

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Ecología de las levaduras de la uva al vino	3
1.2. Importancia del estudio de la población de levaduras	5
1.3. Métodos moleculares para la identificación de levaduras vínicas	5
1.3.a. Método de identificación de especies de levaduras vínicas: PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal	6
1.3.b. Método de diferenciación de cepas de <i>S. cerevisiae</i> : RFLP del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt).....	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Aislados, medios y condiciones de cultivo	10
3.2. Extracción del ADN total	11
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal.....	11
3.4. Digestiones enzimáticas	11
3.4.a. Digestión RFLP-ADNmt	11
3.4.b. Digestión del producto de amplificación de la región ITS-5.8S	12
3.5. Electroforesis en gel de agarosa y análisis de los patrones de restricción.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. Identificación de cepas de levaduras presentes en las distintas etapas del proceso de vinificación.....	14
4.2. Determinación de la especie de levadura vínica a la que pertenece cada patrón de ADNmt identificado	24
5. CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

MONITORIZACIÓN MOLECULAR DE LA ECOLOGÍA LEVADURIFORME DE LA UVA AL VINO

RESUMEN

La calidad y singularidad de un vino están estrechamente relacionadas con las poblaciones de levaduras asociadas al proceso de transformación desde la uva al vino. El principal objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la sucesión natural de especies de levaduras propio de un proceso de vinificación, realizado mediante fermentación espontánea, a partir de uva de variedad Verdejo, recolectada de una parcela de orientación sur, localizada en la D. O. Rueda. Para ello, se analizaron 81 aislados de levaduras obtenidos en cinco etapas diferentes del proceso. De forma paralela, se llevaron a cabo dos microvinificaciones en laboratorio, en presencia y ausencia de metabisulfito, con el fin de comparar su comportamiento con la fermentación realizada en bodega, y el efecto del metabisulfito sobre la dinámica de población de levaduras. Los aislados fueron caracterizados mediante dos métodos moleculares: el método PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal, el cual permite la identificación de especies de levaduras vínicas; y el método RFLP-ADNmt, cuyos resultados posibilitan la diferenciación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se identificaron 5 especies diferentes de levaduras vínicas, siendo *S. cerevisiae* la especie más abundante; y 12 cepas de levaduras vínicas, a lo largo del proceso de vinificación. Se observó una sustitución secuencial de las cepas de levaduras, durante el proceso de fermentación, predominando la especie *S. cerevisiae* en todas sus etapas, incluso en el mosto de uva recién estrujada. Tanto las fermentaciones de laboratorio como la fermentación de bodega fueron desarrolladas por una cepa mayoritaria, que no fue la misma en ninguna de las tres fermentaciones, lo cual sugiere un efecto significativo del ambiente de bodega y del metabisulfito en la sucesión de poblaciones de levaduras durante la fermentación.

ABSTRACT

The quality of wine and its singular properties are strongly related to the population of yeast involved in the process of transformation from grape to wine. The main aim of this work was to analyze the natural succession of species of yeast during winemaking process of Verdejo grapes under spontaneous fermentation, harvested in a south facing vineyard, in the D. O. Rueda. In order to accomplish this goal, 81 isolates of yeast from five different phases of the procedure were analyzed. At the same time, two laboratory winemaking processes were carried out, in presence or absence of metabisulphite, in order to compare these processes with the fermentation at the cellar,

and the effects of metabisulphite on the dynamic of the population of yeast. The isolates were characterized by two molecular methods: PCR-RFLP of the ITS-5.8S ribosomal DNA region, which allows the identification of species of wine yeast, and RFLP-mtDNA, which allows discrimination of strains within the species *Saccharomyces cerevisiae*. Five different species of wine yeast, being *S. cerevisiae* the predominant species, and 12 strains of wine yeast, were identified during the winemaking procedure. A sequential substitution of strains of yeast during the fermentation was observed, being *S.cerevisiae* the main species throughout all the stages, including the must from fresh grape. The fermentation at the laboratory and the cellar were carried out by a majority strain, which was different in all fermentations, suggesting a significant effect of the environment in the cellar and an effect of metabisulphite on the succession of the population of yeast, during the process of fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ecología de las levaduras de la uva al vino

La transformación de mosto de uva en vino es un proceso complejo llevado a cabo por microorganismos, donde las levaduras tienen una especial importancia debido a que son responsables del proceso de fermentación alcohólica. Tradicionalmente, el vino se produce a partir de la fermentación espontánea del mosto causada por el desarrollo de las levaduras presentes en la uva y en el ambiente. Las levaduras son organismos ampliamente distribuidos en la naturaleza (suelo, superficie de los vegetales, aparato digestivo de los animales), y su dispersión se debe a la acción del viento y de los insectos. La presencia y distribución de las poblaciones de levaduras en las bayas no es homogénea; el fruto verde apenas presenta levaduras, y la distribución de las mismas en las bayas maduras se concentra en la pruina del hollejo, alrededor de los estomas, asociada a la presencia de exudados liberados por microlesiones. Su proporción en la fase final de maduración depende de varios factores, como la situación geográfica del viñedo, las condiciones climáticas de la maduración, la variedad de uva, el estado sanitario de la vendimia y los tratamientos aplicados a las vides (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Las levaduras de esta fase se caracterizan por un metabolismo estrictamente oxidativo y por una baja capacidad fermentativa, predominando las especies apiculadas *Kloeckera* y *Hanseniaspora*, que constituyen entre el 50% y el 70% de la población total de levaduras en la superficie de la uva (Fernández-Espinar *et al.*, 2011). El material y maquinaria de la bodega son otra fuente de levaduras cuando entran en contacto con el mosto de la uva (Tabla 1.1). La población descrita en el ambiente de bodega es semejante a la población de levaduras de la uva, con la diferencia de que en bodega también se ha demostrado la presencia de *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). También, la microbiota del inicio de fermentación es similar a la microbiota de la uva, destacando el inicio del desarrollo de *S. cerevisiae*. A medida que avanza la fermentación, debido a la presión de selección que ejercen factores como las condiciones de anaerobiosis, el sulfitado de los mostos, la riqueza en azúcares y la presencia creciente de etanol, las levaduras propias de la uva disminuyen su presencia hasta llegar a desaparecer, siendo totalmente desplazadas por *S. cerevisiae* que se convierte en la levadura dominante del proceso fermentativo, hasta el final del mismo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). A pesar de la escasa presencia de *Saccharomyces* en la uva, su desarrollo durante la fermentación ocurre con rapidez, debido principalmente a su tolerancia al etanol y las altas temperaturas. En la tabla 1.1 se indican las principales levaduras descritas a lo largo del proceso de vinificación, y su abundancia aproximada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2005).

Tabla 1.1: Tabla resumen de la sucesión de poblaciones de levaduras desde la uva hasta la fermentación.

Género	Especie	Hábitat	Abundancia
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>	Uva Bodega Inicio fermentación Fermentación avanzada	Especie predominante (50-75%) Poco abundante Especie predominante Ausente
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	Uva Inicio fermentación Fermentación avanzada	Especie predominante (50-75%) Especie predominante Ausente
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	Uva Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Candida</i>	<i>famata</i> <i>stellata</i>	Uva Bodega Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Cryptococcus</i>		Uva Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Rhodotorula</i>		Uva Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Pichia</i>	<i>membranefaciens</i> <i>fermentans</i>	Uva Bodega Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Kluyveromyces</i>		Uva Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	Uva Bodega Inicio fermentación Fermentación avanzada	Poco abundante Poco abundante Poco abundante Ausente
<i>Torulaspota</i>		Bodega Fermentación avanzada	Poco abundante Ausente
<i>Brettanomyces</i>		Bodega Fermentación avanzada	Poco abundante Ausente
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Uva Bodega Inicio fermentación Fermentación avanzada	Rara Especie predominante Poco abundante Especie predominante

(Ribéreau-Gayon et al., 2003; Aranda *et al.*, 2005)

1.2. Importancia del estudio de la población de levaduras

Una de las características más notables de las levaduras vínicas es su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales determinadas, no sólo por el origen geográfico y por los hábitats que ocupan, sino también por las diferentes condiciones resultantes del avance del proceso de vinificación, del cual son responsables (Kunicka-Styczynska & Rajkowska, 2012; Ibañez *et al.*, 2014). Dicha adaptación se refleja en la gran variabilidad genética descrita en numerosos estudios poblacionales a nivel molecular de levaduras vínicas (Jemec *et al.*, 2001; Rodríguez-Lerma *et al.*, 2010; Di Maio *et al.*, 2010; Bezerra-Bussoli *et al.*, 2013; Capece *et al.*, 2013); y se atribuye al hecho de que el polimorfismo genético de las levaduras es una respuesta a las fuertes presiones de selección ambientales a las que se encuentran expuestas. Esta respuesta determina la mejor adaptación de los organismos a cada nicho ecológico y define una microbiota característica del mismo. El estudio y determinación de las poblaciones de levaduras adaptadas a cada ecosistema (viñedo-bodega-fermentación) permite resaltar uno de los factores clave en el proceso de vinificación, consiguiendo la elaboración de vinos bajo unos parámetros de calidad excelentes, sin perder la singularidad de los mismos asociada a la microbiota levaduriforme presente de la uva al vino, y a la sucesión natural de la misma a lo largo del proceso de vinificación.

1.3. Métodos moleculares para la identificación de levaduras vínicas

Los criterios morfológicos y fisiológicos son la base de los métodos convencionales para la identificación de levaduras vínicas. Para llevar a cabo una correcta identificación, estos métodos requieren la realización de numerosas pruebas basadas en la morfología y caracterización de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de las mismas. El uso de estos métodos presenta limitaciones, y es necesario tener en cuenta la variabilidad de resultados relacionada con las condiciones de cultivo de la levadura y con el estado fisiológico en el que se encuentra la misma (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). Su desarrollo para el análisis de diferentes cepas de levaduras supone un proceso laborioso y complejo, que requiere largos tiempos de ensayo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

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

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

Los métodos incluidos en cada uno de los grupos mencionados son diversos. A continuación se exponen los dos métodos utilizados en este trabajo, los cuales a pesar de su diferente finalidad, se basan en el Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Esta técnica requiere la digestión de material genético procedente de un sitio concreto del genoma de las levaduras, mediante el uso de endonucleasas de restricción. Estas enzimas se caracterizan por reconocer una secuencia diana específica, la cual determina un punto de corte como resultado de la actividad enzimática. El patrón de corte de cada enzima dará lugar a una serie de fragmentos de ADN de diferente longitud y frecuencia. Este patrón de corte depende de la secuencia nucleotídica sobre la que las enzimas actúan, la cual es específica del organismo objeto de estudio. Los fragmentos producto de la digestión se separan y visualizan mediante un gel de agarosa, que en virtud de lo expuesto, revela un perfil de bandas, que es único para un género, una especie, una cepa o un aislado, en función de la finalidad de la técnica. Además, el estudio de la similitud entre perfiles permite establecer correlaciones entre los mismos.

1.3.a. Método de identificación de especies de levaduras vínicas: PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal

Las secuencias de las regiones ribosomales presentan una baja variabilidad intraespecie, pero un elevado polimorfismo interespecie, característica que las convierte en secuencias muy útiles para la identificación y clasificación de especies de levaduras vínicas. Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S se disponen en tándem, constituyendo unidades de transcripción que se repiten a lo largo del genoma. Dichas unidades incluyen regiones no codificantes conocidas como espaciadores internos (ITS1 e ITS2) y externos (ETS) (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). El conjunto ribosomal constituido por el gen ribosomal 5.8S (región codificante y conservada) y las regiones ITS1 y 2 flanqueantes (región no codificantes y variables) es el más utilizado en la determinación de especies, ya que presenta una variabilidad interespecífica mayor que las secuencias de los genes ribosomales 18S y 26S (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Este método requiere la amplificación previa de la región ribosomal ITS-5.8S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de amplificación

obtenido se somete a digestión enzimática, utilizando las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DdeI* y *MboI* (Resolución OIV-OENO 408-2011). Cada especie da lugar a un perfil de bandas diferente, asociado a una enzima concreta. La coincidencia de patrones entre especies muy relacionadas entre sí, requiere la utilización de más de una enzima de restricción para concluir la identificación de la especie.

Basándose en este método, Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) consiguieron diferenciar 132 especies de levaduras, pertenecientes a 25 géneros distintos. Este trabajo fue considerado como la primera base de datos de referencia en la identificación de levaduras. Posteriormente, esta base de datos ha sido completada por otros autores (Segura *et al.*, 2010; Tofalo *et al.*, 2014). En la actualidad, hay disponible una base de datos on-line (<http://yeast-id.com>), que recoge los patrones de restricción definidos por las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI*, para cada una de las levaduras registradas. Para llevar a cabo las comparaciones, es necesario tener en cuenta las condiciones de análisis descritas en los trabajos de referencia (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). También es importante la incorporación de cepas de referencia, en el desarrollo de las mismas.

1.3.b. Método de diferenciación de cepas de *S. cerevisiae*: RFLP del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt)

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

Esta técnica requiere la obtención previa del ADN total de la levadura, el cual incluye el ADN nuclear y el mitocondrial, a partir de un cultivo puro del aislado (Querol *et al.*, 1992; Requejo, 2014). Posteriormente, el ADN total es sometido a una digestión enzimática, y el producto de la digestión es separado mediante electroforesis en gel de agarosa. El fundamento de esta técnica reside en las diferentes proporciones G+C y A+T entre el ADN mitocondrial y nuclear. La molécula de ADN mitocondrial se caracteriza por un elevado contenido en A+T (75%), pero además, presenta unas 200 zonas ricas en G+C (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). La digestión del ADN total utilizando endonucleasas de restricción del tipo GCAT, que no reconocen ni secuencias ricas en GC ni secuencias ricas en AT, da lugar a una restricción diferencial entre el ADN mitocondrial y nuclear. De esta forma, el ADN nuclear es altamente digerido, debido al elevado número de puntos de corte que presenta; dando

lugar a fragmentos de restricción de pequeño tamaño que no pueden ser resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, la digestión del ADN mitocondrial da lugar a fragmentos de longitud variable, en un número no muy abundante, cuya separación mediante electroforesis en geles de agarosa determina patrones de bandas que definen el perfil específico de una cepa.

Son varias las enzimas de restricción utilizadas (*HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *EcoRV*, *AluI*), y presentan diferente grado de polimorfismo en función de la especie de levadura considerada. En el caso de *S. cerevisiae* las enzimas de restricción recomendadas son *HinfI*, *HaeIII* y *RsaI* (Fernández-Espinar *et al.*, 2005; Resolución OIV-OENO 408-2011).

El método de diferenciación RFLP-ADNmt también ha sido aplicado satisfactoriamente en la caracterización de cepas pertenecientes a especies no-*Saccharomyces*, como *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, y a especies del género *Brettanomyces* y *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* y *Kluyveromyces* (Belloch *et al.*, 1997); aunque el número de estudios publicados en relación a la caracterización de especies de levaduras no-*Saccharomyces* es escaso (Fernández-Espinosa *et al.*, 2011). El estudio de 46 cepas pertenecientes a cuatro especies del género *Kluyveromyces* (*K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. thermotolerans*) demostró diferencias en el grado de divergencia intraespecífica del ADNmt, entre las especies analizadas. La especie *K. thermotolerans* reveló un nivel de polimorfismo intraespecie, mucho menor que el grado de polimorfismo de las otras tres especies del mismo género (Belloch *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es la caracterización, mediante métodos moleculares, del ecosistema levaduriforme asociado a un proceso de vinificación desarrollado a partir de uvas de la variedad Verdejo, recolectadas en la campaña de vendimia 2010, en una parcela determinada, localizada en la Denominación de Origen Rueda (Valladolid). Para ello, se analizaron 114 aislados obtenidos en cinco puntos de muestreo realizados a lo largo del proceso de vinificación en bodega, y de dos microvinificaciones realizadas de forma paralela en el laboratorio. Estas microvinificaciones se llevaron a cabo en presencia y ausencia de metabisulfito, con el fin de comparar las poblaciones de levaduras establecidas durante la fermentación tumultuosa, entre sí, y con la fermentación en bodega.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislados, medios y condiciones de cultivo

En el desarrollo de este trabajo se analizaron 81 aislados procedentes de cinco puntos de muestreo dentro del proceso de vinificación, llevado a cabo mediante fermentación espontánea en barrica; y 33 aislados procedentes de dos fermentaciones desarrolladas en laboratorio de forma paralela, una en presencia de metabisulfito y otra en ausencia del mismo. En la tabla 3.1 se recogen los puntos de muestreo, el número de aislados obtenidos en cada uno de ellos y su designación. Estos aislados forman parte de los resultados obtenidos por Toquero (2011) en el desarrollo del proyecto “Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de variedad verdejo en la D.O. Rueda”. La toma de muestras en bodega durante el proceso de vinificación realizado mediante fermentación espontánea, las microvinificaciones de laboratorio y el aislamiento de las levaduras se desarrollaron en la campaña de vendimia 2010. La uva de variedad Verdejo recolectada procede de una única parcela (Parcela 1) de orientación sur, localizada en la D.O. Rueda (Toquero, 2011). También se analizaron dos cepas control pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (F3 y F5), cedidas por la Dra. Rodríguez-Cousiño. El análisis mediante RFLP-ADNmt de las mismas ha sido publicado por Esteban & Rodríguez-Cousiño (2008).

La colección de aislados de levaduras se conserva a 4°C, siendo refrescada periódicamente, mediante pases en agar extracto de malta (Agar 3% (p/v), Extracto de malta 13% (p/v)), en forma de pico de flauta (Requejo, 2014). El inicio de este trabajo fue la realización de un pase de todos los aislados objeto de estudio. Los cultivos se incubaron a 25°C, durante 3-5 días, en función del desarrollo de los mismos.

Tabla 3.1: Aislados analizados en este trabajo.

Origen/Año	Punto de muestreo	Nº aislados	Aislados
Parcela 1 / 2010	Mosto uva recién estrujada (MURE)	14	1101 - 1114
	Fermentación tumultuosa en laboratorio en ausencia de metabisulfito (FTLSM)	16	1201 - 1216
	Fermentación tumultuosa en laboratorio con metabisulfito (FTLM)	17	1201M - 1217M
	Mosto desfangado en bodega (MDB)	15	1301 - 1315
	Inicio de fermentación en bodega (IFB)	18	1401 - 1417
	Fermentación tumultuosa en bodega (FTB)	17	1501-1517
	Final de fermentación en bodega (FFB)	17	1601 - 1617

3.2. Extracción de ADN total

El protocolo utilizado se basa en el protocolo descrito por Requejo (2014), resultado de la optimización del protocolo descrito por Querol *et al.* (1992). Los aislados de levaduras se cultivaron en 3 ml de YEDP (Extracto de levadura 1% (p/v) Peptona 2% (p/v), Glucosa 2% (p/v)), a 25°C y 220 rpm, durante 18-22 h. Posteriormente, se concentraron 1,5 ml de cultivo mediante centrifugación. Los precipitados obtenidos se lavaron en 500 µl de agua destilada estéril y se resuspendieron en 500 µl de una solución de Sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M (pH 7,5). A continuación se añadieron 15 µL de una solución de Zimoliasa 400 U/ml y se incubaron durante 30 min, a 37°C. Los esferoplastos obtenidos se concentraron mediante centrifugación, y los precipitados resultantes se resuspendieron en 500 µl de una solución de Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM (pH 7,4). Se añadieron 13 µl de una solución de SDS 10% (v/v) y se incubaron a 65°C, durante 15 min. A continuación se procedió a la precipitación de proteínas, añadiendo 200 µl de una solución de acetato potásico 5 M, e incubando las muestras en frío. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó en presencia de un volumen de isopropanol, y los precipitados obtenidos se lavaron con 500 µl de una solución de etanol 70% (v/v). Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 15 µl de una solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5) (Requejo, 2014).

La cantidad de material genético obtenida se estimó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), con el fin de estandarizar la cantidad de ácidos nucleicos que se utilizan en la digestión enzimática (Requejo, 2014).

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal

Para la amplificación de la región ITS-5.8S se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y se siguió el protocolo descrito por Requejo (2014). En la reacción de PCR se utilizaron 50 ng de ADN total del aislado, extraído como se indica en el apartado anterior.

3.4. Digestiones enzimáticas

3.4.a. Digestión RFLP-ADNmt

La enzima de restricción utilizada es *Hin*I (Promega, 10 U/µl), cuya secuencia diana es:

5'...G[▼]ANTC...3'

3'...CTNA[▼]G...5'

Las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante y el protocolo descrito por Requejo (2014), con una ligera modificación. Las muestras de

ADN total se trataron durante la digestión enzimática con RNasa A, para evitar la interferencia del ARN en la visualización de los patrones de restricción. Para ello, se añadió RNasa A (4 mg/ml, Promega), a una concentración final de 100 µg/ml, en la mezcla de digestión de cada muestra. La cantidad de material genético utilizada en las digestiones fue de 40 µg, aproximadamente.

3.4.b. Digestión del producto de amplificación de la región ITS-5.8S

La enzima de restricción utilizada es *HaeIII* (Promega, 10 U/µl), cuya secuencia diana es:

5'...GG▼CC...3'

3'...CC▲GG...5'

Las digestiones se realizaron a partir de 5 µl del producto de amplificación obtenido, siguiendo el protocolo descrito por Requejo (2014), y las recomendaciones del fabricante.

3.5. Electroforesis en gel de agarosa y análisis de los patrones de restricción

Los productos de la digestión del ADNmt se separaron en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), de dimensiones 15 x 13 cm, con un solo peine. Se utilizaron peines de 16 pocillos de dimensiones 1,5 x 0,1 mm, los cuales definieron una longitud de electroforesis de 12 cm, aproximadamente. Se utilizó TAE 1X como buffer de electroforesis y se aplicó una corriente de 75 V, hasta que el frente de electroforesis correspondiente al azul de bromofenol alcanzó el final del gel (tiempo aproximado de electroforesis: entre 3h 45 min y 4h 15 min). En cada gel de agarosa se reservó un carril para el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Los productos de la PCR-RFLP ITS-5.8S se resolvieron en un gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE 1X, de dimensiones 15 x 18 cm, con dos peines. Los peines y el tampón de electroforesis fueron los mismos que en el caso anterior. Se aplicó una corriente de 120V, durante 1h 50 min-2 h, aproximadamente. El marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp ladder (Biotools).

Todos los geles fueron sometidos a una tinción post-electroforesis en una solución de GelRed 1X (Biotium), durante 30 min-1 h, en función de la degradación de la solución de tinción. Posteriormente, los geles fueron desteñidos en agua destilada, durante un tiempo igual al tiempo de tinción.

La visualización de los geles de agarosa y la adquisición de imágenes se realizó con el equipo AlphaDigiDoc Pro (Alpha Innotech), asociado al software AlphaProView v1.0. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el software GelComparII

v6.6 (Applied Maths). Para poder establecer comparaciones entre los diferentes perfiles de restricción de ADNmt obtenidos se construyeron dendrogramas, utilizando el coeficiente de asociación Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). De esta forma, se establecieron las similitudes de los perfiles en función de las posiciones relativas de las bandas de cada patrón, estableciendo la presencia/ausencia de las mismas. Para determinar la consistencia de los grupos establecidos se calculó el coeficiente de correlación cofenética, el cual expresa la correlación entre similitudes del dendrograma y la matriz de distancias, por pares. En los perfiles de restricción de ADNmt se consideraron las bandas comprendidas entre el rango de 2000 y 10000 pb, para realizar el análisis de comparación. En el caso de los patrones de restricción *HaeIII* de la región ITS-5.8S se estimó el tamaño aproximado de las bandas obtenidas, expresado en pares de bases (pb), con el mismo software.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis no se han incluido los aislados 1107, 1417, 1606, 1610 y 1611, por ausencia de crecimiento en los pases en agar extracto de malta, inoculados a partir de los cultivos de la colección. Tampoco se han podido determinar los patrones de restricción de ADNmt para los aislados 1104, 1108, 1109 y 1113. En ninguna de las extracciones de ADN total realizadas fue evidente la formación de hebra de ADN, durante el paso de precipitación de ácidos nucleicos, y los intentos de aumentar la cantidad del precipitado celular inicial, para mejorar los rendimientos durante el proceso de extracción no mejoraron los resultados. La cantidad de ADN total obtenida para estos aislados, no fue suficiente para poder determinar su perfil de restricción de ADNmt, pero si permitió el análisis de los mismos mediante PCR-RFLP de la región ITS-5.8S.

4.1. Identificación de cepas de levaduras presentes en las distintas etapas del proceso de vinificación

Se han identificado 12 patrones de restricción de ADNmt diferentes, en el total de aislados analizados, lo que sugiere la presencia de, al menos, 12 cepas de levaduras diferentes a lo largo del proceso de vinificación (Figura 4.12). El estudio comparativo de los diferentes patrones se plantea primero en cada uno de los puntos de muestreo analizados, designando cada perfil encontrado con las iniciales del punto de muestreo y un número correlativo, en función de los patrones encontrados en cada punto. Después, se han llevado a cabo comparaciones entre los patrones establecidos en cada punto.

En el mosto de uva recién estrujado (MURE) se han identificado dos patrones de restricción, MURE1 y MURE2, los cuales incluyen 2 y 7 aislados respectivamente. En la tabla 4.1 se relacionan los aislados agrupados en cada patrón, y en la figura 4.1 se representa la comparación establecida mediante la construcción de un dendrograma. En la fermentación tumultuosa en el laboratorio en ausencia de metabisulfito (FTLSM), también se han establecido dos patrones de restricción FTLSM1 y FTLSM2 (Tabla 4.1, Figura 4.2). El primero de ellos incluye todos los aislados obtenidos en este punto de muestreo, menos el aislado 1202, único representante del patrón FTLSM2 (Figura 4.2). Todos los aislados procedentes de la fermentación tumultuosa en laboratorio en presencia de metabisulfito (FTLM) presentan el mismo patrón de restricción, FTLM1 (Tabla 4.1, Figura 4.3). Entre los 15 aislados obtenidos a partir del mosto desfogado en bodega (MDB), se distinguen dos patrones de restricción, MDB1 y MDB2, con 8 y 7 aislados respectivamente. En el inicio de fermentación en bodega (IFB), se han identificado 6 patrones de restricción diferentes, los cuales agrupan a los 16 aislados

analizados. Doce aislados constituyen el patrón de restricción IFB1, y el resto de los aislados de este grupo (1401o, 1402, 1406, 1413 y 1414) componen, cada uno de ellos, un patrón de restricción distinto (IFB2, IFB3, IFB4, IFB5, IFB6, respectivamente) (Tabla 4.1, Figura 4.5). Los aislados obtenidos a partir de la fermentación tumultuosa en bodega (FTB) se agrupan en dos patrones de restricción, FTB1 y FTB2. El primer patrón incluye a 15 de los 17 aislados, mientras que el aislado 1505 es el único integrante del patrón FTB2. Por último, en el final de fermentación de bodega (FFB) se han reconocido 5 patrones de restricción (Tabla 4.1). FFB1 y FFB2 incluyen 2 aislados cada uno de ellos. El patrón FFB4 y FFB5 agrupan 3 y 1 aislados, respectivamente. El patrón FFB3 está compuesto por el resto de los aislados de este grupo (Figura 4.7).

Varios de los patrones indicados para cada punto de muestreo no son exclusivos del mismo, y se repiten en otros puntos de muestreo. El patrón MURE1 es igual al patrón MDB2. El patrón MURE2 se corresponde con el patrón FTLSM1. También son iguales los patrones FTLSM2, FTLM y MDB1 (Figura 4.8). En cuanto a la fermentación realizada en bodega, los patrones IFB1, FTB1 y FFB3 son iguales entre sí, al igual que los patrones FTB2 e IFB6, y los patrones IFB4 y FFB5 (Figura 4.9). Es importante destacar que las repeticiones de patrones indicadas entre los diferentes puntos de muestreo presentan una agrupación concreta. Se han encontrado patrones iguales entre los puntos de muestreo MURE, FTLSM, FTLM y MDB; y entre los puntos IFB, FTB y FFB, pero no se encuentra ningún patrón igual que relacione los dos grupos de puntos de muestreo indicados (Figura 4.8 y Figura 4.9).

La figura 4.10 pone de manifiesto la secuencia de los patrones de ADNmt encontrados a lo largo de los diferentes puntos de muestreo, y su abundancia en cada etapa. La realización de microvinificaciones en laboratorio permite estudiar la sucesión de poblaciones de levaduras vínicas, eliminando la influencia del ambiente de la bodega. Por otro lado, la realización de las mismas en presencia y ausencia de metabisulfito posibilita la observación de los efectos de este agente sobre la población de levaduras. Comparando las microvinificaciones de laboratorio, se observa que ambas fueron llevadas a cabo por una única cepa dominante, y sólo en la fermentación tumultuosa en ausencia de metabisulfito, esta cepa se encontró también en el mosto de uva recién estrujada. La identificación del patrón de la cepa dominante de la fermentación tumultuosa en el laboratorio, en uno de los aislados de la fermentación tumultuosa sin metabisulfito, pero no entre los aislados del mosto de uva recién estrujada, parece indicar que este aislado se encuentra en muy baja proporción en el primer punto de muestreo, y que la presencia de metabisulfito favorece su implantación y desarrollo frente al de otros aislados. El metabisulfito es utilizado de forma habitual durante el proceso de vinificación, como agente antioxidante, como

agente antimicrobiano, y como agente de selección de cepas o aislados de levaduras durante la fermentación (Constantí *et al.*, 1998). El uso de metabisulfito en la microvinificación de laboratorio ejerce un claro efecto de selección sobre la sucesión poblacional de las levaduras, determinando la cepa que domina el proceso fermentativo desarrollado en presencia del mismo, cuyo patrón es diferente al de la cepa dominante de la fermentación en laboratorio realizada en ausencia de metabisulfito. La comparación de las fermentaciones en laboratorio con la fermentación en bodega se comentará más adelante.

Solamente uno de los patrones establecidos en el mosto inicial (MURE1) se identificó de nuevo en el mosto desfangado en bodega. El segundo perfil de ADNmt determinado (MDB2), se corresponde con el patrón del aislado dominante en la fermentación tumultuosa en laboratorio con metabisulfito (Figura 4.10). Las técnicas más habituales de desfangado suelen estar asociadas a un ligero sulfitado (Toquero, 2011). La presencia de metabisulfito en esta etapa favorece de nuevo la presencia del patrón FTLSM2-FTLM-MDB2, aunque no desplaza a cepas procedentes del mosto de uva recién estrujada.

Los patrones de ADNmt establecidos para los aislados analizados en las fases iniciales de procesado de la uva (MURE y MDB), y en las fermentaciones realizadas en el laboratorio (FTLSM y FTLM), no se han identificado en los puntos posteriores del muestreo, todos ellos realizados durante la fase de fermentación en bodega (IFB, FTB, FFB). La agrupación observada en relación a la sucesión y repetibilidad de patrones en los diferentes puntos de muestreo pone de manifiesto que los aislados identificados en las diferentes fases de fermentación en bodega, y responsables del desarrollo de la misma, no se encuentran presentes en las fases previas de procesado de la uva, o se encuentran presentes en unas proporciones tales, que no son susceptibles de ser aislados. El inicio y final de fermentación en bodega presentan la mayor diversidad de patrones, la cual no se mantiene durante la fermentación tumultuosa. Esta etapa presenta un aislado dominante, al igual que las fermentaciones de laboratorio. Durante estas tres fases de la fermentación, el patrón mayoritario determinado en la fermentación tumultuosa en bodega (FTB1), también fue el patrón mayoritario en el inicio y en el final de la fermentación en bodega (IFB1 y FFB3) (Figura 4.10). La identificación de este patrón mayoritario en las tres etapas de la fermentación, permite determinar a los principales aislados responsables del desarrollo de la fermentación en bodega. La ausencia de este patrón de ADNmt en cualquiera de las etapas previas del proceso de vinificación, al igual que su ausencia en las dos fermentaciones desarrolladas en laboratorio, parece indicar que el ambiente de bodega pueda tener una influencia destacada en el desarrollo de las fermentaciones, aunque esto debería

de ser confirmado con el análisis de aislados obtenidos a partir del proceso de vinificación de parcelas diferentes, y de aislados obtenidos en diferentes campañas de vendimia (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Otra posibilidad, es que la cepa responsable de la fermentación se encuentre en un porcentaje indetectable mediante las técnicas de aislamiento utilizadas, hasta el inicio de la fermentación.

El análisis de las muestras control *S. cerevisiae* F3 y F5, en las mismas condiciones que el resto de los aislados, y la obtención de unos patrones de restricción de ADNmt iguales a los publicados por Esteban & Rodríguez-Cousiño (2008), permitió confirmar el correcto desarrollo del análisis de los aislados mediante RFLP-ADNmt (Figura 4.11).

Las poblaciones de levaduras vínicas identificadas durante los procesos de vinificación desarrollados en bodega y en laboratorio, y su sucesión a lo largo de los mismos, se representaron mediante dendrogramas. Estas representaciones gráficas permiten la visualización, comparación y determinación de asociaciones entre aislados, de una forma rápida y fiable, en función de la similitud de sus patrones de restricción de ADNmt; y se convierten en una herramienta muy útil cuando tanto la diversidad de patrones como el número de aislados son muy elevados. Para su desarrollo hay que tener en cuenta dos parámetros fundamentales, la normalización de cada uno de los geles, y los valores de optimización y tolerancia que se asignan a los estudios de comparación. La finalidad de la normalización es corregir las desviaciones derivadas del desarrollo de cada una de las electroforesis en gel de agarosa, realizadas para analizar el total de aislados; y se basa en el comportamiento electroforético de los marcadores de peso molecular incluidos en cada uno de los geles. Para una correcta normalización es necesario incluir en la electroforesis un marcador de peso molecular por cada 5-6 muestras analizadas (Gerner-Smidt *et al.*, 1998). Una buena normalización determina unos valores adecuados de optimización y tolerancia durante el análisis de comparación. Dichos valores, expresados como porcentaje, delimitan el cambio máximo permitido para considerar dos perfiles iguales o no. La optimización considera los cambios en el conjunto del patrón de bandas, y la tolerancia considera los cambios entre bandas. Cuanto más ajustados sean los valores calculados, más fiable será la asignación entre grupos. En la figura 4.9, en la comparación de los aislados de los puntos de muestreo realizados en bodega, se pueden observar errores en los grupos asignados. El error más destacado es la asignación, en el dendrograma b), de los aislados 1507 y 1508, fuera de la agrupación principal IFTB1-FTB1-FFB3, y la inclusión en esta agrupación de los aislados 1614, 1615 y 1616, los cuales presentan un perfil diferente (FFB4). Esto es debido a que solamente se incluyó un marcador de peso molecular en cada gel de agarosa, lo cual no es suficiente para llevar a cabo la normalización de los diferentes geles de una

forma totalmente óptima. Dada la menor diversidad encontrada en los puntos de muestreo anteriores, el error no fue evidente hasta que se realizó la comparación de los tres puntos de muestreo con mayor número de patrones diferentes. Este dendrograma se mantuvo, ya que a pesar del error indicado permite poner de manifiesto el patrón de ADNmt compartido por las etapas de fermentación en bodega. Además, deja constancia de un error clave que muchas veces no se tiene en cuenta hasta el momento de hacer el análisis de los resultados.

Figura 4.1: Comparación de los aislados obtenidos a partir del mosto de uva estrujado.

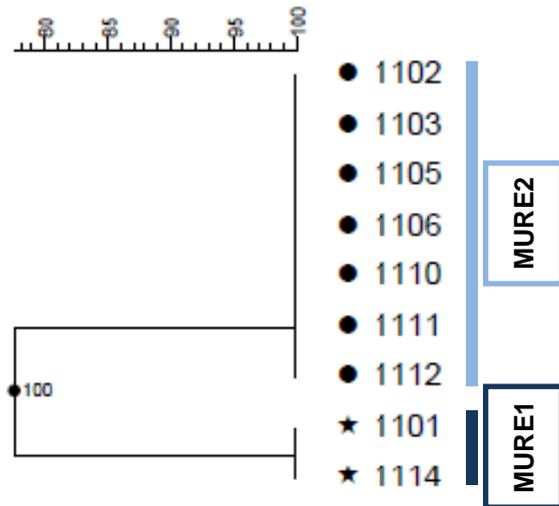


Figura 4.2: Comparación de los aislados obtenidos en la fermentación tumultuosa en laboratorio sin metabisulfito.



Figura 4.3: Comparación de los aislados obtenidos en la fermentación tumultuosa en laboratorio con metabisulfito.

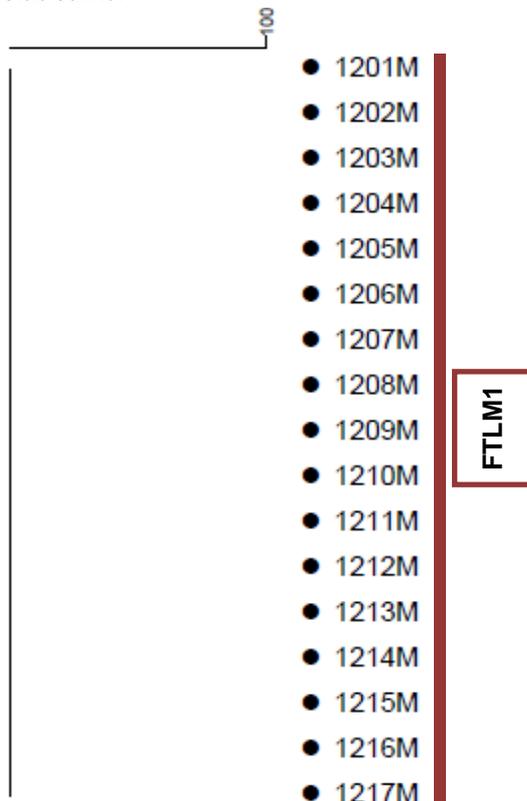


Figura 4.4: Comparación de los aislados obtenidos en el mosto desfangado en bodega.

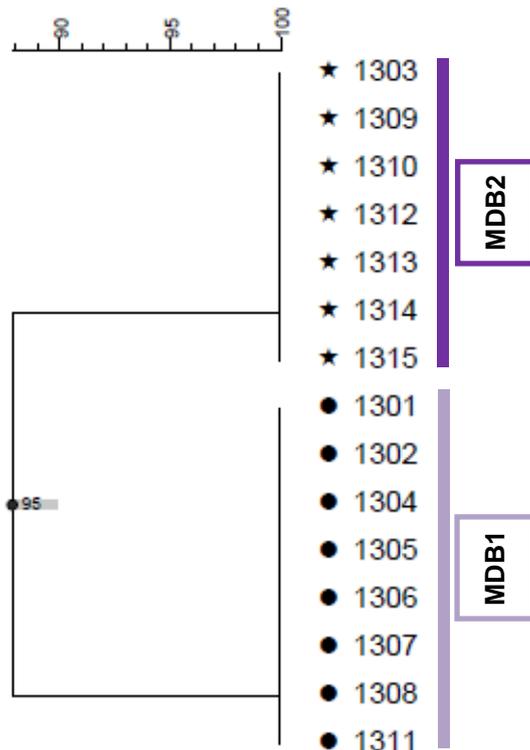


Figura 4.5: Comparación de los aislados obtenidos en el inicio de fermentación en bodega.

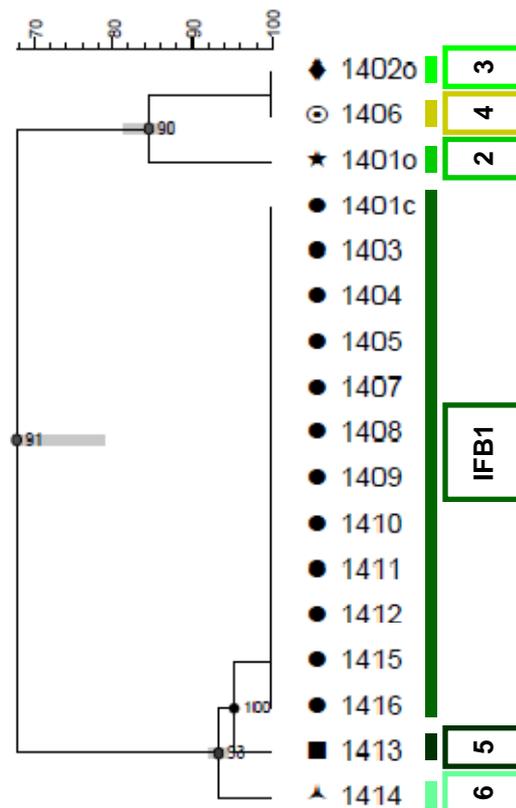


Figura 4.6: Comparación de los aislados obtenidos en la fermentación tumultuosa en bodega.

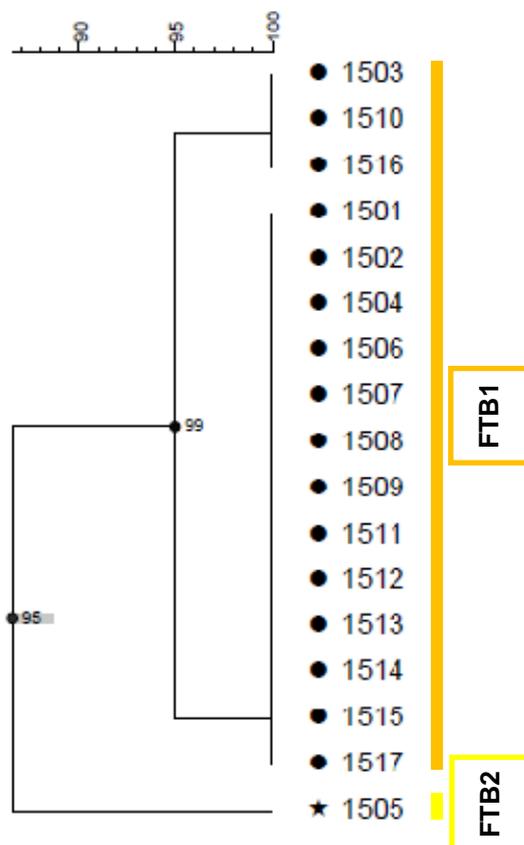


Figura 4.7: Comparación de los aislados obtenidos en el final de fermentación en bodega.

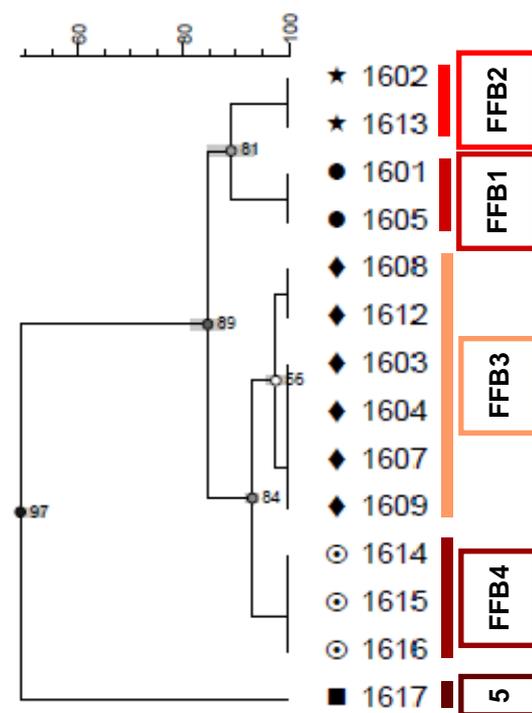


Figura 4.8: Comparación de los aislados obtenidos en las etapas previas de procesamiento de uva y en las fermentaciones tumultuosas en laboratorio. a): Comparación de MURE con las fermentaciones desarrolladas en el laboratorio. b): Comparación de la serie anterior con el primer punto de muestreo en bodega.

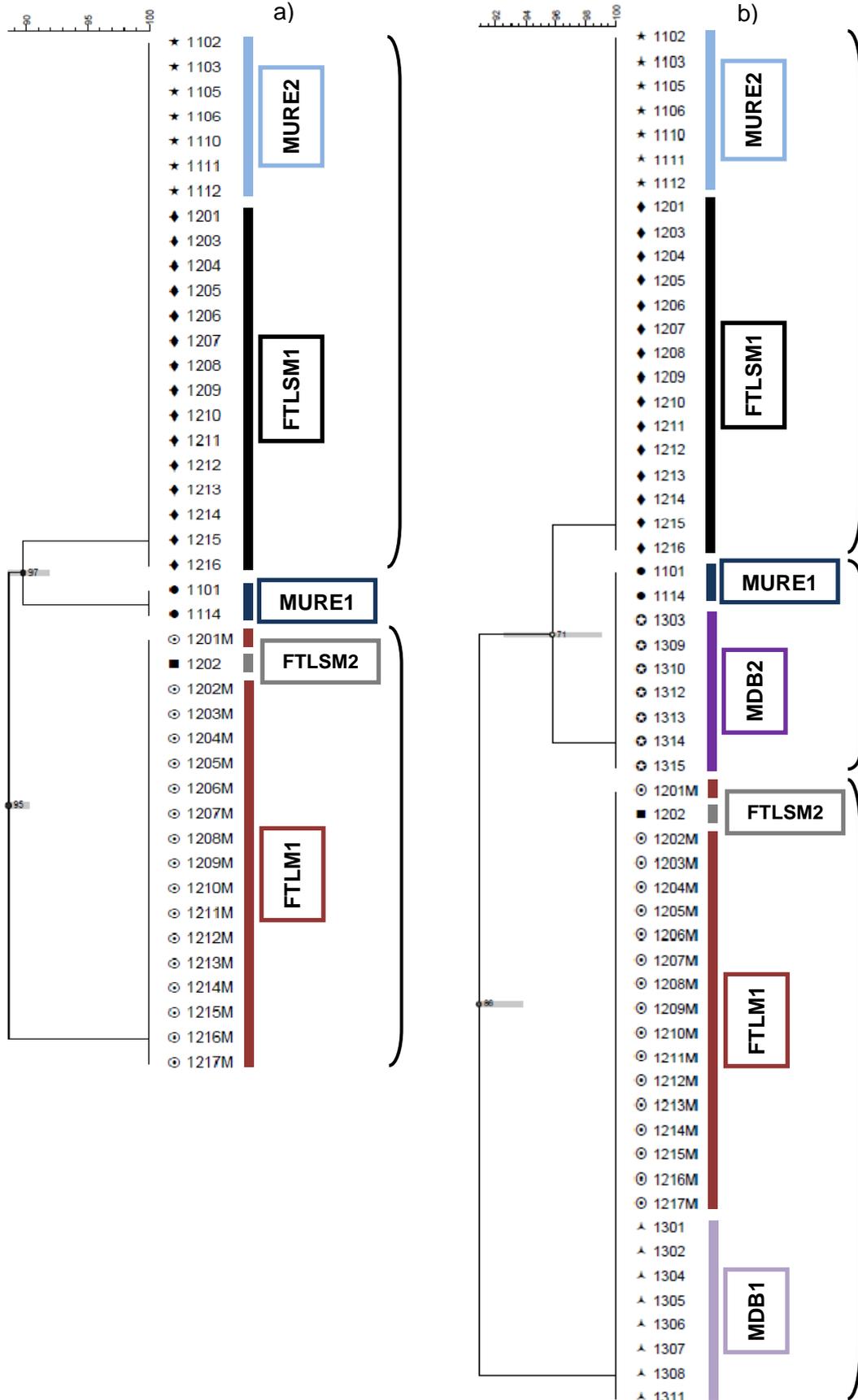


Figura 4.9: Comparación de los aislados obtenidos en los puntos de muestreo en bodega. a): Comparación del punto de muestreo MURE con los dos puntos iniciales de muestreo de la serie bodega. b): Comparación de los tres puntos de muestreo realizados durante la fermentación en bodega.

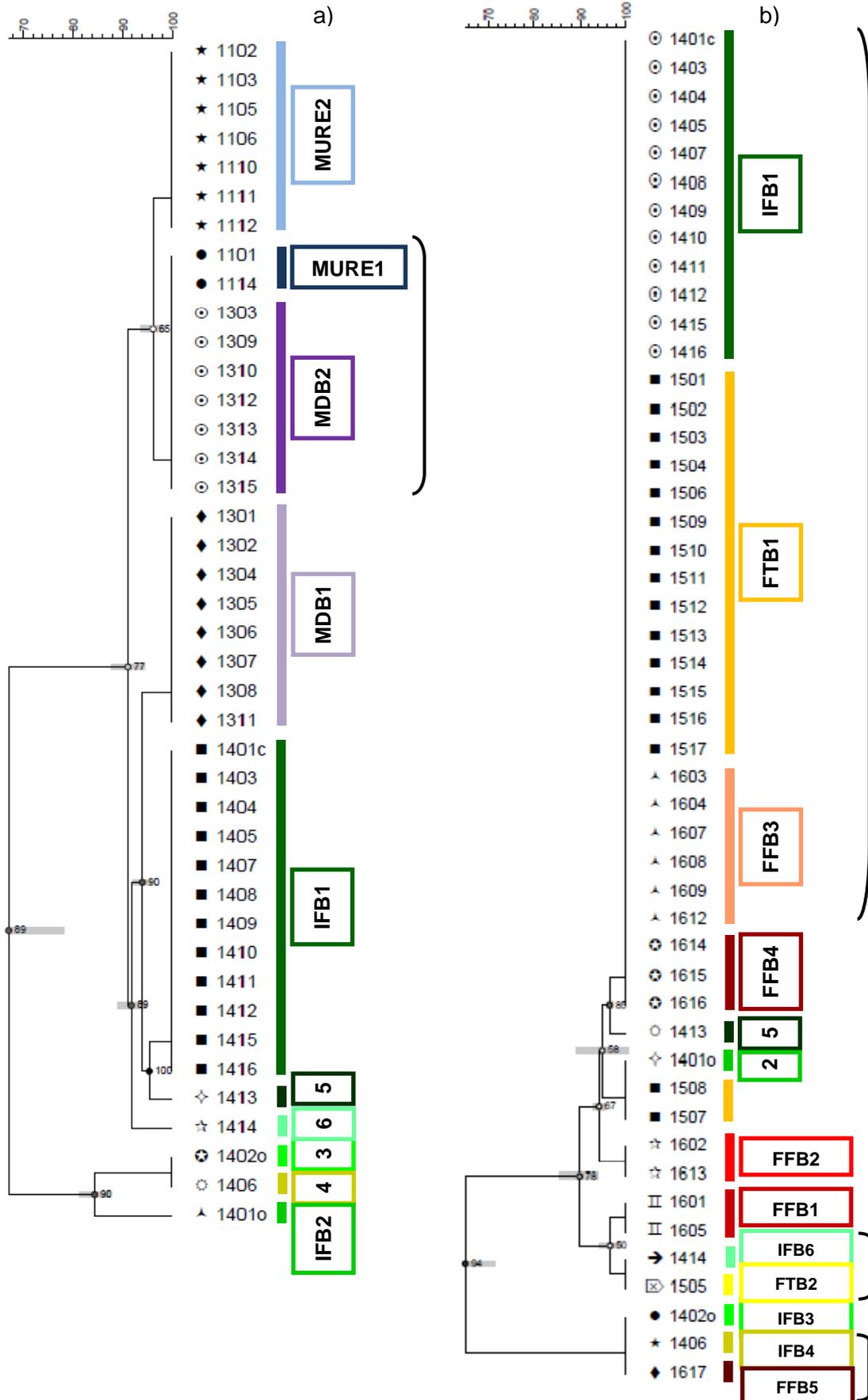


Tabla 4.1: Resumen de los diferentes patrones de ADNmt encontrados en cada uno de los puntos de muestreo, y su relación entre los mismos.

Patrones restricción ADNmt	Aislados
MURE1 (= MDB2)	1101, 1114
MURE2 (= FTLSM1)	1102, 1103, 1105, 1106, 1110, 1111, 1112
Sin patrón definido (SPD)	1104, 1108, 1109, 1113
FTLSM1 (=MURE2)	1201, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216
FTLSM2 (= FTL = MDB1)	1202
FTLM (= FTLSM2 = MDB1)	1201M-1217M
MDB1 (FTL = FTLSM2)	1301, 1302, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1311
MDB2 (MURE1)	1303, 1309, 1310, 1312, 1313, 1314, 1315
IFB1 (= FTB1 = FFB3)	1401c, 1403, 1404, 1405, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1415, 1416
IFB2	1401o
IFB3	1402
IFB4	1406
IFB5	1413
IFB6 (=FTB2)	1414
FTB1 (= IFB1 = FFB3)	1501, 1502, 1503, 1504, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516
FTB2 (IFB6)	1505
FFB1	1601, 1605
FFB2	1602, 1613
FFB3 (=IFB1 = FTB1)	1603, 1604, 1607, 1608, 1609, 1612
FFB4	1614, 1615, 1616
FFB5	1617

SPD: Sin Patrón Definido. MURE: Mosto Uva Recién Estrujado. FTLSM: Fermentación tumultuosa en Laboratorio Sin Metabisulfito. FTLM: Fermentación Tumultuosa en Laboratorio con Metabisulfito. MDB: Mosto Desfangado en Bodega. IFB: Inicio Fermentación en Bodega. FTB: Fermentación Tumultuosa en Bodega. FFB: Fin de Fermentación en Bodega.

Figura 4.10: Representación gráfica de la secuencia de los patrones de restricción de ADNmt determinados.

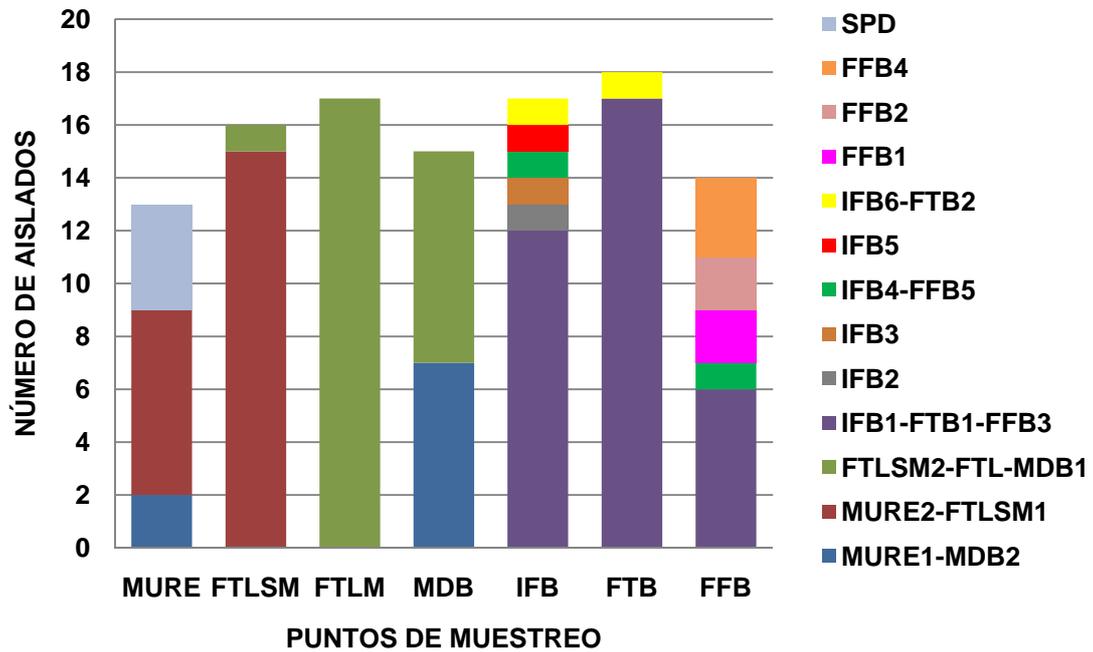


Figura 4.11: Patrones de restricción del ADNmt de un aislados de *S. cerevisiae* (A), y de los controles *S. cerevisiae* F3 y F5. M: Marcadores de peso molecular de 250 pb (Invitrogen) y de 1 kb (Thermo Fisher).

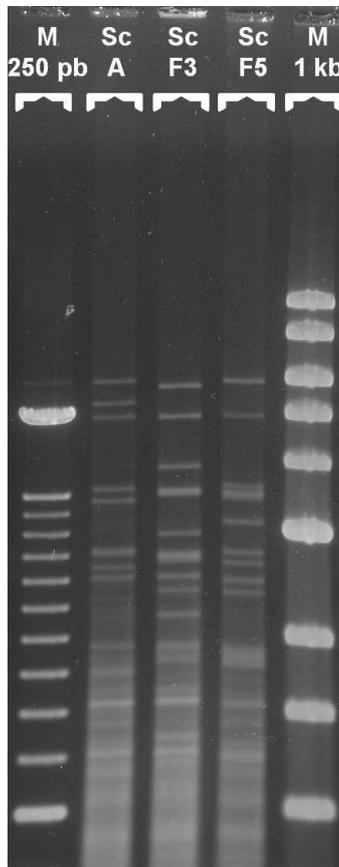
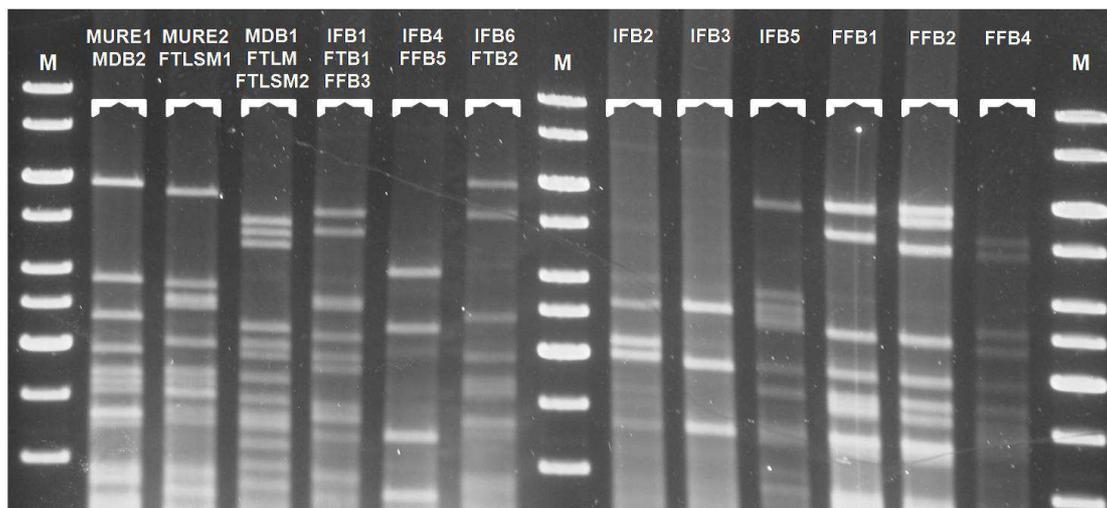


Figura 4.12: Patrones de restricción del ADNmt identificados. M: Marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Fisher).



4.2. Determinación de la especie de levadura vínica a la que pertenece cada patrón de ADNmt identificado

Para llevar a cabo este análisis se ha seleccionado un aislado por cada uno de los patrones de ADNmt identificados, en cada punto de muestreo. En los patrones con mayor número de aislados en las etapas de fermentación tumultuosa (FTB1) y fin de fermentación en bodega (FFB3) se han seleccionado dos aislados.

En la tabla 4.3 se recogen los aislados analizados, el patrón de ADNmt al cual pertenecen y representan, y los patrones obtenidos expresados en función del tamaño molecular de cada banda, en pares de bases (pb). Se han identificado 6 patrones de restricción *HaeIII* diferentes, los cuales se corresponden con los valores medios indicados en la tabla 4.2.

Tabla 4.2: Valores medios de los diferentes patrones de restricción *HaeIII*.

Patrones restricción <i>HaeIII</i>					
A	B	C	D	E	F
326 ± 11	483	323 ± 7	526 ± 1	553	617/597
245 ± 9	301	241 ± 6	81 ± 3		
183 ± 12	225	146 ± 7			
135 ± 11	128				

El patrón de restricción *HaeIII* comúnmente conocido para la especie *S. cerevisiae* está definido por los valores 320 + 230 + 180 + 150 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Como resultado del análisis de 104 aislados de *S. cerevisiae*, Segura *et al.* (2010) definieron el patrón 310 + 232 + 173 + 129; y compararon este patrón con el patrón promedio 317 + 226 + 175 + 139 calculado a partir de 9 patrones publicados por otros

autores. Dada la variabilidad de valores encontrada, estimaron un parámetro de error de 20 pb, para poder hacer las comparaciones de los patrones objeto de estudio con los patrones publicados. Teniendo en cuenta estas indicaciones y las muestras control *S. cerevisiae* F3 y F5 analizadas en las mismas condiciones que el resto de los aislados, se identificaron los aislados pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* (ver Tabla 4.3).

Cabe destacar, que el patrón denominado C, definido por las bandas 323 + 241 + 146, coincide con los valores de la primera, segunda y última bandas del patrón publicado para *S. cerevisiae*, aunque carece de la tercera banda del mismo (180 pb). Este patrón de restricción fue publicado recientemente por Tofalo *et al.* (2014) en el desarrollo de un estudio de biodiversidad de levaduras vínicas de un vino producido en la provincia de Teramo (Italia). En este trabajo se llevó a cabo la identificación, mediante PCR-RFLP de la región ITS-5.8S, de 430 aislados obtenidos en el final de fermentación. El 3,5% de los aislados analizados, identificados como *S. cerevisiae*, presentaron un nuevo patrón de bandas resultado de las digestiones realizadas con el enzima *HaeIII*. La secuenciación de la región ITS-5.8S de dos aislados y su comparación con la misma secuencia de otro aislado que se ajustaba el patrón característico de *S. cerevisiae*, permitió observar una inserción de un nucleótido C en la posición 138 de la región ITS1. Esta mutación determina la inserción de un nuevo punto de corte para la enzima *HaeIII*, que da lugar a una modificación del patrón de bandas conocido, el cual se transforma en 320 + 230 + 150 + 150 pb. En base a este reciente estudio, los aislados de las diferentes etapas que presentan este patrón de bandas son identificados como *S. cerevisiae* (Tabla 4.3).

El resto de patrones establecidos han sido comparados con varios patrones publicados para diferentes especies del género *Saccharomyces*, y para especies de levaduras no pertenecientes a este género, teniendo en cuenta el mismo parámetro de error (Segura *et al.*, 2010; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Solamente el patrón de una única banda de 553 pb (aislado 1108), coincide con el patrón publicado para *Candida maltosa* (550 pb). La coincidencia de patrones y la etapa del proceso de vinificación a la que pertenece este aislado (MURE) hacen probable dicha asignación, aunque sería necesario comprobarla mediante la inclusión de cepas control, o bien mediante la secuenciación de la región ITS-5.8S. Los patrones restantes no han podido ser asignados a ninguna otra especie, aunque sí se puede afirmar que ninguno de ellos se ajusta a los patrones publicados para las especies pertenecientes al género *Saccharomyces*. Por ello, y dada la ausencia de cepas control con las que poder comparar el comportamiento electroforético de las mismas, han sido identificados como no-*Saccharomyces* (Tabla 4.3). Los aislados 1104, 1109 y 1113 presentaron un

patrón de restricción muy parecido, pudiéndose tratar de aislados pertenecientes a la misma especie. En cuanto a los aislados 1406 y 1617, aunque la diferencia de 20 pb (617 pb y 597 pb, respectivamente) que reflejan sus patrones de restricción, está en el límite del parámetro de error, podemos afirmar que se trata de la misma especie, ya que ambos aislados comparten el mismo patrón de restricción para ADNmt.

Solamente en los puntos de muestreo MURE, IFB y FFB se identificaron aislados no pertenecientes al género *Saccharomyces* (Figura 4.11). La mayor proporción de especies no-*Saccharomyces* se encontró en el MURE (30,8%), dada la influencia de la microbiota característica del grano de uva (Jemec *et al.*, 2001; Bezerra-Bussoli *et al.*, 2013). Aunque, en esta primera etapa del proceso de vinificación, ya es notable la presencia de aislados de la especie *S. cerevisiae* (69,2% de los aislados). A diferencia de nuestro estudio, Jemec *et al.* (2001) no detectaron especies del género *Saccharomyces* en los aislamientos realizados a partir de mostos frescos. Los aislados no-*Saccharomyces* determinados en el inicio y final de fermentación suponen un 6,3% y un 14,3% del total de los aislados estudiados en esos puntos, respectivamente. Proporciones semejantes fueron publicadas por Jemec *et al.* (2001), en las distintas fases de la fermentación espontánea de mostos de Malvasía.

La dominancia de *S.cerevisiae* es total en todas las fermentaciones tumultuosas, independientemente de sus condiciones de desarrollo, y en el mosto de uva desfangado en bodega (Figura 4.11). En este punto del muestreo no se identificó ningún aislado propio de la microbiota del grano de uva, lo que pone de manifiesto la influencia del procesado de la uva en bodega, previo al inicio de la fermentación, en la sucesión de especies de levaduras.

Figura 4.11: Representación gráfica de la presencia de aislados identificados como no-*Saccharomyces*.

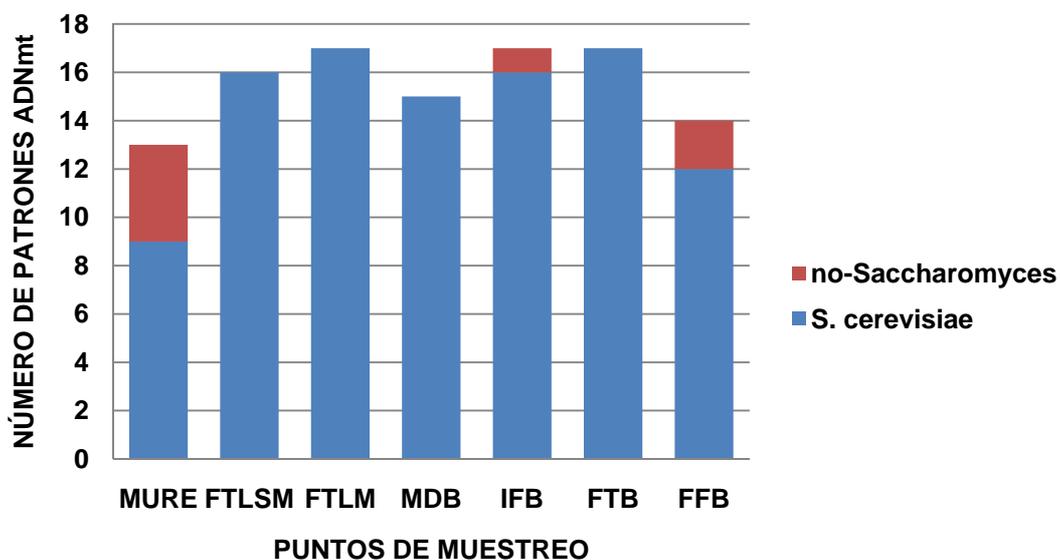
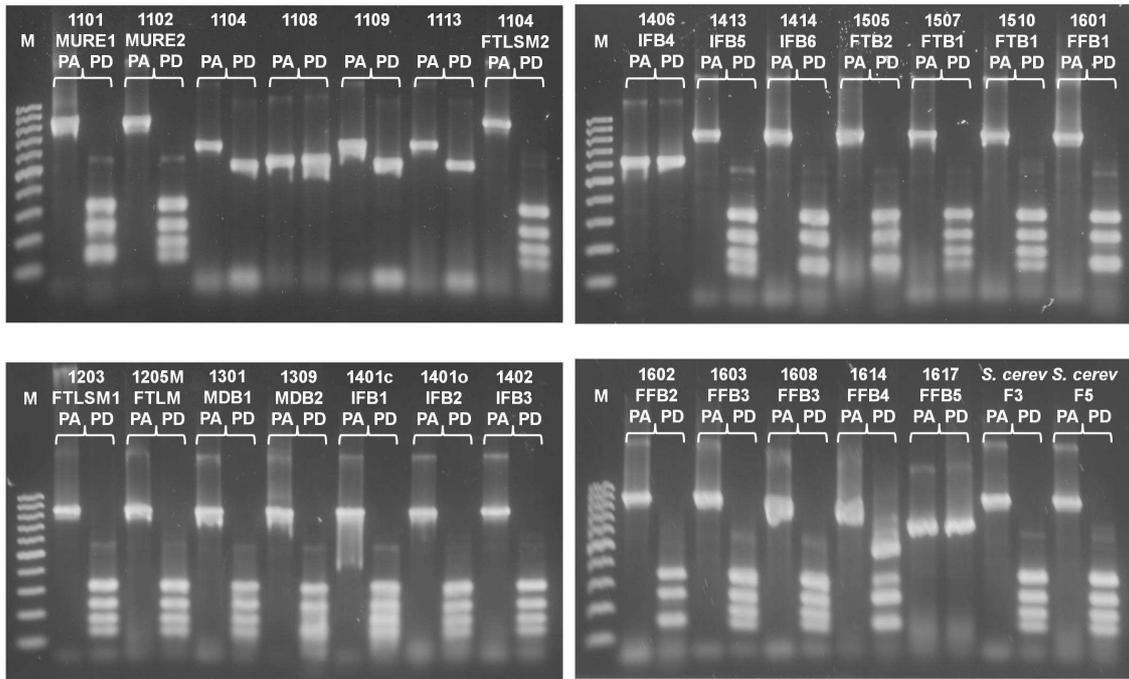


Tabla 4.3: Tamaño (pb) de los productos de amplificación y de los fragmentos de restricción *HaeIII* de los aislados.

Aislado/Patrón	PA¹	Fragmentos Restricción <i>HaeIII</i>	Género	Especie
1101/MURE1	834	331 + 246 + 146	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1102/MURE2	858	332 + 251+ 188 + 143	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1104/NPD	661	525 + 83	no- <i>Saccharomyces</i>	
1108/NPD	555	553	no- <i>Saccharomyces</i>	
1109/NPD	661	527 + 82	no- <i>Saccharomyces</i>	
1113/NPD	667	527 + 77	no- <i>Saccharomyces</i>	
1202/FTLSM2	848	298 + 224 + 160 + 117	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1203/FTLSM1	860	328 + 246 + 181 + 135	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1205M/FTLM	861	331 + 248 + 183 + 135	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1301/MDB1	851	323 + 241 + 176 + 128	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1309/MDB2	842	313 + 234 + 135	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1401c/IFB1	846	326 + 243 + 178 + 128	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1401o/IFB2	837	320 + 237 + 173 + 130	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1402/IFB3	843	327 + 245 + 181 + 137	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1406/IFB4	621	617	no- <i>Saccharomyces</i>	
1413/IFB5	848	331 + 251 + 181 + 132	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1414/IFB6	840	322 + 234 + 142	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1505/FTB2	835	332 + 240 + 148	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1507/FTB1	836	334 + 253 + 195 + 147	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1510/FTB1	829	329 + 251 + 194 + 142	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1601/FFB1	821	320 + 245 + 148	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1602/FFB2	843	322 + 247 + 155	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1603/FFB3	849	345 + 261 + 208 + 158	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1608/FFB3	855	335 + 255 + 198 + 148	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
1614/FFB4	837	483 + 301 + 225 + 128	no- <i>Saccharomyces</i>	
1617/FFB5	595	597	no- <i>Saccharomyces</i>	
F3	867	326 + 243 + 178 + 131	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
F5	842	311 + 232 + 168 + 121	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>

¹ PA: Tamaño en pb de los productos de amplificación.

Figura 4.12: Patrones de restricción *Hae*III de la región ITS-5.8S, de los aislados analizados (PA: Producto de amplificación, PD: Producto de digestión enzimática). M: Marcador de peso molecular 100 pb (Biotools).



5. CONCLUSIONES

El análisis molecular de 81 aislados obtenidos a partir de cinco etapas del proceso de vinificación, y de 33 aislados obtenidos a partir de la realización de dos microvinificaciones en laboratorio, demuestra la presencia de 12 patrones de restricción de ADNmt diferentes, que ponen de manifiesto la participación de 12 cepas distintas de levaduras vínicas. La mayor diversidad de patrones se encuentra en el inicio y en el final de fermentación en bodega; mientras que las etapas de fermentación tumultuosa, tanto en el laboratorio como en la bodega presentan la menor variabilidad de patrones, destacando la dominancia de una única cepa en las tres fermentaciones. Es importante señalar que en la etapa de mosto de uva recién estrujada la variabilidad de patrones encontrada es menor de la esperada, hecho al que contribuye la necesidad de ajustar el protocolo de extracción de ADN total para cuatro de los aislados de esta etapa, que no pudieron ser caracterizados mediante RFLP-ADNmt. Al igual que el mosto de uva recién estrujada, el mosto desfangado en bodega presenta una baja diversidad de patrones. Ninguno de los patrones determinados en las etapas iniciales del proceso de vinificación fue identificado en las etapas de fermentación posteriores desarrolladas en bodega, lo que parece señalar que la influencia del ambiente bodega es muy destacada en el desarrollo de la fermentación. La utilización de metabisulfito durante la fermentación en laboratorio determina la selección de una cepa concreta, y diferente a la cepa que desarrolla la fermentación en las mismas condiciones, pero sin metabisulfito. Ninguna de las cepas responsable del proceso de fermentación en laboratorio fue determinada en la fermentación desarrollada en bodega, hecho que confirma la influencia del ambiente bodega en el proceso de vinificación.

En el conjunto de aislados analizados, se distinguieron 5 especies diferentes de levaduras vínicas. Solamente 7 aislados fueron identificados como no-*Saccharomyces*, siendo determinados como *S. cerevisiae* el 71% de los aislados. El mosto de uva recién estrujada, el final y el inicio de fermentación son las etapas del proceso de vinificación donde se localizan estos aislados, ordenadas de mayor a menor presencia. No fue posible la identificación a nivel de especie de los aislados no-*Saccharomyces*. La dominancia de diferentes cepas de *S. cerevisiae* es evidente en todas las etapas del proceso de vinificación, incluidas las etapas iniciales del mismo. La elevada presencia de *S. cerevisiae* en el mosto de uva recién estrujado es un hecho inusual no confirmado por otros autores (Jemec *et al.*, 2001; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Bezerra-Bussoli *et al.*, 2013).

Este trabajo es el inicio de un complejo estudio del ecosistema de levaduras vínicas, que comprende varios procesos de vinificación desarrollados a partir de la uva recolectada en cinco parcelas diferentes, y en tres campañas de vendimia sucesivas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una composición poblacional no descrita hasta el momento, en las primeras etapas del proceso de vinificación. Estos resultados deben de ser confirmados con el análisis de nuevos aislados, procedentes de procesos de vinificación realizados a partir de la uva recolectada en otras parcelas, durante la misma campaña de vendimia; y de aislados procedentes del proceso de vinificación de uva recolectada en la misma parcela, en campañas de vendimia de años sucesivos.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la supervisión de las Dras. María Simarro Grande, Violeta Ruipérez Prádanos, y la enóloga Marta Baquerizo Mesonero-Romanos. Muchas gracias por vuestra ayuda y por vuestro apoyo constante.

También me gustaría agradecer la paciencia y la buena disposición del grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Medicina, especialmente a Roberto y Raquel.

Además, quisiera agradecer la ayuda ofrecida por el ITACyL, especialmente a los Drs. David Rodríguez Lázaro y Marta Hernández Pérez, al dejarme realizar parte de los experimentos en sus laboratorios.

Gracias Álvaro, por tu ayuda, por tu compañía en las tardes de laboratorio, y por compartir tus conocimientos enológicos conmigo.

Gracias Bea, por estar ahí para todo, en esta aventura llamada "Máster".

Mil gracias a mi familia y a Ricardo, por ser mi fuente de fuerza, de energía, de cariño, de alegría; y por hacerme mirar al frente con humildad, con valor, y con optimismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, A., Matallana, E., & del Olmo, M. (2005). Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Microbiología del vino* (pp.19-56). Madrid: AMV EDICIONES.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., García, M.D., & Querol, A. (1997). Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial analysis. *System Applied Microbiology*, 20, 397-408.
- Bezerra-Bussoli, C., Alves-Baffi, M., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2013). Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a brazilian winery. *Current Microbiology*, 67, 356-361.
- Capece, a., Siesto, G., Poeta, C., Pietrafesa, R., & Romano, P. (2013). Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional "Kakhetian" method. *Food Microbiology*, 36, 447-455.
- Constantí, M., reguant, C., Poblet, M., Zamora, F, Mas, A., & Guillamón, J. M. (1998). Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculums on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 169-175.
- Di Maio, S., Polizzotto, G., Di Gangi, E., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Scacco, A., Amore, G., & Oliva, D. (2012). Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of south-eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PLoS ONE*, 7(2), 1-13.
- Esteban, R., & Rodríguez-Cousiño, N. (2008). 23S RNA-derived replicon as a 'molecular tag' for monitoring wine yeast strains. *Yeast*, 25, 359-369.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., & Querol, A. (2005). Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Microbiología del vino* (pp.148-184). Madrid: AMV EDICIONES.
- Fernández-Espinar, M. T., Llopis, S., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Molecular identification and characterization of wine yeasts. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Molecular wine microbiology* (pp. 111-140). New York: Elsevier Inc.
- Gerner-Smidt, P., Graves, L. M., Hunter, S., & Swaminathan, B. (1998). Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: comparative evaluation of two commercial software packages. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5), 1318-1323.
- Ibáñez, C., Pérez-Torrado, R., Chiva, R., Guillamón, J. M., Barrio, E., & Querol, A. (2014). Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptative strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 129-135.

- Jemec, K. P., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., & Raspor, P. (2001). Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18, 247-259.
- Kunicka-Styczynska, A., & Rajkowska, K. (2012). Phenotypic and genotypic diversity of wine yeasts used for acidic musts. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1929-1940.
- López, V., Querol, A., Ramón, D., & Fernández-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 75-81.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), 2011. Résolution OIV-OENO 408-2011. Outils de biologie moléculaire pour l'identification de la levure de vinification *Saccharomyces cerevisiae* et d'autres espèces de levures liées à la vinification. Assemblée Générale, Porto, le 24 juin.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain and characterization. *Systematic Applied Microbiology*, 15, 439-446.
- Requejo Frutos, B. (2014). Ecología de levaduras de la uva al vino. Métodos moleculares de tipado de levaduras. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). Tratado de Enología. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones. (1st ed.). Buenos Aires: Hemisferio Sur, (Capítulo 1).
- Rodríguez-Lerma, G. K., Gutiérrez-Moreno, K., Cárdenas-Manríquez, M., Botello-Álvarez, E., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., & Navarrete-Bolaños, J. L. (2010). Microbial ecology studies of spontaneous fermentation: starter culture selection for prickly pear wine production. *Journal of Food Science*, 76(6), M346-M352.
- Segura, G., Luis, E., Kirchmayr, M. R., Flores, B., Ericka, P., Gschaedler, M., & Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *E-Gnosis*, 8, 1-12.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2014). Biodiversity study of wine yeasts belonging to the "terroir" of Montepulciano d'Abruzzo "Colline Teramane" revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12.
- Toquero González, B. (2011). Influencia del terruño y la meteorología en la población de levaduras de los viñedos de variedad Verdejo en la D. O. Rueda. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.