más inestables que el ADN o que incluso el ARN ribosómico (ARNr). Se basa en el calentamiento durante 20 minutos de las muestras, lo cual degrada completamente el ARNm presente en las muestras. A partir de ese momento, solamente las células vivas producen nuevas moléculas de ARNm, que se identifican mediante qPCR después de ser sometidas a transcripción inversa para sintetizar su ADN complementario. Ambos métodos descritos son cuantitativos (Hierro *et al.*, 2006, Vendrame *et al.*, 2014) y de esta manera, permiten realizar ensayos para medir la susceptibilidad de *Brettanomyces bruxellensis* a distintos tratamientos antimicrobianos comparando las células vivas con las células muertas (Willenburg *et al.*, 2012).

5.2.2. ALTERANTES DE LA SEGURIDAD SANITARIA DE LOS VINOS

En este caso se han desarrollado estrategias para la identificación de los microorganismos concretos productores de sustancias que alteran la seguridad sanitaria como son: a) las bacterias lácticas productoras de aminas biógenas, b) los hongos filamentosos productores de micotoxinas, en concreto la Ocratoxina A y c) las bacterias lácticas implicadas en la formación del carbamato de etilo. A su vez las técnicas se sucederán en el orden cronológico seguido en los apartados anteriores, según sean anteriores o posteriores a la PCR.

a) MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS EN EL VINO

Para la identificación y cuantificación de cepas productoras de aminas biógenas en el vino se han usado principalmente PCR convencional y qPCR o PCR cuantitativa.

Lucas *et al.* (2008) desarrollaron un método para extraer el ADN de las muestras de vino, que posteriormente puede ser amplificado mediante PCR y los productos amplificados son analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa que se revela con luz ultravioleta UV después de la tinción con bromuro de etidio. El método consiste en la detección de cepas específicas de bacterias ácido lácticas que contienen los genes concretos que codifican las enzimas involucradas en la producción de aminas biógenas en el vino y la desaminasa de la agmatina que produce putrescina, amina biógena alterante de las característica organolépticas de los vinos por dotarles de olores desagradables.

Landete *et al.*, 2005 utilizó el gen *hdcA* que codifica la enzima histidina decarboxilasa (HDC; EC 4.1.1.22), para el que se han diseñado cebadores específicos que permiten

su amplificación por PCR. Entre las cepas productoras de histamina se han aislado algunas de *Pediococcus* () y *Oenococcus oeni* (Coton *et al.*, 1998a). Los genes productores de este enzima No es una característica general de estas especies, lo que explica porqué en otros estudios no se han encontrado cepas de *O. oeni* productoras de aminas biógenas (Constantini *et al.*, 2006; Moreno-Arribas y Polo, 2008).

Moreno-Arribas *et al.*, 2000 afirmó que el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (TDC, EC 4.1.1.25) está más presente en Lactobacilos heterofermentativos (principalmente *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus brevis*). Lucas y Lonvaud-Funel (2002) diseñaron una serie de primers degenerados para la detección de fragmentos de gen *tdc* en cepas *Lactobacillus brevis*. Más recientemente, se diseñaron nuevos cebadores (Marcobal *et al.*, 2005; Constantini *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2003).

El gen que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) cataliza la conversión de ornitina en putrescina. Marcobal *et al.*, (2004) a partir de la secuenciación nucleotídica correspondiente, obtenida por cebadores específicos, describieron la identificación de un gen de ornitina descarboxilasa (*odc*) en una cepa de *O. oeni* productora de putrescina. Varias series de primers que detectan específicamente cepas de *Oenococcus oeni* productoras de putrescina han sido propuestos por Marcobal *et al.*, (2005) y Granchi *et al.*, (2006). Pero la putrescina también se puede formar por desaminación de la agmatina. Lucas *et al.*, (2007) describieron las secuencias de los primers que amplifican el gen correspondiente.

El resultado no puede indicar las concentraciones finales de AB, pero el riesgo de contaminación por AB está relacionado con la presencia de genes y con el nivel de la población de bacterias. (Lucas *et al.*, 2008). La qPCR se usa además de para detectar las bacterias productoras de histamina, tiramina y putrescina en los vinos, para cuantificarlas (Lucas *et al.*, 2008; Nannelli *et al.*, 2008). La detección de los genes que codifican los enzimas responsables de la producción de aminas biógenas, como el de la histidina descarboxilasa (*hdc*) en el caso de la histamina, puede ser una herramienta para la selección de cepas de *O. oeni* que carezcan de estos genes (Coton *et al.*, 2010).

b) MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS EN EL VINO

Los distintos métodos comúnmente empleados para la identificación de hongos filamentosos anteriores a la PCR, incluyen los que se basan en polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción y de fragmentos amplificados (RFLPs y AFLPs, respectivamente), y en la amplificación de fragmentos de regiones genómicas no codificantes del ADN ribosómico como el espaciador interno transcrito (ITS) (Edwards *et al.*, 2002; Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007).

RFLPs: Dependiendo de la región amplificada, su tamaño o nivel de variabilidad se aplica para la diferenciación de cepas, entre especies o géneros. En el caso de hongos filamentosos, se ha empleado, entre otros, para distinguir especies dentro del género *Aspergillus*, de la sección *Nigri* (Accensi *et al.*, 1999; Martinez-Culebras y Ramon, 2007).

AFLPs: El polimorfismo para la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs, "Amplified Fragment Length Polymorphism") fue descrito por primera vez por Vos *et al.*, 1995, y ha resultado ser una herramienta muy útil para la identificación de especies y subespecies de hongos filamentosos, como *Aspergillus* o *Fusarium* (Chulze *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003; Perrone *et al.*, 2006). Las ventajas de esta técnica son los elevados niveles de polimorfismo que pueden detectar, sin embargo esta técnica es de implementación compleja, por lo que se ha ido sustituyendo progresivamente por otras, derivadas de la secuenciación masiva.

La técnica de PCR ha constituido una alternativa muy importante a los antiguos procedimientos moleculares de identificación fúngica. Debido a su alta sensibilidad requiere muy poca cantidad de DNA molde, permitiendo detectar moléculas diana en mezclas complejas. Por ello, está siendo utilizada para la detección y en algunos casos cuantificación directa de especies productoras de micotoxinas.

PCR con cebadores específicos: La detección de hongos productores de toxinas mediante PCR es rápida, sensible y específica, y puede estar basada en secuencias relacionadas o no con la toxina producida (Gonzalez-Jaen *et al.*, 2004). Las regiones más empleadas actualmente para la distinción entre especies de hongos filamentosos son las del ADN ribosómico (ADNr) (White *et al.*, 1990). De este modo, se han desarrollado protocolos de detección por PCR basados en las regiones ITS, lo que la hacen idónea para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas en hongos filamentosos (White *et al.*, 1990; Henry *et al.*, 2000; Parenicova *et al.*, 2001) y para identificar especies productoras de toxinas como *Aspergillus* y *Penicillium* (Rath y Ansorg, 2000; Sugita *et al.*, 2004).

PCR a tiempo real: Esta técnica, ya descrita anteriormente, ha sido empleada para detectar la expresión de diversos genes fúngicos bajo diferentes condiciones fisiológicas (Edwards *et al.*, 2002). En el caso de hongos productores de toxinas, se han monitorizado la expresión de los genes implicados en su biosíntesis (Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007). Así, se ha empleado para hongos especies de *Aspergillus* productoras de OTA (Dao *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2012).

Por otra parte, Cueva *et al.*, (2012) demostraron mediante esta técnica la capacidad de determinadas cepas de hongos filamentosos de segregar enzimas amina oxidasa que degradan las aminas biógenas, como *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*. Incluso, se ha observado la expresión genética sintetizadora de estas enzimas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

c) MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS IMPLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE CARBAMATO DE ETILO EN EL VINO

Por último, respecto a la detección de bacterias ácido lácticas implicadas en la producción de carbamato de etilo, las técnicas más ampliamente utilizadas son la PCR y sus derivadas como qPCR.

El mecanismo de formación del carbamato de etilo (CE) en vinos ya se describió en el apartado 2.2 de la introducción. Los tres enzimas implicados en su producción, la arginina-deiminasa (ADI), la ornitina-descarboxilasa (OTC) y la carbamato-quinasa (CK) están bien caracterizados en las BL del vino y se sabe que están codificados por tres genes (*arcA*, *arcB* y *arcC* respectivamente), cuya secuencia es conocida. A partir de ella se han diseñado cebadores específicos que permiten identificar su presencia en muestras complejas mediante amplificación por PCR. Por ejemplo, para la amplificación del gen *recA*, Rodríguez *et al.*, 2007 utilizaron oligonucleótidos degenerados, es decir presenta en una o varias posiciones, tripletes de bases correspondientes a varios aminoácidos. Cuanto más degenerado esté el cebador, menos específico será a la hora de unirse en el sitio que nosotros buscamos. En ese caso se usaron oligonucleótidos basados en dominios conservados en las proteínas RecA, que amplifican un fragmento de 360 pb. Por otro lado, como se muestra en la figura 16 de la izquierda, Gurr *et al.*, 1987 demostraron la utilidad de la detección de los genes *arc* usando cebadores degenerados en un grupo representativo de especies de BL del vino como son, de izquierda a derecha: Marcador, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* y *Pediococcus pentosaceus*.

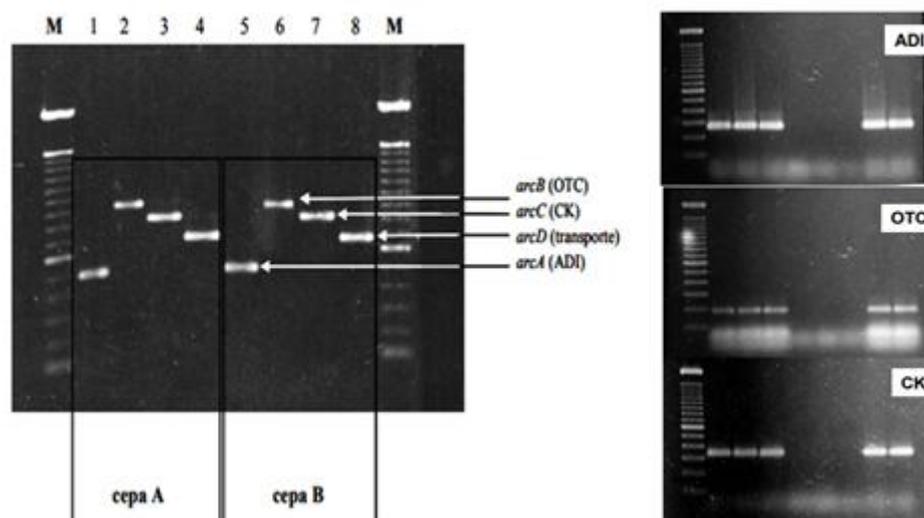


Figura 16. En la imagen de la derecha observamos una electroforesis en gel de amplificados por PCR de los 4 genes del operón ADI en dos cepas de *Oenococcus oeni*. En la figura de la izquierda se puede ver una electroforesis en gel de amplificados PCR de fragmentos de *arcA* (ADI), *arcB* (OTC) y *arcC* (CK) obtenidos con cebadores degenerados. (Fuente: Gurr *et al.*, 1987)

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Existen en la actualidad técnicas de biología molecular lo suficientemente precisas y finas como para conseguir una buena diferenciación entre las levaduras, bacterias y hongos filamentosos.

El potencial de las técnicas moleculares sobre distintos aspectos de la enología es muy amplio y aún no se ha explotado en su totalidad. En este trabajo se han evaluado distintas técnicas de biología molecular que tienen como objetivo la identificación de los microorganismos presentes en el vino, no solamente a nivel de especie, sino que algunas de ellas permiten la caracterización nivel de cepa e incluso cuantificarlas. También se ha discutido la diferencia entre microorganismos viables cultivables, viables no cultivables y no viables, relacionando las técnicas que potencialmente distinguen entre estos estados.

Lo que se hace ya de forma sistemática es el estudio de la microbiota a través de distintas formas de aplicación de la PCR y la qPCR, las cuales generalmente se apoyan en datos de secuenciación. El abaratamiento de los costes de la secuenciación y la cada vez mayor disponibilidad de bancos de datos abundantes y de libre explotación permite abordar ya nuevas aproximaciones a la ecología del vino y a su dinámica. Estas herramientas proporcionan gran cantidad de información que posteriormente permitirán al enólogo realizar un control estricto sobre las poblaciones presentes a lo largo de todas las etapas de elaboración de los vinos. De esta manera se podrán evitar posibles contaminaciones microbiológicas que puedan modificar las cualidades organolépticas del vino o alterar la calidad sanitaria por contener sustancias nocivas para la salud humana, producidas por el metabolismo de dichos microorganismos.

Sin embargo, para sacarle el máximo partido a estas tecnologías falta i) conocimiento sobre estas técnicas y de su interés en el mundo de la enología; ii) disponibilidad de bancos de datos, ya que en nuestro campo de aplicación el banco de datos más completo y conocido es el de WineSeq a través de BiomeMakers y iii) herramientas de bioinformática específicas para esto.

No obstante, La investigación en este campo permitirá seguir mejorando las técnicas actuales, así como también llevará al desarrollo de nuevas herramientas acorde a las necesidades de la industria enológica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aranda, A., Matallana E., Olmo, M. Levaduras *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. En: Carrascosa, A.; Muñoz, R. y González, R. Microbiología del vino. Ed. Amv. Madrid, España. 2005; P 19-56.

Arena M.E., Manca de Nadra, Muñoz, R. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arcabc* genes. Gene. 2002; 301, 61-66.

Barata A, Loureiro V. The microbial ecology of wine grape berries. International Journal of Food Microbiology 2012; 153(3):243–59.

Bartowsky E.J., Henscke P.A. Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. Australian Journal Grape Wine Res.1999; 5: 39-44.

Bartowsky E.J., McCarthy J.M., Henschke P.A. Differentiation of Australian wine isolates of *Oenococcus oeni* using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Aus. J. Of Grape and Wine Res. 2003; 9, 122-126.

Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, Fleet GH, Henschke PA. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology. 2003; 36:307–314.

Beneduce L, Romano A, Capozzi V, Lucas P, Barnavon L, Bach B, Spano G. (2010). Biogenic amine in wines. Ann of microbiology. 2010; 60(4), 573-578.

Bergsveinson J, Kajala I, Ziola B. Next-generation sequencing approaches for improvement of lactic acid bacteria-fermented plant-based beverages. 2017; (3 November 2016): 8–24.

Blasco L., Ferrer S.; Pardo I. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett.. 2003; 225, 115-123.

Bokulich NA, Joseph CML, Allen G, Benson AK, Mills DA. Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. 2012; 7(5):3–12.

Carro, D.; Piña, B. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. ACE Revista de Enología. 2007; Nº 84.

Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, Cocolin L, Alessandria V, Dolci P. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation during food fermentation. International Journal of Food Microbiology 2013; 167(1):29–43.

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2003. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology, 70: 1347-1355.

Combina M., Elía, A., Mercado, L., Catania C., Ganga, A., Martinez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International Journal of Food Microbiology 99, 237-243.

Coton E., y Coton M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. Journal Microbiology Meth. 2005; 63, 296-304.

Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Coton E. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*. 2010; 27(8), 1078-1085.

David V, Terrat S, Herzine K, Claisse O, Masneuf I, Lionel P, et al. High – throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Journal Ind Microbiol Biotechnol*. 2014; 41: 811–821.

De Llanos et al (2004). Identification of species of genus *Candida* by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 2004; 85: 175-185.

De Vero L, Gala E, Gullo M, Solieri L, Landi S, Giudici P. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*. 2006; 23, 809-813.

De Vero L, Giudici P. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S Rrna gene PCR-DGGE, *International Journal of Food Microbiology*. 2008.

Du Plessis, E.M., Dicks, L.M.T. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorans*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr. Microbiol*. 1995; 31, 114-118.

Esteve-Zarzoso, Belloch B.C. Uruburu F., Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1999; 49: 329–337.

Fernández-Espinar. RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacers and the 5.8 S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 2000; 78: 87-97.

Fleet, G. H. *Wine microbiology and biotechnology*. Ed. Harwood Academic Publishers gmbh, New York, USA. 1993

González A., Hierro N., Poblet M., Rozès N., Mas A., Guillamón J.M.: Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int J Food Microbiol* 2005; 102: 295-304.

Guillamon J. M., Sabate J., Barrio E., Cano J., Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol*. 1998; 169:387–92.

Hierro, N.; Tesis Doctoral: Quantificació, identificació i tipificació de llevats vínics mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona. 2007.

IARC. 2007; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 96, Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate (Urethane). Lyon, France. Decarboxylase activity and the presence of *hdc* gene. Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. París. 2007; Pp. 132.

Landete JM, Rivas B, Marcobal A, Muñoz R.; PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Ann Microbiol*. 2011; 61: 159–166.

Le Jeune C., Lonvaud-Funel A., Ten Brink B., Hofstra H., Van der Vossen J.M.B.M.; Development of a detection system for histidina Decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test», *J Appl Bacteriol*. 1995; 78: 316-326.

Liu, S.Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal Enology and Viticulture*. 1994, 45, 235-242.

- Lonvaud-funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 2001; 199: 9–13.
- Martínez-Rodríguez AJ, Carrascosa A.V. HACCP to control microbial Safety hazards during winemaking: Ochratoxin A. Food Control 2009; 20:469-75.
- Mesa MM, Macias M, Cantero D, Barja F. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. Journal of Fluorescence. 2003; 13, 261-265.
- Millet V., Lonvaud-Funel A. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Letters in Applied Microbiology. 2000; 30, 126-141.
- Palacios A, Carrillo D, Iruzubieta J, Boutou S, Fleury A, Labadie D, Chatonnet P. Las Efices Técnicas Moleculares de Identificación y Cuantificación de las Levaduras Enológicas. Enólogos. 2009; 60:1–11.
- Pardo I., Rodas A., Ferrer S. Study on populations dynamics of *Oenococcus oeni* in wine by using RFLP-PFGE. Les entretiens scientifiques Lallemand nº 6. 1998; Pp. 93-96.
- Pinto C, Pinho D, Cardoso R, Custódio V, Fernandes J, Sousa S, et al. Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. Front Microbiol. 2015; 6: 1–13.
- Ratón T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol. 2004; 21:15–19.
- Rawsthorne H, Phister TG. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. International Journal of Food Microbiology. 2006; 112:1–7.
- Renouf V., Claisse O., Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A.. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpro gene as a target for PCR-DGGE analysis. Food Microbiol. 2006; 23: 136–145.
- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D, Lovaud A. "Traité d'oenologie I. Microbiologie du vin. Vinifications". Dunod, ed., Paris. 1998
- Ribereau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud-Funel A. Handbook of Enology, vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd: West Sussex, England. 2000.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF, Córdoba JJ. A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. Food Control. 2012; 25(2):666–672.
- Sebastian P, Herr P, Fischer U. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Occurring in Must and Wine. S. Afr. J. Enol. Vitic. 2011; 32(2):300–309.
- Sipiczki M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. J. Basic Microbiol. 2004; 44 (6), 471–479.
- Suárez JA, Iñigo B. Microbiología Enológica, Fundamentos de vinificación. 3º edición. Ed Mundi-Prensa. España. 2004.
- Tofalo R, Schirone M, Corsetti A, Suzzi G. Detection of *Brettanomyces spp.* in Red Wines Using Real-Time PCR. Journal of Food Science. 2012; 77(9):545–549.
- Vendrame M, Manzano M, Comi G, Bertrand J, Lacumin L. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. Food Microbiology. 2014; 42:196–204.

Wang C, García-Fernández D, Mas A, Esteve-Zarzoso B. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing , quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:1–8.

WineSeq.com. Fenavin acoge la primera Cata del Microbioma del mundo. 2017; 11 de mayo. <https://wineseq.com/fenavin-acoge-la-primera-cata-del-microbioma-del-mundo/>

Zanol G., Baleiras-Couto M.M., Duarte F.L. Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2010; 25: 75-85.

Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torrioni, S., Dellaglio, F. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology*. 2000; 40, 351-355.

Zuzuarregui, A. Tesis Doctoral: Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de *Saccharomyces* sp. Influencia en su comportamiento durante la vinificación. IATA Valencia.2005.