





UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA,  
MEDICINA Y CC BIOSANITARIAS

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS INDÍGENAS  
MEDIANTE *AFLP* Y ESTUDIO DE SU INFLUENCIA  
EN FERMENTACIONES DIRIGIDAS PARA LA  
OBTENCIÓN DE VINOS DE AUTOR

*por*

Ignacio Baselga Carretero

Madrid, 2016



**IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS INDÍGENAS  
MEDIANTE *AFLP* Y ESTUDIO DE SU INFLUENCIA  
EN FERMENTACIONES DIRIGIDAS PARA LA  
OBTENCIÓN DE VINOS DE AUTOR**

Memoria presentada por D. Ignacio Baselga Carretero para la obtención del título de Doctor en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria.



El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en la **Universidad Francisco de Vitoria (UFV)** bajo la dirección del **Dr. Cruz Santos Tejedor**, profesor titular de Microbiología en la Universidad Francisco de Vitoria.

Este trabajo ha contado con financiación propia de la Universidad Francisco de Vitoria (ESB0014403-30/1218).



**Universidad  
Francisco de Vitoria  
UFV Madrid**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Biología**

**Madrid, 2016**



*Camina continuamente, avanza sin parar; no te pares en el camino, no retrocedas, no te desvíes. El que se para no avanza. El que añora el pasado vuelve la espalda a la meta. El que se desvía pierde la esperanza de llegar. Es mejor ser un cojo en el camino que un buen corredor fuera de él.*

*San Agustín de Hipona*

*(Sermón 169, 18)*



## AGRADECIMIENTOS

El trabajo que aquí se expone, si bien es el resultado del tenaz esfuerzo del autor y su director de tesis, nunca hubiese llegado a término sin el apoyo, ayuda y cooperación de las personas e instituciones que citaré a continuación, muchas de las cuales han sido un indiscutible refuerzo a lo largo de esta carrera de fondo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Fundación Francisco de Vitoria su generosidad y la confianza depositada en mi, habiéndome concedido una de sus primeras becas FPI y facilitándome el acceso a las instalaciones y equipos de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Francisco de Vitoria.

Gracias a mi director de tesis, el Dr. Cruz Santos, no sólo por haberme guiado y formado como investigador a lo largo de este proceso, sino también porque me ha facilitado el camino dándome libertad y ayudándome a conseguir financiación en cada oportunidad. *Jefe, lo hemos conseguido.*

Este trabajo “nunca hubiese sido” sin la ayuda del equipo del Departamento de Secuenciación Masiva del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, gracias a la Dra. Gemma Rodríguez-Tarduchy por abrirme las puertas de su laboratorio y a todo su equipo. Especialmente quiero agradecer a Conchi cada hora dedicada a los AFLP, ella ha sido un eje fundamental en el desarrollo del capítulo molecular de esta tesis.

Special thank you to Dr. Michael Qian, his wife and his team for trusting in our project and giving me the opportunity to be part of his team at the Oregon State University, where I learned about the food aroma analysis processes. 謝謝 to Toni, Fei, Fan and Fang for being my partners and Chinese teachers during my stay.

Le estoy muy agradecido, y creo que no sólo yo, a María Berzal cada minuto invertido en este proyecto, habiéndonos enseñado a comprender mejor el vino y orientándonos en la selección de las levaduras.

Desde que entré a formar parte como alumno de la UFV (hace sólo un par de días) son muchos los que empezaron como profesores, se convirtieron en compañeros y han acabado siendo amigos. Gracias a todos los miembros del *departamento*: Noe, Susana, Ana, Sierra, Elvira, Raquel, Maite, Estela, Cris, Galán, Mayte Grande, Mayte Moreno, Olga, Javier, Pilar y Julián, habéis hecho único este período. Tengo una palabra especial para cada uno de ellos, pero quiero agradecerse especialmente a Elvira, ya que gracias a ella tuve la oportunidad de formar parte del *grupo de micro*, a Javier, puesto que su perseverancia e interés han dado muchos de los frutos de este trabajo y a Susana, cuyas correcciones llegaron a tiempo.

A mi equipo *expat* de Oregon: Julia gracias por formar equipo conmigo y Alex gracias por compartir las sobremesas, sin vosotros sólo me hubiesen rodeado un montón de “chafas”.

Al *equipo*, gracias, somos familia y lo que la universidad de los sueños rotos ha unido, que no lo separe el éxito. Fran, hermano, gracias por hacerme crecer y tener que llevar doble ración en la vianda; Blanch, tu que eres experta en casi todas las disciplinas gracias por toda la disponibilidad que nos has brindado para hacer planes; Lulu, gracias por tu energía y por hacer más necesario el uso del sonotone; Panoli fuiste una gran pérdida, pero gracias por tu complicidad y tus fondos de pantalla (nunca olvides el secreto de mi éxito, te servirá); Dani gracias por compartir tus pasiones y chistes de manera tan impetuosa, eres un genio; Elena hemos compartido poco, pero gracias por algún desayuno, eso seguro.

Nunca dejaré de agradecerse a *humillao*, a quienes sólo les he tenido que explicar a que me dedicaba cada miércoles, jueves, viernes y sábado noche y contestar a su cariñosa pregunta: *¿y cuándo lees?* Barandi, Valle, Herraiz y Mota, sois mis hermanos, gracias por vuestras infinitas invitaciones a cenas y refrigerios, por cada momento y por pasearme cuando estuve fuera de juego. Goico, gracias por las hamburguesas mensuales, mucha suerte en Japón. Tadeo, Alfonso, Bea y Marina, gracias por cada verano compartido en el pantano, ¡lo he conseguido!

A mi familia, os lo debo todo. Gracias por vuestro apoyo y orgullo, esto es vuestro también. Madre, tu me has apoyado en cada decisión y dado ánimos desde el primer día; Padre, gracias por tus conocimientos de Excel que han hecho real parte de este estudio y por los irrepitibles aperitivos del Galaxia; Petarda, gracias por estar siempre ahí y por tu impositivo e incansable apoyo; Jorge, ahora te tengo que incluir en este grupo, gracias por las grandes risas y por llevarte a mi hermana; Primo, gracias por las escapadas al campo, a partir de ahora invito yo; Tía Fifi, gracias por ayudarme durante todo el camino, meta alcanzada; Abuela, lo hemos conseguido, gracias por no perder la fe en tu nieto y por siempre mostrar un apoyo incondicional; tía Yaya gracias por haberme apoyado siempre y haber estado a mi lado, espero que lo puedas ver desde donde estés.

Boli, gracias por haber estado ahí durante los momento más difíciles. Gracias por ayudarme a dar el siguiente paso, por enseñarme a ser tenaz y muy pushy para conseguir lo que uno quiere. Tu incansable paciencia, ilimitada comprensión e inestimable apoyo han llenado de vida cada momento, haciéndome crecer y ser organizado. Gracias por ser como eres, no se te ocurra cambiar.







# Índices



---

---

**ÍNDICE GENERAL*****Página*    *Sección y Apartados*****xxvii**    **SUMMARY****1**    **I. INTRODUCCIÓN****3**    **I.1. EL VINO****3**    I.1.1. Historia del vino**4**    I.1.2. El vino en números**4**    **I.2. LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN****4**    I.2.1. La D.O. Ribera del Duero**5**    I.2.2. Vitis vinífera var. Tempranillo**7**    **I.3. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA****7**    I.3.1. Composición del mosto**10**    I.3.2. Parámetros limitantes de la fermentación**11**    I.3.3. Levaduras vínicas**16**    **I.4. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS****16**    I.4.1. Técnicas de identificación no moleculares**17**    I.4.2. Técnicas moleculares para la identificación de especies**18**    I.4.3. Identificación de cepas**20**    I.4.4. Huella molecular mediante AFLP**22**    **I.5. EL AROMA DEL VNO****22**    I.5.1. Clasificación aromática**24**    I.5.2. Compuestos volátiles que caracterizan el aroma fermentativo

---

---

|    |  |
|----|--|
| 28 | I.5.3. Análisis de la fracción volátil                   |
| 33 | <b>II. OBJETIVOS</b>                                     |
| 35 | II.1. Objetivo general                                   |
| 35 | II.2. Objetivos parciales                                |
| 39 | <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                         |
| 41 | <b>III.1. MATERIAL BIOLÓGICO</b>                         |
| 41 | III.1.1. Levaduras                                       |
| 41 | III.1.2. Enzimas   |
| 42 | <b>III.2. MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO</b>              |
| 42 | III.2.1. Reactivos                                       |
| 42 | III.2.2. Medios de cultivo                               |
| 43 | III.2.3. Tampones y soluciones                           |
| 44 | III.2.4. Oligonucleótidos                                |
| 45 | III.2.5. Compuestos volátiles                            |
| 46 | <b>III.3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS</b> |
| 46 | III.3.1. Aislamiento de levaduras                        |
| 48 | III.3.2. Conservación de levaduras                       |
| 49 | <b>III.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS</b>           |
| 49 | III.4.1. Purificación de ADN genómico de levadura        |
| 50 | III.4.2. Caracterización molecular de levaduras          |
| 54 | <b>III.5. FERMENTACIONES</b>                             |

---

---

|            |   |
|------------|---|
| <b>55</b>  | <b>III.6. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES VINCULADOS CON EL AROMA DEL VINO</b>                   |
| <b>56</b>  | III.6.1. Análisis sensorial   |
| <b>56</b>  | III.6.2. Análisis de la fracción volátil por GC-FID   |
| <b>57</b>  | III.6.3. Análisis de la fracción volátil mediante HS-SPME-GC-MS                                   |
| <b>59</b>  | III.6.4. Análisis estadístico   |
| <br>       |   |
| <b>63</b>  | <b>IV. RESULTADOS</b>   |
| <br>       |   |
| <b>65</b>  | <b>IV.1. TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS</b>  |
| <br>       |   |
| <b>67</b>  | <b>IV.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INTERESPECÍFICA DE LEVADURAS</b>                               |
| <b>68</b>  | IV.2.1. Análisis ITS-RFLP   |
| <b>70</b>  | IV.2.2. Secuenciación de la región D1/D2  |
| <b>72</b>  | IV.2.3. Caracterización intraespecífica   |
| <br>       |   |
| <b>75</b>  | <b>IV.3. BASE DE DATOS DE MARCADORES AFLP DE LEVADURAS VÍNICAS</b>                                |
| <br>       |   |
| <b>80</b>  | <b>IV.4. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN MUESTRAS DE COMPLEJAS</b>                                 |
| <b>80</b>  | IV.4.1. Límite de detección de la técnica AFLP  |
| <b>85</b>  | IV.4.2. Identificación de levaduras en muestras de mosto  |
| <br>       |   |
| <b>92</b>  | <b>IV.5. INFLUENCIA DE LEVADURAS INDÍGENAS EN EL AROMA DEL VINO</b>                               |
| <b>92</b>  | IV.5.1. Fermentaciones individuales   |
| <b>98</b>  | IV.5.2. Fermentaciones dobles   |
| <br>       |   |
| <b>106</b> | <b>IV.6. ESTUDIO DEL POTENCIAL ENOLÓGICO DE TRES LEVADURAS INDÍGENAS DE TIPO NO-SACCHAROMYCES</b> |
| <b>109</b> | IV.6.1. <i>Lachancea thermotolerans</i> ( <u>Lt<sub>1</sub></u> )                                 |

---

---

|     |   |
|-----|---|
| 114 | IV.6.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> ( <u>Mp<sub>3</sub></u> )  |
| 118 | IV.6.3. <i>Hanseniaspora uvarum</i> ( <u>Hu<sub>1</sub></u> )   |
| 124 | IV.6.4. Análisis estadístico del efecto de las levaduras <u>Lt<sub>1</sub></u> , <u>Mp<sub>3</sub></u> y <u>Hu<sub>1</sub></u> en la producción de siete compuestos volátiles interesantes en el aroma del vino |
| 131 | <b>V. DISCUSIÓN</b>   |
| 131 | <b>V.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS</b>  |
| 138 | <b>V.2. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN MUESTRAS COMPLEJAS</b>   |
| 142 | <b>V.3. ESTUDIO DEL POTENCIAL ENOLÓGICO DE TRES CEPAS DE LEVADURAS INDÍGENAS: <u>Lt<sub>1</sub></u>, <u>Mp<sub>3</sub></u> Y <u>Hu<sub>1</sub></u>.</b>   |
| 145 | V.3.1. Fermentaciones complejas: aromas frutales y florales   |
| 149 | V.3.1. Fermentaciones complejas: aromas no deseados   |
| 155 | <b>VI. CONCLUSIONES</b>   |
| 161 | <b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>  |
| 189 | <b>VIII. ABREVIATURAS</b>   |
| 197 | <b>IX. ANEXOS</b>   |
| 199 | <b>XI.1. ANEXO 1: COMPARACIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS</b>  |

---

---

**201 XI.2. ANEXO 2: PERFILES AFLP ESPECÍFICOS DE ESPECIE Y CEPA****ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS****FIGURAS*****Página Figuras***

- 5** **Figura 1.** Mapa de la región que ocupa la D. O. Ribera del Duero.
- 6** **Figura 2.** *Vitis vinifera* var. *Tempranillo*.
- 15** **Figura 3.** Representación esquemática de la transformación de glucosa en etanol durante la fermentación alcohólica.
- 21** **Figura 4.** Representación esquemática de la metodología AFLP.
- 23** **Figura 5.** Formación de compuestos vinculados al aroma del vino durante el proceso fermentativo por acción del metabolismo de la levadura.
- 25** **Figura 6.** Representación visual de los descriptores aromáticos de tres alcoholes.
- 26** **Figura 7.** Representación visual de nueve de los descriptores aromáticos de los ésteres y acetatos más habituales en los vinos tintos.
- 28** **Figura 8.** Representación de los descriptores aromáticos y su estructura química de tres de los ácidos volátiles más habituales en vinos tintos.
- 47** **Figura 9.** Representación gráfica del método utilizado para el aislamiento de las levaduras presentes en el hollejo de la uva.
- 48** **Figura 10.** Procedimiento para el aislamiento de las levaduras presentes en el mosto de uva.
- 54** **Figura 11.** Fermentador diseñado para llevar a cabo fermentaciones en el laboratorio.
- 66** **Figura 12.** Colonias de levaduras indígenas crecidas en diferentes medios de cultivo.

- 
- 
- 68 **Figura 13.** Regiones ITS amplificadas por PCR de diferentes levaduras.
- 69 **Figura 14.** Digestiones de la región ITS.
- 73 **Figura 15.** Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *H. uvarum*.
- 74 **Figura 16.** Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *M. pulcherrima*.
- 77 **Figura 17.** Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *L. thermotolerans*.
- 78 **Figura 18.** Representación esquemática de los perfiles AFLP específicos de especie y cepa de levadura obtenidos con los cebadores S y J.
- 82 **Figura 19.** Representación gráfica de las combinaciones de levaduras realizadas para el estudio del límite de detección y resultado del análisis.
- 84 **Figura 20.** Gráfico de las combinaciones de ADN de levaduras analizadas para el estudio del límite de detección y resultado del análisis.
- 87 **Figura 21.** Comparación de electroferogramas obtenidos de tres muestras de mosto recogidas los días 2 (M9), 7 (M10) y 21 (M11) de la fermentación.
- 95 **Figura 22.** Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones individuales.
- 97 **Figura 23.** Comparación de los perfiles de los compuestos volátiles analizados en las fermentaciones F11 a F18 en base a su producción relativa.
- 100 **Figura 24.** Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones dobles FD1 a FD8 y la control Sc<sub>1</sub>.
- 101 **Figura 25.** Perfiles aromáticos obtenidos en las fermentaciones dobles FD1 a FD8 y la control con Sc<sub>1</sub> en base a la producción relativa de los compuestos volátiles analizados.
- 103 **Figura 26.** Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones dobles FD9 a FD16 y la control Sc<sub>0</sub>.

- 
- 104 Figura 27.** Comparación de perfiles globales de producción de los compuestos volátiles analizados en las fermentaciones FD9 a FD16 y la control Sc<sub>0</sub>.
- 105 Figura 28.** Comparación de las cantidades relativas obtenidas de los cuatro compuestos comunes analizados entre las fermentaciones individuales y dobles.
- 108 Figura 29.** Levaduras inoculadas en las fermentaciones complejas para estudiar la influencia de Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub> en el aroma secundario de los vinos.
- 110 Figura 30.** Representación gráfica de la concentración (mg/L) registrada de los acetatos estudiados en función de la concentración inoculada de Lt<sub>1</sub>.
- 111 Figura 31.** Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) obtenidas tras la cuantificación de ésteres en función del número de células inoculadas de Lt<sub>1</sub>.
- 112 Figura 32.** Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) registradas de alcohol de feniletanol y ácidos en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3.
- 115 Figura 33.** Representación gráfica de las concentraciones relativas (mg/L) registradas de acetatos estudiados en función a la concentración inicial de Mp<sub>3</sub> en el mosto.
- 116 Figura 34.** Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) de los ésteres estudiados en función de la concentración inicial de Mp<sub>3</sub>.
- 117 Figura 35.** Representación gráfica de la concentración que se obtuvo de alcohol de feniletanol y ácidos en las fermentaciones FCM0 a FCM3, en las que se varió la concentración inicial de Mp<sub>3</sub>.
- 119 Figura 36.** Representación gráfica de las concentraciones, en mg/L, que se registraron de los cinco acetatos estudiados en las cuatro

---

---

fermentaciones en las que se varió la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>.

**120 Figura 37.** Representación gráfica de las concentraciones, en mg/L, que se registraron de los ésteres cuantificados en las cuatro fermentaciones en las que se varió la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>.

**122 Figura 38.** Representación gráfica de la concentración (mg/L) de alcohol de feniletanol y ácidos en mostos fermentados variando la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>.

## TABLAS

### *Página Sección y Apartados*

- 41 Tabla 1.** Cepas de levaduras comerciales y levaduras tipo.
- 41 Tabla 2.** Enzimas empleadas en la manipulación de ácidos nucleicos.
- 42 Tabla 3.** Reactivos necesarios para la caracterización de los aislados de levadura.
- 43 Tabla 4.** Composición de los tampones y soluciones empleados en este estudio.
- 44 Tabla 5.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la caracterización interespecífica de levaduras.
- 44 Tabla 6.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados para obtener los AFLP de las levaduras.
- 45 Tabla 7.** Compuestos utilizados para la cuantificación de ácidos, ésteres, aldehídos, acetatos y alcoholes.
- 46 Tabla 8.** Compuestos volátiles utilizados como patrones internos.
- 52 Tabla 9.** Programa de amplificación selectiva para la obtención de AFLP.
- 67 Tabla 10.** Número de aislados de levadura seleccionadas por vendimia y por muestra.

- 
- 
- 71** **Tabla 11.** Número de aislados de levadura identificados en función del año y el pago de procedencia.
- 75** **Tabla 12.** Número de cepas identificadas de las especies analizadas en función al par de oligonucleótidos utilizado para obtener los AFLP.
- 86** **Tabla 13.** Mostos utilizados para la identificación de levaduras por AFLP.
- 88** **Tabla 14.** Especies y cepas de levaduras identificadas mediante la técnica AFLP en las muestras de mosto analizadas.
- 94** **Tabla 15.** Valoración de las fermentaciones individuales realizadas con levaduras indígenas de tipo no-*Saccharomyces* por el panel de cata.
- 98** **Tabla 16.** Fermentaciones dobles realizadas mediante la inoculación secuencial de las cepas de levaduras indígenas de tipo no-*Saccharomyces* seleccionadas y *S. cerevisiae* Sc<sub>0</sub> o Sc<sub>1</sub>.
- 110** **Tabla 17.** Análisis estadístico de la concentración (mg/L) de los acetatos cuantificados en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3.
- 111** **Tabla 18.** Concentraciones (mg/L) obtenidas en FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3 de los ésteres estudiados y resultado de su comparación estadística (ANOVA).
- 113** **Tabla 19.** Concentración (mg/L) y análisis de varianza ANOVA de los alcoholes y ácidos estudiados que se registraron en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3.
- 114** **Tabla 20.** Resultado de la cuantificación (mg/L) de los acetatos seleccionados llevada a cabo en las fermentaciones FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3 y su comparación estadística.
- 116** **Tabla 21.** Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones (mg/L) registradas de los esteres estudiados en los mostos fermentados de FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3.
- 117** **Tabla 22.** Producción en mg/L que se cuantificó del alcohol y ácidos estudiados en los mostos de las fermentaciones FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3.

- 
- 
- 120 Tabla 23.** Concentración (mg/L) de los seis acetatos estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3 y comparación estadística de los datos.
- 121 Tabla 24.** Comparación estadística de las concentraciones (mg/L) que se registraron de los seis ésteres estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3.
- 122 Tabla 25.** Datos obtenidos tras la cuantificación y comparación estadística de la concentración de 2-feniletanol de los ácidos estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3.
- 125 Tabla 26.** Análisis de varianza ANOVA de las concentraciones (mg/L) registradas de los compuestos volátiles seleccionados en función de la actividad de las levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub>.







# Summary



Wine production is one of the oldest and most ingrained biotechnological process in human history worth more than 4 billion euros in 2016. In the last years, this ancient industry started a new era to adapt production to the interests of consumers, who demand high quality natural and organic wines. The employment of clear-cut methods of cultivation, harvesting and fermentation, as stated within the framework of the “EU No 203/2012 of 8 March 2012” and the use of indigenous yeasts from their cultivars and wineries, guarantee the production of wines with unique flavor and aroma qualified by the region's “*terroir*”. The focus of this work has been the study of the indigenous yeasts isolated from the wineries *Aster* and *Diaz Bayo* from Ribera del Duero (P.D.O). One thousand two hundred indigenous yeasts from the cellar and grapes of the wineries were isolated and characterized using molecular standardized methods (ITS-RFLP and sequencing of D1/D2 regions). Then, 43 wild yeasts were characterized using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) molecular markers obtained with seven primer pairs fluorescent labelled (FAM or HEX). Using the species and strain specific AFLP alleles amplified with two primer sets (S and J) a database was created for the identification of wine yeasts in must samples, without the use of microbial cultures. In addition, fermentation experiments using *Tempranillo*'s commercial wort were carried out with selected wild strains in order to observe their influence in the production of organic compounds determining the wine aroma. Three yeast strains, Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> and Hu<sub>1</sub>, stood out since they produced ethyl hexanoate, ethyl octanoate and 2-phenylethanol, which contribute to the fruity (banana, peach notes) and floral (rose notes) aromas in *Tempranillo* wine.









I

# Introducción



## **I.1. EL VINO**

En el B.O.E. del 11 de julio de 2003, el vino se define como: “el alimento natural obtenido por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”.

Esta definición puede completarse si se tiene en cuenta que desde un punto de vista microbiológico el proceso de producción del vino tinto implica dos fases: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, ambas llevadas a cabo por un conjunto heterogéneo de microorganismos (levaduras, bacterias y hongos filamentosos) que interactúan activamente entre ellos (Fleet, 2007; Fleet y col., 2007; Fugelsang y Edwards, 2007; Moreno-Arribas y Polo, 2005).

### **I.1.1. Historia del vino**

Los historiadores sitúan el origen del vino en una región de Oriente Próximo que comprende los territorios de Irak, Irán y Armenia, donde se han encontrado restos de vasijas datadas entorno a los años 6.000 y 8.000 a.C. Debido quizás a su efecto embriagador, la mayoría de los pueblos de la Antigüedad otorgaron al vino propiedades divinas y le hicieron un hueco en su mitología: los egipcios se lo atribuyeron a Osiris (dios de la resurrección); los griegos le entregaron una divinidad propia, Dionisio (dios del vino); e incluso los judíos consideran a Noé el primer viticultor. El apogeo de su expansión se alcanzó a través del Imperio Romano y se potenció con el Cristianismo, puesto que allí donde había un monasterio fue sembrada la vid para la producción de vino litúrgico (Standage, 2006).

En España, sin embargo, el origen del vino no está tan claro. Algunos historiadores atribuyen su importación a los *Tartessos* (sur de España) en torno al año 2200 a.C., mientras que otros se los atribuyen a los *Púnicos* en el s. V a.C., posiblemente por las técnicas de regadío que introdujeron en la península. Sobre lo que no hay ni ha habido disputa, es sobre la gran calidad de los vinos que dan nuestras tierras. Este hecho quedó demostrado con la

---

---

necesidad del *edictum de pretiis maximis* del emperador Diocleciano en el s. IV, documento en el que se recogía la regularización comercial de productos como el vino y que evitó la quiebra de los bodegueros itálicos por causa de los caldos íberos (Johnson y Diéguez, 2005).

### **I.1.2. El vino en números**

Según la Organización Internacional del Vino (OIV), el consumo de vino en el periodo 2015-2016 fue de 239 millones de hectólitros (capacidad del embalse del Villar, Madrid), siendo los países de mayor consumo EEUU, Francia e Italia, mientras que España alcanzó, junto a Argentina, la séptima posición. No obstante, durante este mismo período, España alcanzó la tercera posición como productor, con 37,8 millones de hectólitros (259 millones producidos a nivel mundial), por valor de 4,1 billones de euros (OIV, 2016).

## **I.2. LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN**

La producción de vino no se reparte de forma equitativa en España, ya que desde finales del siglo XIX y principios del XX se impulsó la clasificación de los vinos por Denominación de Origen (D.O.), es decir, la producción de vino en regiones delimitadas, bajo una estricta normativa y que se ajusta a ciertas características. En España son más de 60 las D.O. establecidas, habiéndose trabajado a lo largo de este estudio únicamente con la *D.O. Ribera del Duero* (Ecológica, 2015).

### **I.2.1. D.O. Ribera del Duero**

La zona de Ribera del Duero (Figura 1) tiene una tradición vitivinícola muy antigua, como demuestra el mosaico romano del s. V encontrado en Baños de Valdearados en 1972 (Peñín, 2011), pero no fue reconocida como Denominación de Origen hasta el 21 de Julio de 1982 de mano del Ministerio

de Agricultura, Pesca y Alimentación (Duero, 2013). Las características y normativa que hacen única a esta D.O. fueron reflejadas en el B.O.E. del 10 de diciembre de 1992 y actualizadas en el B.O.C. y L. del 25 de octubre de 2006. Bajo esta normativa, durante el periodo 2014-2015, se comercializaron 58,8 millones de litros en España y 8,4 millones en el extranjero, representando la suma de ambos volúmenes el 5,8% del volumen total de vino comercializado por España (MAGRAMA, 2016).

El presente estudio fue desarrollado en colaboración con las bodegas *Áster* y *Díaz Bayo*, pertenecientes a esta Denominación de Origen y localizadas en las áreas de La Horra y Aranda de Duero (Burgos) respectivamente.



Figura 1. Mapa de la región que ocupa la D. O. Ribera del Duero.

### 1.2.2. *Vitis vinifera* var. *Tempranillo*

Las variedades que se cultivan de *Vitis vinifera* en la D.O. Ribera del Duero son: *Tempranillo*, *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Malbec*, *Garnacha Tinta* y *Albillo*, siendo esta última la única variedad blanca. La más abundante y relevante es la variedad *Tempranillo*, que supone el 20,9 % de los cultivos vitivinícolas españoles y el 95 % de la D.O. Ribera del Duero (Ramos y col., 2015). En otras regiones de España, se ha bautizado con diferentes nombres

---

---

como *Cencibel*, *Tinto Fino*, *Tinto del País* o *Tinta de Toro* (Muñoz-Organero y col., 2001).

Debido a su distribución geográfica y a su heterogénea nomenclatura, la variedad *Tempranillo* de *Vitis vinifera* fue considerada durante mucho tiempo un ejemplo de planta con un origen genético diferente pero con características fenotípicas similares (Cabello y col., 1993). Haciendo uso de marcadores moleculares AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados por PCR), Cervera y colaboradores demostraron que la variabilidad genética de esta especie era menor de lo que era su diversidad geográfica (Cervera y col., 2002; Cervera y col., 2001). De hecho se ha comprobado que las vides de *Tempranillo* introducidas en América por los colonizadores españoles en el s. XVII, han mantenido su herencia genética (Martínez y col., 2003).



**Figura 2.** *Vitis vinifera* var. *Tempranillo*.

La uva *Tempranillo* (Figura 2) debe su nombre a su temprana maduración, hecho que conlleva una sensibilidad mayor a las heladas primaverales y al ataque de oídios, ácaros y polillas del racimo. Se caracteriza por un ciclo vegetativo corto, contrariamente al resto de uvas mediterráneas, y un fruto uniforme de gruesa piel con bayas de color azul oscuro en racimos de forma cilíndrica y compactos. El mosto de uva producido por este grano es equilibrado en azúcar, color y acidez, aunque esta última suele ser reducida.

Además, presenta una alta concentración de taninos, siendo una uva que se conserva de una manera excepcional y con una exclusiva carga polifenólica que hace que admita muy bien la madera. Los vinos obtenidos con estos potentes mostos se caracterizan por un intenso color rojo rubí y por aromas típicos a tabaco, vainilla, cuero, hierba, bayas y ciruelo (Lucena y col., 2005). Como señalaban Clarke y Rand (Clarke y Rand, 2001): “para obtener elegancia y acidez de la *Tempranillo*, se necesita de un clima fresco, pero para conseguir niveles altos de azúcar y las gruesas pieles que dan el color intenso, se necesita calor”. Ésta es la climatología del verano en la región de la Ribera del Duero, con temperaturas medias de 21 °C, máximas de 40 °C y mínimas de 16 °C, lo que proporciona las condiciones óptimas para la producción de esta uva (Robinson y Robinson, 2006).

### **I.3. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL MOSTO DE UVA**

La fermentación alcohólica del mosto de uva es un proceso bioquímico en el que las levaduras metabolizan los azúcares del mosto transformándolos en etanol y dióxido de carbono, al tiempo que se producen gran cantidad de otros productos metabólicos que influyen en gran medida en la calidad y complejidad del vino (Fleet y Heard, 1993a; Fugelsang, 1997). El óptimo desarrollo de este proceso depende de la composición del mosto, de los parámetros limitantes de la fermentación como son la aireación o la temperatura, y de las levaduras que lo llevan a cabo.

#### **I.3.1. Composición del mosto**

El mosto de uva es un medio bastante complejo, que además de los azúcares que necesitan las levaduras durante la fermentación, contiene una gran variedad de compuestos químicos característicos que pueden influir en la cantidad y tipo de levaduras presente en él y en su crecimiento a lo largo del proceso fermentativo. Los principales componentes del vino son:

---

---

• Azúcares: los monosacáridos son los compuestos más abundantes después del agua, siendo los más destacados la glucosa y la fructosa, que se encuentran en concentraciones similares y representan entre el 20-25% de todos los compuestos. También pueden encontrarse bajas concentraciones de disacáridos como la sacarosa (Ough, 1992) o polisacáridos como las pectinas y dextrinas (Ribéreau-Gayon y col., 2006). La concentración final de azúcares debe ser menor de 300 g/L, puesto que con concentraciones más elevados el crecimiento de las levaduras queda inhibido como consecuencia de la presión osmótica (Nishino y col., 1985). Sin embargo, concentraciones muy bajas de azúcares provocan una disminución en el grado alcohólico.

• Lípidos: provienen del hollejo de la uva y son fundamentales para que las levaduras puedan sintetizar membranas plasmáticas que garanticen la resistencia al etanol y la asimilación de azúcares (Bertrand y Miele, 1984), ya que las levaduras sólo son capaces de sintetizar lípidos en condiciones aeróbicas (Sablayrolles y col., 1996), condiciones opuestas a las que se producen durante la fermentación alcohólica.

• Compuestos nitrogenados: estos compuestos son considerados un factor limitante para el metabolismo de las levaduras, debido a que pueden contribuir a detener el proceso fermentativo si se encuentran en exceso o en cantidades insuficientes (Bisson, 1999; Ingledew y Kunkee, 1985). Los principales compuestos nitrogenados presentes en el mosto son los polipéptidos (25-40%), los aminoácidos (25-30%), las proteínas (5-10%) y el amoníaco (3-10%) (Monteiro y Bisson, 1992). Su abundancia oscila entre 0,1 y 1 g/L en función de factores como el tiempo de recogida, el uso de fertilizantes, la infección por *Botrytis cinerea*, la adición de suplementos en la bodega y la clarificación (Lagunas, 1986).

• Ácidos orgánicos: después de los azúcares, los ácidos orgánicos son los compuestos más abundantes en el mosto, con concentraciones

comprendidas entre los 9 y los 27 g/L (Ough, 1992). De todos ellos, el ácido tartárico y el ácido málico destacan sobre los demás representando el 90% de la acidez fija, siendo el ácido tartárico más frecuente en mostos de regiones cálidas y el ácido málico más abundante en mostos de regiones frescas (Jackson, 1994).

- Sales minerales: aportan los cationes (potasio, sodio, calcio y magnesio) y aniones (sulfatos, cloratos y fosfatos) que regulan el pH y el balance iónico de las levaduras (Ough y Amerine, 1988). En ocasiones se añaden de forma artificial para asegurar el desarrollo del proceso fermentativo (Bisson, 1999).

- Polifenoles: son compuestos característicos de las uvas que se agrupan como flavonoides: flavonoles, flavan-3-oles y antiocianinas, y no flavonoides: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos y ácidos fenólicos (Cantarelli, 1989; Waterhouse, 2002). Están relacionados con el color, el aroma, la astringencia y la amargura de ciertos vinos y se les atribuyen interesantes propiedades nutraceuticas (Revilla y col., 2001). Aunque de forma general no afectan al crecimiento de las levaduras durante la fermentación, existen estudios que demuestran la influencia de las levaduras en la composición fenólica de los vinos, reduciendo la astringencia de los mismos (Caridi y col., 2004; Sacchi y col., 2005).

- Inhibidores: su procedencia está vinculada a la acción humana y se agrupan en dos categorías. Los sulfitos, que se añaden en concentraciones que oscilan entre 0,8 y 1,5 mg/L para eliminar los microorganismos que pueden alterar el proceso fermentativo, evitando concentraciones superiores, ya que pueden afectar al desarrollo de las levaduras (Sudraud y Chauvet, 1985). El otro grupo son los pesticidas, mayoritariamente fungicidas como el antiguo Captan®, que podían afectar al crecimiento de las levaduras, o el actual Pavilion®, con base

---

---

de fenhexamida, que no tiene consecuencias negativas sobre el crecimiento de las levaduras (Cabras y Angioni, 2000; Oliva y col., 2006).

### **I.3.2. Parámetros limitantes de la fermentación**

Teniendo en cuenta la composición del mosto, existen una serie de parámetros físico-químicos de los que depende el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica del mosto de uva:

- Aireación: la fermentación es un proceso anaerobio, pero la presencia de oxígeno al inicio ayuda al acondicionamiento del mosto, permitiendo que las levaduras lleven a cabo la síntesis de los componentes de la membrana plasmática (Ingledew y Kunkee, 1985) e inicien el consumo de compuestos nitrogenados (Sablayrolles y col., 1996), lo que provoca un incremento de biomasa.

- Dióxido de Carbono: es un producto generado como resultado del metabolismo fermentativo de las levaduras (Boulton y col., 1995), que disminuye la temperatura del proceso y distribuye los nutrientes al expandirse, aunque al igual que el aumento de temperatura, puede involucrarse en la evaporación de compuestos volátiles (Jackson, 1994).

- Temperatura: la temperatura influye de forma directa en el crecimiento de las levaduras, siendo la temperatura óptima a 30 °C (Watson, 1987), y en el desarrollo de la fermentación (Fleet y Heard, 1993b). Cuando la temperatura del tanque de fermentación es muy elevada se altera el metabolismo de las levaduras por choque térmico y el etanol y otros compuestos volátiles de interés pueden evaporarse, afectándose de este modo a la calidad del vino, mientras que temperaturas extremadamente bajas inhiben el crecimiento de las levaduras impidiendo de esta manera el avance de la fermentación (Villanúa y Torrija, 2003).

• pH: el pH del mosto oscila entre 2,8 y 4,2 (Gao y Fleet, 1988). Un pH muy ácido (<2,8), puede resultar perjudicial para la fermentación por provocar una disminución en la tolerancia de las levaduras al etanol (Pampulha y Loureiro-Dias, 1989) y a los sulfitos (Kudo y col., 1998). Mientras que un pH elevado (>4,2) puede resultar en un deterioro de las propiedades estéticas del vino como el color y suscitar el crecimiento de microorganismos causante del deterioro vínico (Kunkee, 1967; Vetsch y Lüthi, 1964).

### **1.3.3. Las levaduras vínicas**

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación. La mayoría pertenecen al filum *Ascomycota*, debido a su reproducción sexual y a la formación de cuatro *ascosporas* localizadas en el *asca* tras la meiosis de las células diploides. Se han identificado miles de microorganismos bajo esta definición, pero sólo 15 especies se consideran levaduras vínicas, cuyo hábitat natural es el hollejo de la uva o las instalaciones de las bodegas (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Las levaduras vínicas aisladas en estas localizaciones, se conocen como levaduras autóctonas, silvestres o indígenas de una bodega, pago o región (Gayevskiy y Goddard, 2012; Goddard y col., 2010), y su presencia depende de factores como las condiciones climatológicas, la disposición geográfica, los tiempos y técnicas de recolección, el uso de fungicidas o la acción de ciertos insectos (Boulton y col., 1995; Guzzon y col., 2014; Lafon-Lafourcade, 1983).

En el hollejo de la uva predominan las especies de levadura pertenecientes a los géneros no-*Saccharomyces*: *Torulaspóra*, *Lachancea* (*Kluyveromyces*), *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rodotorula*, *Picchia* y *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), aunque de forma menos frecuente, también se suelen obtener aislados de las especies consideradas fermentadoras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* (Fleet, 1993). En las instalaciones de las bodegas la situación es la contraria, ya que

---

---

predominan por encima de la demás las especies del género *Saccharomyces*, aunque en ocasiones, también han sido aisladas especies de algunos de los géneros no-*Saccharomyces* como *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Candida*, *Debaromyces* y *Picchia* (Martini y Martini, 1990; Ribéreau-Gayon y col., 2006).

### **I.3.3.1. Las levaduras en la fermentación**

Cuando el proceso fermentativo se lleva a cabo de forma tradicional, son las levaduras indígenas presentes en el hollejo las que comienzan el proceso de forma espontánea, dando comienzo a lo que se conoce como fermentación autóctona del mosto de uva (Serna, 2010). Al inicio de la fermentación predominan las levaduras de los géneros no-*Saccharomyces*, hasta que pasadas las primeras 20 horas las levaduras del tipo *Saccharomyces* entran en acción, convirtiéndose a partir del tercer o cuarto día en las levaduras predominantes en el mosto, debido a la disminución en la concentración de azúcares y a su tolerancia al etanol (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Los principales factores que condicionan el crecimiento de las levaduras autóctonas de tipo no-*Saccharomyces* son: una elevada concentración de azúcares (barrera para el crecimiento de *S. cerevisiae*), la producción de etanol (tóxico para algunas levaduras no-*Saccharomyces*), un aumento de la temperatura consecuencia de la fermentación o una alta concentración de sulfitos (dañino para todas las levaduras). Además, el número de especies de levaduras indígenas y su concentración en el mosto varían generalmente en cada añada, lo que puede provocar alteraciones no controlables del producto final (Santiago y col., 2011). Este es el motivo por el que en los años setenta surge la alternativa de usar levadura seca activa comercial, fundamentalmente cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* que aseguren una rápida y completa fermentación del mosto de uva (Nikolaou y col., 2006; Valero y col., 2005). Si bien, las levaduras indígenas, si no ven inhibido su crecimiento debido a la competencia con la levadura comercial, inoculada siempre en mayor concentración que las autóctonas, pueden

contribuir de manera significativa a las propiedades organolépticas del vino, aportando en muchos casos notas aromáticas únicas (Querol y col., 1992; Schütz y Gafner, 1993).

*S. cerevisiae* ha sido, y sigue siendo, la levadura predominante en la fermentación alcohólica del mosto por su tolerancia al etanol, de ahí su capacidad de concluir la fermentación. Son muchas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se han seleccionado y comercializado durante las últimas décadas. Sin embargo, en los últimos años las empresas comercializadoras de levaduras han incorporado nuevas especies y cepas con las que mejorar las propiedades enológicas y las características sensoriales de los vinos (Tofalo y col., 2014). A día de hoy, las levaduras de los géneros no-*Saccharomyces* se están convirtiendo en una alternativa muy interesante para llevar a cabo la fermentación alcohólica del mostos de uva, debido a que han demostrado una influencia positiva en el aroma y sabor de los vinos (Cordero-Bueso y col., 2013; Domizio y col., 2009; Renault y col., 2009; Romano y col., 2003; Suarez-Lepe y Morata, 2012). Especies como *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hansenula anomala* y *Candida spp.*, son utilizadas en asociación con especies del género *Saccharomyces* para la producción de diferentes tipos de vino, mejorando de forma sustancial las propiedades químico-sensoriales de los mismos (Andorrá y col., 2012; Anfang y col., 2009).

Estas levaduras se utilizan a concentraciones iniciales de un millón de células por mililitro cada una y se inoculan como co-cultivos de manera simultánea o secuencial (Lafon-Lafourcade, 1983). El primer método, consiste en introducir en el tanque de fermentación las levaduras de los géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* al mismo tiempo (Sadoudi y col., 2012), mientras que si se hace de forma secuencial, primeramente se añaden las levaduras de los géneros no-*Saccharomyces* y a los tres o cuatro días las del género *Saccharomyces* (Sun y col., 2014). Estas

---

---

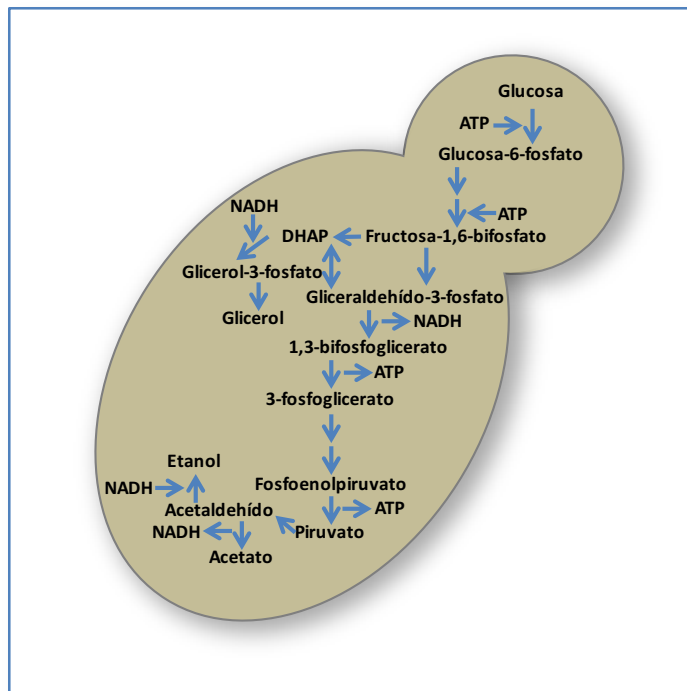
inoculaciones pueden ser directas, rehidratando la levadura seca activa en agua, o usando un *pie de cuba*, que consiste en el empleo de mosto de uva en fermentación para rehidratar las levaduras comerciales. Esto permite una adaptación previa de las levaduras a las condiciones del mosto, lo que garantiza un inicio rápido y eficaz del proceso cuando las levaduras son añadidas al mosto en el depósito de fermentación (Fleet y Heard, 1993b).

Como contrapartida a la adición de levaduras comerciales seleccionadas al mosto de uva, está surgiendo una creciente demanda de vinos naturales y ecológicos como los que se han estudiado en el presente trabajo. Estos vinos se caracterizan por utilizar uva procedente de cultivos ecológicos, es decir, sin la aplicación de productos químicos en la vid, y por el uso de la microbiota indígena, vinculando de esta manera las levaduras indígenas al denominado “*terroir*” de los vinos (Bokulich y col., 2014; Clemente-Jimenez y col., 2004; Gilbert y col., 2014; Mingorance-Cazorla y col., 2003; Pretorius, 2000). Si se tiene en cuenta que son los consumidores los que dirigen el mercado, tiene sentido que a día de hoy se estén llevando a cabo numerosos estudios para la identificación de levaduras indígenas, vinculando a éstas con el “*terroir*” de diferentes regiones de países con tradición vitivinícola como Australia (Antalick, Suklje, y col., 2015), Chile (Pavez y col., 2015), Suiza (Versari y col., 2015) o Italia (Garofalo y col., 2015). Estos y otros estudios han demostrado como algunas de estas levaduras mejoran el perfil organoléptico y la calidad de los vinos (Bagheri y col., 2015; Combina y col., 2005; Knight y col., 2015), lo que justifica la realización de estudios como el que se recoge en este trabajo, centrado en la identificación y el análisis de las características enológicas de levaduras indígenas de la D.O. Ribera del Duero.

### **1.3.3.2. Bioquímica de la fermentación alcohólica**

El principal proceso metabólico que tiene lugar durante la producción de vino es la fermentación alcohólica. Es un proceso catabólico que tiene lugar en el citoplasma de las levaduras y que consiste en la transformación de los

azúcares (hexosas) presentes en el mosto, en etanol y dióxido de carbono (Figura 3). Las primeras reacciones que tienen lugar durante la fermentación alcohólica se conocen como glicólisis, una serie de 10 reacciones divididas en una fase dependiente de energía (ATP) en la que la glucosa se transforma en fructosa-1,6-bifosfato y una segunda fase productora de energía, en la que participan dos compuestos con una alta capacidad de transferir fosfatos: 1,3-bifosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato. Ambos compuestos intervienen en la generación de ATP, el cual será utilizado por la levadura para su crecimiento. Tras la glicólisis, en la fermentación alcohólica se terminan reoxidando dos moléculas de NADH a  $\text{NAD}^+$ , garantizando así la continuidad de la glicólisis. En la primera de estas reacciones, el piruvato resultante de la producción de ATP durante la glicólisis es descarboxilado a acetaldehído, el cual, finalmente, será reducido a etanol gracias a la alcohol deshidrogenasa.



**Figura 3. Representación esquemática de la transformación de glucosa en etanol durante la fermentación alcohólica.** (Norbeck y Blomberg, 1997)

---

---

Como producto de la glicólisis también se generan una serie de metabolitos que son utilizados por la levadura para la generación de biomasa. Por ejemplo, la glucosas-6-fosfato puede ser redirigida directamente a la ruta de las pentosas fosfato, donde se generará NADPH y ribosa fosfato, ambos necesarios para la síntesis de ácidos grasos y nucleótidos respectivamente (Mathews y col., 2002).

Al mismo tiempo que la fermentación alcohólica también tiene lugar el metabolismo de los compuestos nitrogenados presentes en el mosto (aminoácidos, amoniaco, urea o derivados de prolina), los cuales son asimilados, en su mayoría, por un sistema simporte de protones (Cooper, 1982). El proceso de asimilación de compuestos nitrogenados se desarrolla durante las primeras horas de la fermentación (Monteiro y Bisson, 1991) y los compuestos que adquiere la levadura son degradados en función de sus necesidades (Cooper, 1982). El metabolismo de estos compuestos es fundamental para la síntesis de productos vinculados con las propiedades sensoriales del vino, como es el caso de los ésteres.

## **I.4. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS**

### **I.4.1. Técnicas de identificación no moleculares**

En el pasado, la caracterización de las levaduras estaba basada en criterios fisiológicos, como el color y la forma de las colonias, y bioquímicos, como el consumo y la fermentación de azúcares o la asimilación de compuestos nitrogenados (Barnett y col., 1990; Kreger-venrij, 1984). Estas metodologías tienen ciertas limitaciones, ya que los resultados pueden variar en función de las condiciones metodológicas empleadas, como son el medio de cultivo o la temperatura (Scheda y Yarrow, 1966, 1968). Sin embargo, han sido determinantes para que los enólogos hayan podido diferenciar especies como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, entre otras (Kurtzman y Phaff, 1987; Price y col., 1978).

Otras técnicas más actuales se basan en el análisis del contenido total de proteínas celulares (Van Vuuren y Van Der Meer, 1987; Vancanneyt y col., 1991), el estudio de perfiles de isoenzimas (Duarte y col., 1999) o el análisis de ácidos por cromatografía de gases (Cottrell y col., 1986; Silva y col., 1994; Tredoux y col., 1987).

#### **I.4.2. Técnicas moleculares para la identificación de especies**

Las técnicas moleculares más eficientes para la caracterización interespecífica de levaduras vínicas se fundamentan en el uso de métodos moleculares como: el análisis del ADN ribosomal (secuenciación y restricción), la amplificación mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) de locus genómicos específicos y el análisis de fragmentos de ADN amplificados por PCR mediante electroforesis desnaturizante en gradiente o DGGE (Perez-Torrado y col., 2015):

- ADN ribosomal: la caracterización de levaduras en base al estudio de los genes que codifican para los ARN de las subunidades ribosómicas (5.8S, 18S y 26S) se sustenta en el análisis de los patrones de restricción del producto amplificado mediante PCR de las regiones ITS (regiones transcritas internas), ETS (regiones transcritas externas) o NTS (espaciadores no transcritos) y en la comparación de la secuencia de nucleótidos de la región D1/D2 del ARN ribosómico 26S. Esta metodología ha sido ampliamente empleada para la identificación de levaduras (Combina y col., 2005; Lopandic y col., 2008; Sun y Liu, 2014), además de estudios sobre la ecología de fermentaciones naturales (Romancino y col., 2008) y estudios de dinámicas de población (Tofalo y col., 2009; Zott y col., 2008), entre otras aplicaciones.
- Amplificación por PCR y Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturizante (PCR-DGGE): es una técnica de diseño reciente (Muyzer y col., 1993) que se fundamenta en la separación de

---

---

cadena sencilla de ADN, correspondientes en la mayoría de los casos a genes que codifican la subunidad 18S del ARN ribosómico, en geles de acrilamida en gradiente y desnaturalizantes en base a las diferencias de su secuencia. Se ha aplicado para la detección de levaduras vínicas (Cocolin y col., 2000), ya que permite la identificación de especies perjudiciales para el vino como *Brettanomyces bruxellensis* (Renouf y col., 2007). También ha sido utilizada como técnica para la identificación de especies de los géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* presentes en muestras de mosto (Andorrá y col., 2008; Stringini y col., 2009).

- **Q-PCR:** la rapidez de esta técnica, su poder cuantitativo y su especificidad y sensibilidad, la han convertido en una herramienta muy apreciada desde que fue diseñada en 1993 (Wilhelm y Pingoud, 2003). A pesar de ello, la necesidad de diseñar sondas y cebadores altamente específicos y exclusivos, se convierte en una limitación para su aplicación. No obstante, existen cebadores específicos para la amplificación de las regiones ITS (James y col., 1996), las regiones D1/D2 (Kurtzman y Robnett, 1998) y algunos genes del ADN mitocondrial de levaduras (Belloch y col., 2000; Kurtzman y Robnett, 2003) que permiten detectar y cuantificar las levaduras presentes en el mosto de uva, como hicieron Hierro y colaboradores monitorizando las poblaciones de *S. cerevisiae* y *H. uvarum* en mostos fermentados (Hierro y col., 2007).

### **I.4.3. Identificación de cepas**

La diferenciación entre cepas de una misma especie se fundamenta en la detección de variaciones en el ADN genómico o en el ADN mitocondrial por medio del uso de técnicas de hibridación, de la amplificación de secuencias mediante PCR o de la comparación de patrones de restricción:

- Restricción del ADN mitocondrial: el uso de las enzimas de restricción *HinfI* y *HaeIII* para la digestión del ADN mitocondrial, hace posible la obtención de fragmentos de ADN que permiten establecer patrones diferenciales entre cepas de una misma especie (Guillamon y col., 1994).
- Técnicas de hibridación: la hibridación permite detectar variaciones en regiones del genoma que dan lugar a nuevos sitios de restricción, o que eliminan los existentes, y a alteraciones en genes completos de los cromosomas. Esta técnica ha sido aplicada, por ejemplo, en la industria de las levaduras vínicas como control de calidad en la producción de *S. cerevisiae* (Lavalliée y col., 1994).
- Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE): gracias a la movilidad de las muestras en dos direcciones, los geles de electroforesis de campo pulsado son utilizados para la separación de grandes fragmentos de ADN o para la obtención del cariotipo de las levaduras. Esta técnica se ha utilizado para la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* (Casaregola y col., 1998; Keogh y col., 1998).
- Métodos basados en la amplificación por PCR: los métodos basados en la amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son muy útiles debido a su rapidez y eficacia a la hora de discriminar cepas y especies (Perez-Torrado y col., 2015):
  - a) *El análisis de microsátélites y minisátélites* (secuencias repetidas en el genoma) por PCR, fue aplicada por primera vez al estudio de levaduras vínicas por Gallego y col. (1998), momento desde el cual este análisis se ha convertido en una herramienta muy utilizada para la caracterización de cepas

---

---

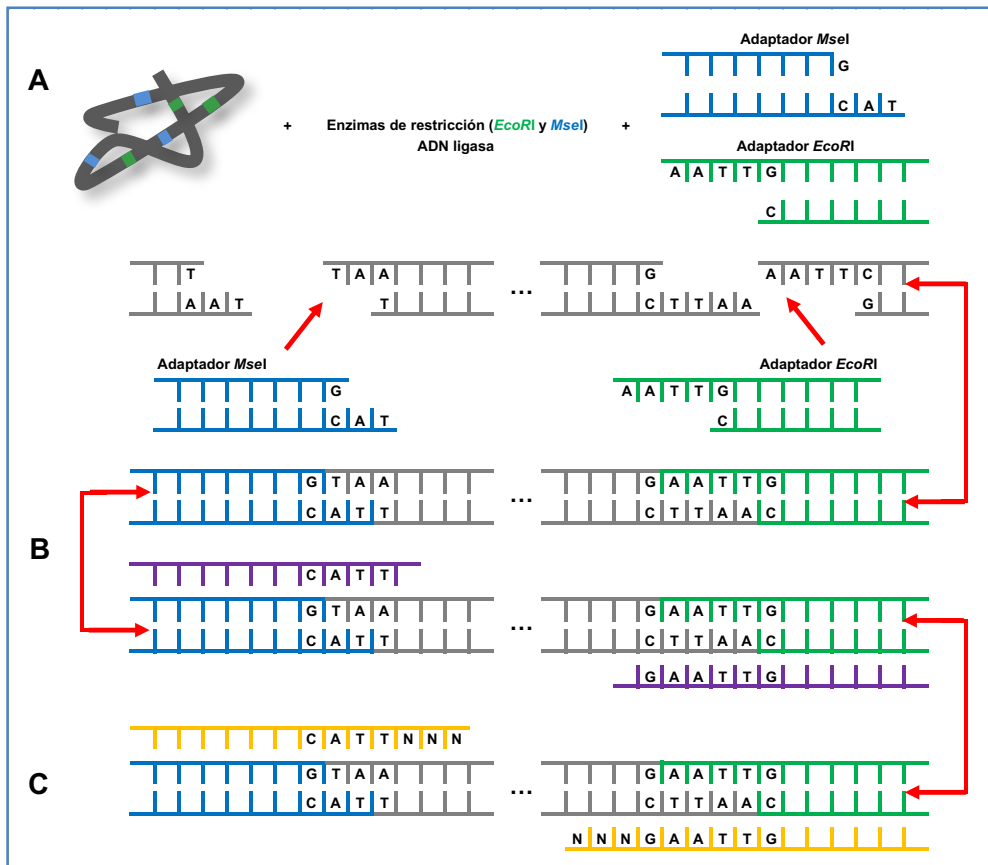
comerciales de levaduras vínicas (Howell y col., 2004; Schuller y col., 2004).

- b) *La amplificación polimórfica aleatoria del ADN (RAPD)* se fundamenta en el uso de cebadores de secuencia corta y no requiere de un conocimiento previo del genoma, lo que ha propiciado su uso en la caracterización taxonómica de levaduras (Lopez y col., 2003; Molnar y col., 1995), pese a ser una técnica con escasa reproducibilidad.
- c) El estudio de los *polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)* ha sido valorado como una técnica muy útil para la identificación de variedades, cepas y estirpes de plantas, así como para la caracterización de cepas de levaduras vínicas (de Barros Lopes y col., 1999), habiendo sido empleada en varios trabajos (Azumi y Goto-Yamamoto, 2001; Flores Berrios y col., 2005; Lopandic y col., 2008).
- d) *La amplificación de las secuencias  $\delta$  que flanquean ciertos retrotrasposones de la levadura*, ha demostrado su utilidad en la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar y col., 2001; Pramateftaki y col., 2000).

#### **I.4.4. Huella molecular mediante AFLP**

Algunas de las ventajas que tiene el uso de marcadores AFLP frente a otros marcadores moleculares son la no necesidad de un conocimiento previo del genoma debido al uso de adaptadores de secuencia conocida y una alta sensibilidad, similar a la de los microsatélites, para resolver diferencias intraespecíficas, lo que permite una diferenciación precisa de cepas de una misma especie (Curtin y col., 2007). Además, el marcaje de los alelos AFLP con diferentes fluoróforos permite que se puedan analizar

mediante electroforesis capilar, lo que a su vez hace viable el análisis simultáneo de varias muestras. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones para su implementación en la industria, como son la necesidad de complejos programas bioinformáticos y una cierta habilidad para llevar a cabo los análisis (Esteve-Zarzoso y col., 2010). A pesar de esto, como se demuestra a lo largo de este estudio, una vez puesto a punto el método es posible obtener de forma rápida una información precisa que permite la identificación y diferenciación eficaz de especies y cepas de levadura.



**Figura 4. Representación esquemática de la metodología AFLP.** A: digestión del ADN genómico de levadura y ligación de los adaptadores; B: amplificación preselectiva; C: amplificación selectiva.

El procedimiento de obtención de los AFLP se desarrolla en tres pasos (Figura 4). En el primero de ellos el ADN genómico purificado de levadura,

---

---

es sometido a digestión con dos enzimas de restricción, una que corta frecuentemente (*MseI*) y otra que corta menos frecuentemente (*EcoRI*). Los fragmentos generados son ligados a adaptadores de secuencia conocida por los extremos producidos por las enzimas, proceso que puede suceder de forma conjunta a la digestión (Figura 4A). El segundo paso se conoce como PCR preselectiva, proceso mediante el cual los cebadores seleccionados para la amplificación hibridan con los adaptadores y el sitio incompleto de reconocimiento de las enzimas, siendo el resultado, un aumento en el número de los fragmentos generados durante la digestión/ligación (Figura 4B). El tercer paso consiste en otra amplificación por PCR, pero en este caso el paso es selectivo, ya que los cebadores utilizados tienen la misma secuencia que los cebadores preselectivos con 1, 2 ó 3 nucleótidos adicionales en el extremo 3', lo que resulta en la amplificación de un subconjunto específico de los fragmentos generados tras la digestión (Figura 4C). El análisis de los fragmentos amplificados selectivamente se hace mediante electroforesis en gel o capilar, de este modo se pueden comparar los alelos específicos de las especies o cepas de levadura analizadas con cada uno de los pares de cebadores utilizados.

## **I.5. EL AROMA EN EL VINO**

El aroma del vino, junto al sabor y el color, es una de sus propiedades organolépticas más importantes y depende del contenido de una gran variedad de compuestos volátiles (Palomo y col., 2007). Se han identificado más de 800 de estos compuestos implicados en el aroma del vino, entre los que se incluyen alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, fenoles, tioles, monoterpenos y norisoprenoides (Etievant, 1991; Reboredo-Rodríguez y col., 2015; Selli y col., 2004). Debe tenerse en cuenta que no todos los compuestos volátiles vinculados al aroma del vino contribuyen a éste de igual forma, de hecho, la contribución aromática está relacionada con el umbral de percepción, que se define como la mínima concentración para poder detectar el aroma por el olfato o el gusto.

### **I.5.1. Clasificación aromática**

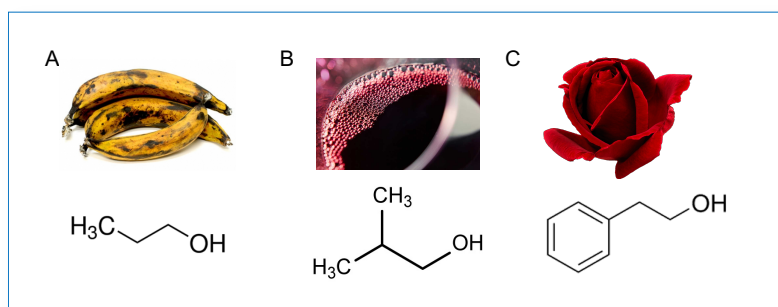
Dependiendo de su origen, el aroma del vino se subdivide en 3 componentes: varietal o primario, fermentativo o secundario y derivados del envejecimiento o terciarios (Antalick, Tempere, y col., 2015; Rapp, 1998; Schreier y Jennings, 1979). El componente varietal deriva de compuestos de la uva y aporta aromas específicos dependiendo de las características de la vid y de la variedad de uva (Bauer y Pretorius, 2000; Riberau y col., 2000). Dentro de los vinos de una categoría elaborados bajo procesos enológicos similares, se considera que los aromas varietales contribuyen a la tipicidad (Guillaumie y col., 2013). Algunos autores han relacionado la percepción de aromas frutales en vinos tintos con la presencia de C13-norisoprenoides y furanonas derivados de las uvas (Kotseridis y col., 2000; Pineau y col., 2007). Sin embargo, muchos de los compuestos vinculados con el aroma afrutado, incluyendo en particular a los ésteres, son producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Estos y otros compuestos volátiles, como los acetatos, los alcoholes superiores o los compuestos sulfurosos (Figura 5), resultantes del metabolismo de los microorganismos durante la fermentación alcohólica (levaduras) o la fermentación maloláctica (bacterias lácticas), son los que definen el aroma secundario o fermentativo del vino (Azzolini y col., 2015; Genoves y col., 2003; Gerbaux y col., 2002; Lambrechts y Pretorius, 2000).

El aroma terciario también se conoce como *bouquet* y está directamente relacionado con la maduración del vino. Durante este proceso una serie de reacciones enzimáticas y/o físico-químicas tienen lugar en el vino, alterando completamente el producto inicial. En función de donde tiene lugar el proceso de maduración o envejecimiento del vino, se puede hablar de un bouquet de oxidación, si tiene lugar en una bodega de madera, o de un bouquet de reducción, si tiene lugar en el interior de la botella (Perez-Prieto y col., 2003; Pozo-Bayón y col., 2003).



2006; Vilanova y Martínez, 2007). En concreto, la presencia de 2-feniletanol en vinos tintos resulta muy apreciada debido a su contribución al aroma floral (pétalos de rosa), al mismo tiempo que aporta notas de miel (Mendes y col., 2012). En la Figura 6 se muestran tres descriptores aromáticos de los alcoholes superiores estudiados en la presente tesis y que pueden percibirse en vinos tintos de calidad.

Hay estudios que demuestran que la producción de estos alcoholes superiores apenas se ve influenciada por la presencia de especies no-*Saccharomyces* como *H. uvarum* y *K. apiculata* en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*, frente a los valores obtenidos con cultivos puros de *S. cerevisiae* (Gil y col., 1996). Sin embargo, otros estudios han demostrado que especies no-*Saccharomyces* como *T. delbrueckii*, resultan fundamentales en la producción de alcoholes como el 3-etoxi-1-propanol y el 2-feniletanol (Herraiz y col., 1990; Longo y col., 1992).

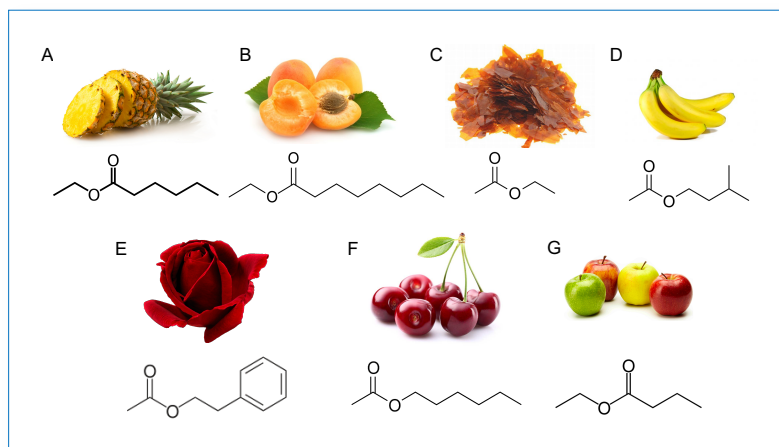


**Figura 6. Representación visual de los descriptores aromáticos de tres alcoholes. A:** 1-propanol (fruta madura); **B:** isobutanol (desagradable aroma a vino); **C:** 2-feniletanol(rosa).

### I.5.2.2. Acetatos y ésteres

En la literatura, los vinos tintos se describen con aromas afrutados, generalmente de frutos rojos o negros y son tratados como grupos independientes debido a la abundancia e importancia de los acetatos en el aroma del vino. Son muchos los autores que han intentado caracterizar este conjunto de aromas tan específicos sin dar con la molécula clave (Ferreira

y col., 2004; Kotseridis y Baumes, 2000; Moio y col., 1995). Fueron Pineau y colaboradores quienes demostraron que el carácter típico afrutado de los vinos tintos depende en gran medida de una serie de ésteres de etilo y acetatos, los cuales, aunque estén por debajo de su umbral de percepción, influyen en el perfil afrutado del vino (Pineau y col., 2009). El aporte de los ésteres y acetatos al aroma del vino ha sido ampliamente estudiado, habiendo determinado que por su aporte al perfil aromático algunos de los ésteres más importantes son el succinato de dietilo (afrutado/floral), el lactato de etilo (mantecoso) o el malato de dietilo (afrutado/herbáceo), mientras que entre los acetatos destacaban el acetato de etilo (afrutado/barniz), el acetato de isoamilo (plátano) y el acetato de hexilo (cereza/pera) (Atanasova y col., 2005; Atanasova y col., 2004; Lytra y col., 2014; Segurel y col., 2004). En lo referente a los ésteres y acetatos cuantificados en este estudio, en la Figura 7 se recogen los precursores aromáticos y las estructuras químicas de algunos de los analizados en este trabajo.



**Figura 7. Representación visual de nueve de los descriptores aromáticos de los ésteres y acetatos más habituales en los vinos tintos. A:** hexanoato de etilo (piña); **B:** octanoato de etilo (albaricoque); **C:** acetato de etilo (barniz); **D:** acetato de isoamilo (plátano); **E:** acetato de 2-feniletilo (rosa); **F:** acetato de hexilo (cereza); **G:** valerato de etilo (manzana).

En los vinos tintos el acetato de etilo destaca por encima de los demás, ya que suele encontrarse en concentraciones entre los 50 y los 100 mg/L. Sin embargo, pese a que influye de forma positiva en el perfil aromático de los vinos, cuando su concentración es superior a los 150 mg/L, aparecen unas desagradables notas a pegamento o barniz en el vino (Barth y col., 1994). Las levaduras apiculadas, como *Kloeckera apiculata*, han sido descritas como sobresalientes productoras de acetato de etilo, lo que supone que su presencia durante la fermentación se asocie a la producción de vinos de baja calidad (Schuller y Casal, 2005). Otra de las especies vinculada con una producción destacable de acetato de etilo es *Picchia anomala* (Plata y col., 2003). Si bien, también se ha demostrado que *Picchia anomala* influye positivamente en el perfil aromático del vino al producir grandes cantidades de acetato de isoamilo (Rojas y col., 2001), que en combinación con el acetato de 2-feniletanolida lugar a una remarcable percepción de notas florales (Peřka y col., 2006).

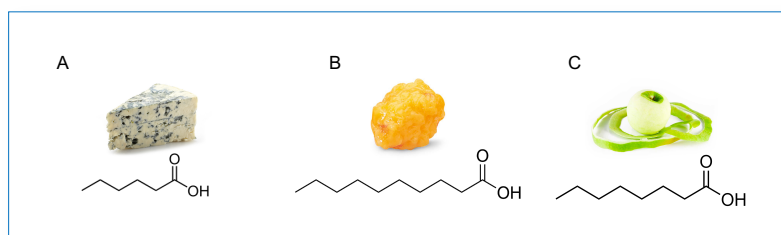
El empleo de co-cultivos de *H. guillermondi* o *P. anomala* junto a *S. cerevisiae* con respecto al uso de cultivos puros de *S. cerevisiae*, ha resultado en un aumento de la concentración de los ésteres de acetato en el vino (Rojas y col., 2003; Viana y col., 2008). También se ha descrito una mayor producción de propionato de etilo y isobutanoato de etilo, en fermentaciones llevadas a cabo con co-cultivos de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en comparación a las desarrolladas empleando únicamente *S. cerevisiae*. Esto permitió a los autores afirmar que cuanto mayor es la concentración de *T. delbrueckii* en el mosto, mayor es la concentración de dichos compuestos en el vino, lo que supone una mayor percepción de notas frutales, efecto muy deseado en vinos de calidad (Renault y col., 2015).

### **I.5.2.3. Ácidos**

Los ácidos se vinculan aromáticamente a términos como “rancio” y “desagradable” (Escudero y col., 2004), pero no puede atribuírseles

únicamente esta característica, puesto que se ha demostrado su influencia positiva en la percepción de matices afrutados en vinos (Ferreira y San Juan, 2011; Romano y col., 2009). Algunos son el ácido nonanoico, el *ácido octanoico* y el *ácido decanoico* (Molina y col., 2007). La Figura 8 incluye algunos de los que se han cuantificado en este estudio.

En varios estudios se ha demostrado que el uso de ciertas cepas de especies como *T. delbrueckii* (Bely y col., 2008; Comitini y col., 2011) y *M. pulcherrima* (Lopes y col., 2007; Sadineni y col., 2012) resultan en una reducción de la acidez total de los vinos. Mientras que al emplear cepas de especies crio-tolerantes, como *Saccharomyces uvarum*, lo que se ha registrado es un aumentando de la acidez en el producto final (Masneuf-Pomarède y col., 2010).



**Figura 8. Representación de los descriptores aromáticos y su estructura química de tres de los ácidos volátiles más habituales en vinos tintos. A: ácido hexanoico (queso); B: ácido decanoico (grasa); C: ácido octanoico (fruta ácida).**

### 1.5.3. Análisis de la fracción volátil

A raíz del interés mostrado en la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles implicados en el aroma de los alimentos, muy concretamente en el vino, se han desarrollado o aplicado una gran variedad de metodologías y técnicas fundamentadas en las propiedades físico-químicas de estos compuestos (solubilidad, volatilidad, etc.). Los compuestos volátiles presentes en el vino se clasifican en función de su abundancia como mayoritarios, con concentraciones mínimas comprendidas entre 0,5 y 5 mg/L

(etanol o acetato de etilo) o como minoritarios, categoría en la que se encuentran la gran mayoría de compuestos volátiles de los vinos con concentraciones que oscilan entre 0,1 µg/L y 0,1 mg/L (Gassiot y col., 1983; Noble, 1982). Mientras que para el análisis de los primeros no hace falta una pre-concentración, los minoritarios requieren de un tratamiento previo de aislamiento y concentración que permita su detección posterior.

Algunas de las técnicas aplicadas en la obtención de los compuestos volátiles del vino son la extracción con un disolvente orgánico (Moio y col., 1995), la destilación de muestras de vino (Likens y Nickerson, 1964), la extracción en fase sólida o SPE (Arrhenius y col., 1996), la microextracción en fase sólida o SPME (Lord y Pawliszyn, 2000), el análisis del espacio en cabeza o la extracción con un soporte de agitación magnética o SBSE (Liu y col., 2004).

Debido a su sencillez, su bajo coste, la ausencia de disolventes y la facilidad para acoplarse a un cromatógrafo de gases, la metodología más extendida para llevar a cabo el análisis de los compuestos volátiles del vino es la microextracción en fase sólida asociada al análisis del espacio en cabeza o HS (Gachot y col., 2010; Jeleń y Szczurek, 2010; Noguerol-Pato y col., 2009; Sagratini y col., 2012; Weldegergis y col., 2011). Este método consiste en la absorción, o adsorción, de los compuestos que forman la fracción volátil del vino en una fibra de sílica recubierta por una fase polimérica, hasta que se alcanza el equilibrio (Kataoka y col., 2000). El éxito de la técnica de microextracción en fase sólida radica en la elección de la fibra adecuada, ya que el revestimiento de la fibra puede ser más o menos polar y en función de esto se podrán extraer unos compuestos u otros (Pawliszyn y col., 2012). La asociación de la HS-SPME a un cromatógrafo de gases acoplado a un detector masas (MS) o a un detector de ionización de llama (FID), suele ser el método de análisis más utilizado para muestras líquidas como el vino (Heaven y Nash, 2012).

---

---

La cromatografía de gases (GC) fue introducida en 1960 y rápidamente se convirtió en la herramienta óptima para este tipo de análisis (Bayonove y Cordoni, 1971; Riberau-Gayon y Glories, 1971). El proceso se fundamenta en hacer pasar a través de una columna cromatográfica la muestra volatilizada haciendo uso de un gas portador inerte. En el interior de dicha columna los compuestos quedarán retenidos en función de sus propiedades físico-químicas e irán eluyendo a distintos tiempos (tiempo de retención), para ser posteriormente registrados por el detector en base a su conductividad eléctrica. El resultado es un cromatograma en el cual cada uno de los picos corresponde a un compuesto volátil y cuya altura y área determinan la abundancia.

En la actualidad, son muchas las bodegas que producen vinos de autor con el objetivo de diferenciarse del resto con un producto exclusivo y único. Estos vinos, se producen siguiendo procesos vitivinícolas más naturales y clásicos en los que se incluye la utilización de las levaduras ecotípicas de la bodega y la defensa de su “*terroir*”. En el presente trabajo, en colaboración con dos bodegas de la D.O. Ribera del Duero, se ha llevado a cabo una caracterización de levaduras indígenas recogidas de muestras de uva y mosto de la variedad *Tempranillo*, con el objeto de estudiar la implicación de las especies no-*Saccharomyces* en la producción de compuestos volátiles vinculados con el aroma del vino durante la fermentación alcohólica y determinar así su influencia en el “*terroir*” de los vinos de estas bodegas.







## II

# Objetivos



### II.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es caracterizar levaduras indígenas no-*Saccharomyces* y determinar su potencial enológico en cuanto al aporte de compuestos volátiles, resultantes de su metabolismo, al vino.

### II.2. OBJETIVOS PARCIALES

- **Objetivo 1.** Identificar y caracterizar mediante técnicas moleculares las especies y cepas de levadura aisladas de muestras de uva y mosto durante las vendimias de 2010, 2011 y 2012 de las bodegas *Áster* y *Díaz Bayo* (D.O. Ribera del Duero).
- **Objetivo 2.** Generar una base de datos de alelos AFLP específicos de especies y cepas de levaduras vínicas, que sirva como base para la comparación e identificación de otras levaduras.
- **Objetivo 3.** Aplicar el método de AFLP en muestras complejas de mosto de uva o vino, con el fin de identificar las levaduras presentes en la muestra sin la necesidad de utilizar cultivos microbiológicos.
- **Objetivo 4.** Estudiar el potencial enológico de las levaduras indígenas aisladas, especialmente las de tipo no-*Saccharomyces*, en base al aporte de compuestos volátiles que determinan los aromas secundarios del vino.









III

**Materiales y**

**Métodos**



### III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### III.1.1. Levaduras

La mayoría de las cepas de levadura utilizadas en este trabajo fueron aisladas en el laboratorio a partir de muestras de uva y mosto. Además de éstas, se han utilizado algunas levaduras comerciales y levaduras tipo como control en la caracterización mediante marcadores AFLP (Tabla 1).

**Tabla 1. Cepas de levaduras comerciales y de levaduras tipo.**

| Levaduras                           | Cepa                 | Proveedor                                  |
|-------------------------------------|----------------------|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | ES42                 | Enartis                                    |
| <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> | CH K1 421 CHR-HANSEN | Concerto                                   |
| <i>Dekkera bruxillensis</i>         | CECT12005            |  |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>         | CECT12946            |  |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>    | CECT12825            |  |
| <i>Picchia anomala</i>              | CECT12765            |  |
| <i>Picchia membranifaciens</i>      | CECT1115             | Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) |
| <i>Saccharomyces uvarum</i>         | CECT12641            |  |
| <i>Torulaspota delbrueckii</i>      | CECT12698            |  |
| <i>Zygosaccharomyces bailli</i>     | CECT11042            |  |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>     | CECT11121            |  |

#### III.1.2. Enzimas

Las enzimas empleadas para la purificación y manipulación de ácidos nucleicos se muestran en la Tabla 2, indicando sus proveedores y la aplicación a la que se han destinado.

**Tabla 2. Enzimas empleadas en al manipulación de ácidos nucleicos.**

| Enzimas            | Proveedor           | Aplicación                        |
|--------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Taq ADN polimerasa | Biotools            | Amplificación ADN (ITS;AFLP)      |
| Pfu polimerasa     |                     | Amplificación ADN (Secuenciación) |
| ARNasa             | Roche               | Eliminación de ARN                |
| Proteinasa K       |                     | Degradación de proteínas          |
| <i>Hha</i> I       | Takara              | Digestión ADN (ITS)               |
| <i>Hae</i> III     |                     |                                   |
| <i>Hinf</i> I      |                     |                                   |
| ADN ligasa         | New England Biolabs | Ligación (AFLP)                   |
| <i>EcoR</i> I      |                     | Digestión ADN (AFLP)              |
| <i>Mse</i> I       |                     |                                   |

## III.2. MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO

### III.2.1. Reactivos

Las sales inorgánicas, polímeros, disolventes orgánicos y otros compuestos que se han utilizado en el presente estudio se muestran en la Tabla 3, indicando el distribuidor y el proceso en el que han sido utilizados.

**Tabla 3. Reactivos necesarios para la caracterización de los aislados de levadura.**

| Reactivos            | Calidad       | N° CAS    | Distribuidor  | Uso                          |
|----------------------|---------------|-----------|---------------|------------------------------|
| Glicerol             | ≥99,5 %       | 56-81-5   | Sigma-Aldrich | Crioconservación             |
| Acetato de potasio   | 99,00 %       | 127-08-2  |               |                              |
| Acetato de sodio     | 99,00 %       | 127-09-3  |               |                              |
| Alcohol isoamílico   | 98,00 %       | 123-51-3  |               |                              |
| Cloroformo           | 99,0 - 99,4 % | 67-66-3   |               |                              |
| Na <sub>2</sub> EDTA | 99,00 %       | 60-00-4   | Panreac       | Purificación ADN             |
| Etanol               | 99,50 %       | 64-17-5   |               |                              |
| Fenol                | 99,50 %       | 108-95-2  |               |                              |
| Sorbitol             | 99,00 %       | 50-70-4   |               |                              |
| Tris-HCl             | 99,00 %       | 1185-53-1 |               |                              |
| NaCl                 | 99,5 %        | 7647-14-5 |               | Caracterización de levaduras |
| MgCl <sub>2</sub>    | 99,00 %       | 7786-30-3 | Biotools      | Amplificación por PCR        |
| dNTPs                | -             | 1927-31-7 |               |                              |
| Agarosa              | -             | 9020-36-6 | BioRad        | Geles electroforesis         |
| Bromuro de etidio    | 0,1-1,0 %     | 1239-45-8 |               |                              |

Otros compuestos empleados en la caracterización de las levaduras fueron: *Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide* de Thermo Scientific y *GeneScan<sup>TM</sup> 500ROX* de Applied Biosystems, como control interno de la electroforesis capilar.

### III.2.2. Medios de cultivo

Para el aislamiento y crecimiento de levaduras se utilizaron 3 medios de cultivo:

- YPD: peptona al 2%, extracto de levadura al 1%, dextrosa al 2%, agar bacteriológico al 1,5% para preparar medio sólido en

placas. Todos los reactivos fueron suministrados por laboratorios Conda.

- Agar lisina: agar lisina al 6,6%, lactato potásico SR0037 al 1 %, ácido láctico al 0,01%. Estos reactivos los suministró la casa Oxoid.
- Agar mosto: mosto de uva a 19,5 grados Brix (concentración de azúcar), obtenido a partir de mosto de uva concentrado de la variedad *Tempranillo* a 65 grados Brix abastecido por Mostos Españoles S. A., agar bacteriológico al 1,5%.

Los medios se suplementaron con ampicilina a 100  $\mu\text{g/mL}$  cuando fue necesario con el fin de evitar el crecimiento de bacterias. Ésta fue proporcionada por de Sigma Aldrich.

### III.2.3. Tampones y soluciones

Los métodos de purificación de ADN, caracterización molecular de las levaduras y análisis químico de la fracción volátil de los mostos fermentados, han sido llevados a cabo con los tampones y soluciones que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Composición de los tampones y soluciones empleados en este estudio.**

| Tampones/Soluciones         | Composición   | Métodos          |
|-----------------------------|---|------------------|
| Tampón extracción ADN I     | Sorbitol 1 M, Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,4) 0,1M                      |                  |
| Tampón extracción ADN II    | Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM, Na <sub>2</sub> EDTA 20mM                    | Purificación ADN |
| Tampón TE                   | 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5                                     |                  |
| Fenol:Cloroformo:Isoamílico | 25:24:01  |                  |
| Tampón TBE 1x               | 44,5 mM Tris borato, 1 mM EDTA, pH 8                                  | Electroforesis   |
| Tampón de carga ADN 10x     | TBE 10x, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xilencianol FF 0,25% |                  |
| Tampón tartarato            | 4 g/L de ácido tartárico, 10% v/v de etanol, pH 3                     | Análisis químico |
| Tampón citrato              | 0,5 g/L de ácido cítrico, pH 3, saturado con NaCl                     |                  |

### III.2.4. Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la caracterización interespecífica de levaduras mediante análisis ITS-RFLP del gen del ARN ribosómico 5.8S (ITS-1 e ITS-4) y secuenciación de la región D1/D2 del ADN ribosómico 26S (NL-1 y NL-4) se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la caracterización interespecífica de levaduras.**

| Nombre | Secuencia                | Diseñados por                |
|--------|--------------------------|------------------------------|
| ITS-1  | TCCGTAGGTGAACCTGCGG      | White et al. (1990)          |
| ITS-4  | TCCTCCGCTTATTGATATGC     |                              |
| NL-1   | GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG | Peterson and Kurtzman (1991) |
| NL-4   | GGTCCGTGTTCAAGACGG       |                              |

En la Tabla 6 se exponen la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la caracterización intraespecífica de las levaduras indígenas mediante AFLP.

**Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para obtener los AFLP de las levaduras.** Los fluoróforos empleados fueron HEX: M, N, J y Q, y FAM: H, G y S.

|   | Nombre        | Secuencia                              |
|---|---------------|--|
|   | EcoRI-1p      | CTCGTAGACTGCGTACC                      |
|   | EcoRI-2p      | AATTGGTACGCAGTCTAC                     |
|   | MseI-0        | GATGAGTCCTGAGTAA                       |
|   | MseI-A1       | GACGATGAGTCCTGAG                       |
|   | MseI-A2       | TACTCAGGACTCAT                         |
| M | EcoRI-TA-HEX  | <b>HEX</b> -GACTGCGTACCAATTCTA         |
|   | MseI-CG       | GATGAGTCCTGAGTAAC <b>G</b>             |
| N | EcoRI-TA-HEX  | <b>HEX</b> -GACTGCGTACCAATTCTA         |
|   | MseI-CA       | GATGAGTCCTGAGTAACA                     |
| J | EcoRI-TA-HEX  | <b>HEX</b> -GACTGCGTACCAATTCTA         |
|   | MseI-CT       | GATGAGTCCTGAGTAAC <b>T</b>             |
| Q | EcoRI-TA-HEX  | <b>FAM</b> -GACTGCGTACCAATTCTA         |
|   | MseI-CC       | GATGAGTCCTGAGTAAC <b>C</b>             |
| H | EcoRI-AC-FAM  | <b>FAM</b> -GACTGCGTACCAATTC <b>AC</b> |
|   | MseI-CC       | GATGAGTCCTGAGTAAC <b>C</b>             |
| G | EcoRI-AC-FAM  | <b>FAM</b> -GACTGCGTACCAATTC <b>AC</b> |
|   | MseI-CA       | GATGAGTCCTGAGTAACA                     |
| S | EcoRI- AC-FAM | <b>FAM</b> -GACTGCGTACCAATTC <b>AC</b> |
|   | MseI-T        | GATGAGTCCTGAGTA <b>A</b> T             |

Todos los oligonucleótidos fueron facilitados por Isogen Life Science.

### III.2.5. Compuestos volátiles

En la Tabla 7 se recogen los compuestos identificados en la fracción volátil de los mostos fermentados en el laboratorio y analizados mediante GC-FID y GC-MS.

**Tabla 7. Compuestos utilizados para la cuantificación de ácidos, ésteres, aldehídos, acetatos y alcoholes.** El umbral de percepción se muestra en mg/L. Distribuidores: Sigma-Aldrich (a), Eastman (b), Dr. Ehrenstorfer GmbH (c) y K&K (d).

|  | Fórmula empírica                               | Calidad | Nº CAS    | Descriptor*                   | Umbral percepción* |
|--|--|---------|-----------|-------------------------------|--------------------|
| <b>Ácidos</b>                          |  |         |           |                               |                    |
| Ácido decanoico <sup>a</sup>           | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 99,50%  | 142-62-1  | Grasa; desagradable           | 2,2 – 102          |
| Ácido laurico <sup>a</sup>             | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | 99,50%  | 143-07-7  | Graso; queso; cera            | 5                  |
| Ácido hexanoico <sup>a</sup>           | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | 99,00%  | 142-62-1  | Queso; grasa; sudor           | 0,093 – 10         |
| Ácido nonanoico <sup>b</sup>           | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 99,50%  | 112-05-0  | Grasa; cera                   | 3 – 9              |
| Ácido octanoico <sup>a</sup>           | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 99,50%  | 124-07-2  | Fruta ácida; rancio           | 0,91 – 19          |
| <b>Ésteres</b>                         |  |         |           |                               |                    |
| Butirato de etilo <sup>a,c</sup>       | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | 99,50%  | 105-54-4  | Afrutado; notas de piña       | 0,0001 – 0,018     |
| Decanoato de etilo <sup>a</sup>        | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | 99,00%  | 110-38-3  | Afrutado; notas de uva        | 0,008 – 0,012      |
| Hexanoato de etilo <sup>a,c</sup>      | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 99,50%  | 123-66-0  | Piña; plátano                 | 0,0003 – 0,005     |
| Octanoato de etilo <sup>a,c</sup>      | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 99,00%  | 106-32-1  | Flores; notas de albaricoque  | 0,005 – 0,092      |
| Valerato de etilo <sup>a,c</sup>       | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 99,70%  | 539-82-2  | Notas de manzana              | 0,0015 – 0,005     |
| Propionato de etilo <sup>c</sup>       | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | 99,70%  | 105-37-3  | Ron; piña                     | 0,009 – 0,045      |
| Succinato de dietilo <sup>a</sup>      | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>  | 99,50%  | 123-25-1  | Suaves notas a fruta y flor   | 1,2                |
| <b>Aldehídos</b>                       |  |         |           |                               |                    |
| Acetaldehído <sup>c</sup>              | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O                | 99,50%  | 75-07-0   | Hierba verde; manzana         | 0,027 – 0,38       |
| <b>Alcoholes</b>                       |  |         |           |                               |                    |
| 1-Propanol <sup>c</sup>                | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O                | 99,90%  | 71-23-8   | Fruta madura                  | 5,7 – 40           |
| 2-Feniletanol <sup>a</sup>             | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O               | 99,00%  | 200-456-2 | Rosa; notas de melocotón      | 0,015 – 3,5        |
| <b>Acetatos</b>                        |  |         |           |                               |                    |
| Acetato de etilo <sup>c</sup>          | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | 99,80%  | 141-78-6  | Notas frutales; bamiz         | 0,005 – 5          |
| Acetato de 2-feniletilo <sup>a,b</sup> | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> | 97,00%  | 103-45-7  | Rosa; afrutado; miel          | 3 – 5              |
| Acetato de hexilo <sup>a,b</sup>       | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 99,70%  | 142-92-7  | Cereza; pera; manzana; flores | 0,002 – 0,48       |
| Acetato de isoamilo <sup>c</sup>       | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 99,70%  | 123-92-2  | Fruta dulce; plátano; pera    | 0,002 – 0,043      |
| Acetato de isobutilo <sup>c,d</sup>    | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | 99,80%  | 110-19-0  | Grosella; jacinto rosa        | 0,065 – 0,9        |

\*(Burdock, 2016)

---

---

Como patrones internos de los análisis de CG-FID y CG-MS se emplearon los compuestos volátiles que se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Compuestos volátiles utilizados como patrones internos.** Todos fueron distribuidos por Sigma-Aldrich.

| Patrones Internos | Calidad | Nº CAS   | Técnica       |
|-------------------|---------|----------|---------------|
| Tetrahidrofurano  | 99,90%  | 109-99-9 | GC-FID        |
| 4-octanol         | 97,00%  | 589-62-8 | HS-SPME-GC-MS |

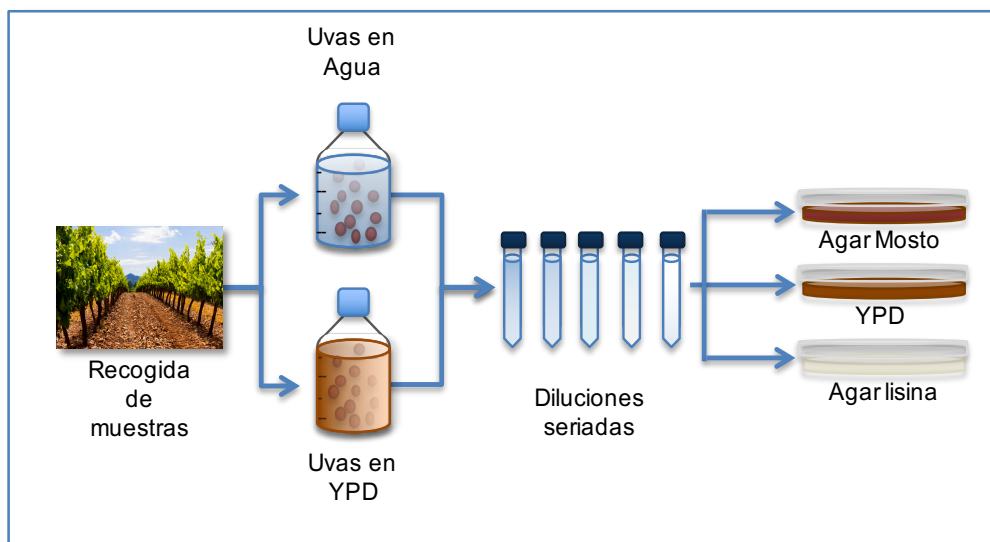
### III.3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

#### III.3.1. Aislamiento de levaduras

##### III.3.1.1. Levaduras de la uva

Para estudiar las levaduras presentes en el hollejo de la uva se seleccionaron 50 uvas sanas de los diferentes pagos muestreados: 25 fueron introducidas en una botella con 250 mL de agua destilada estéril y las otras 25 en una botella con 250 mL de medio YPD. Las botellas, ligeramente abiertas, fueron incubadas durante 72 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se hicieron diluciones seriadas de las suspensiones y se cultivaron aquellas comprendidas entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  en placas de medio YPD, medio agar mosto y medio selectivo agar lisina. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas (Figura 9).

Las diferencias en la morfología y la coloración de las colonias crecidas en los tres medios facilitó la diferenciación entre algunas de ellas. Se seleccionaron aleatoriamente al menos 5 colonias de las diferentes morfologías y se crecieron en medio YPD durante 24 horas a 30 °C para la obtención de cultivos puros de cada una de las colonias seleccionadas.



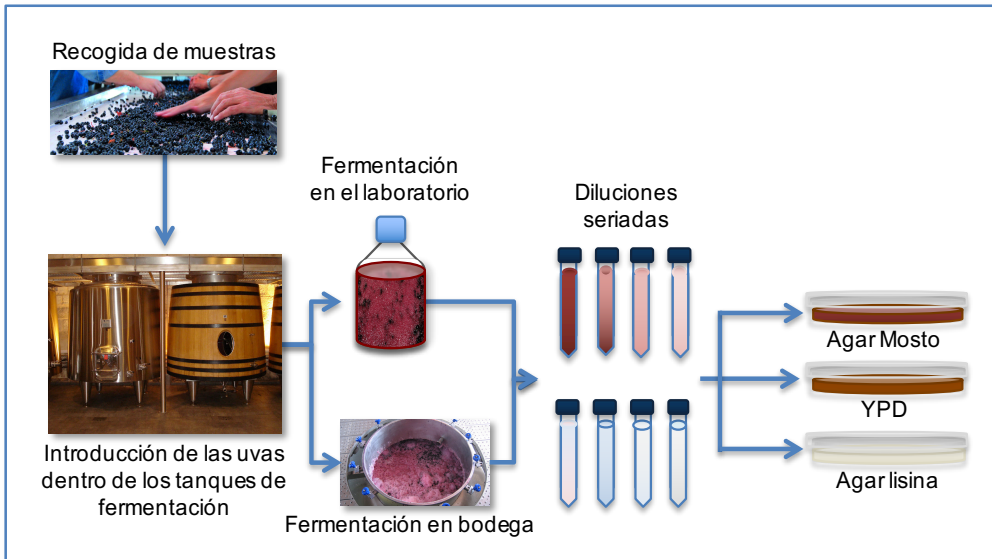
**Figura 9. Representación gráfica del método utilizado para el aislamiento de las levaduras presentes en el hollejo de la uva.**

### III.3.1.2. Levaduras del mosto de uva

Previamente a la preparación del mosto, las uvas, tras su recogida, se sometieron a un proceso de maceración en frío, manteniéndose a 5 °C en una cámara frigorífica industrial. Transcurridos 7 días, las uvas se introdujeron en tanques de fermentación de 5.000 ó 10.000 L de aluminio, hormigón o madera, siguiendo los criterios de los enólogos de las bodegas. Las uvas se dejaron caer al interior de los tanques desde la parte superior tras haber sido despalilladas y seleccionadas, lo que provoca su ruptura y la liberación de su jugo, siendo el resultado tanques llenos de mosto natural de uva. De estos mostos, aún sin fermentar, se recogieron muestras de 200 mL y se dejaron fermentar a temperatura ambiente (22-25°C) en el laboratorio, al mismo tiempo que el proceso se desarrolló en la bodega.

De los tanques de fermentación que contenían únicamente mosto de uva de los pagos seleccionados, se tomaron muestras de 100 mL a distintos tiempos, de los cuales, 10 mL se utilizaron para el aislamiento de levaduras

y el resto fue almacenado para la extracción del ADN genómico total del conjunto de levaduras presentes en cada muestra.



**Figura 10. Procedimiento para el aislamiento de las levaduras presentes en el mosto de uva.**

De forma similar a como se hizo con las suspensiones de uva, se realizaron diluciones seriadas de todas las muestras de mosto y con las diluciones comprendidas entre  $10^{-5}$  y  $10^{-8}$  se realizaron siembras en placas de medio YPD, medio agar mosto y medio selectivo agar lisina (Figura 10). Las placas se incubaron a 30 °C y a las 48 horas se seleccionaron aleatoriamente entre 5 y 7 colonias de cada una de las diferentes morfologías que se pudieron apreciar para obtener cultivos puros.

### III.3.2. Conservación de levaduras

Para la conservación de las levaduras se recogieron 750  $\mu\text{L}$  de cultivo puro en fase estacionaria, crecido en medio YPD, y se homogeneizaron con 250  $\mu\text{L}$  de glicerol al 60%, manteniéndose dicha mezcla a -80 °C hasta su próximo uso (Sambrook y col., 2006).

### III.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### III.4.1. Purificación de ADN genómico de levadura

La purificación del ADN genómico de levaduras crecidas en cultivos puros en el laboratorio se hizo siguiendo el método descrito por Philippsen y colaboradores (Philippsen y col., 1991) o utilizando el kit *MasterPure™ DNA Purification* de Eppicentre.

Para la purificación directa del ADN genómico de las levaduras presentes en las muestras de mosto evitando las impurezas del mismo, se aplicó el pre-tratamiento que se describe a continuación, fundamentado en estudios previos que perseguían el mismo objetivo (Andorrá y col., 2008; Cocolin y col., 2000). Se mezclaron 25 mL de mosto con 25 mL de fenol:cloroformo:isoamílico y se agitó la muestra hasta obtener una solución homogénea que se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Una vez separadas la fase acuosa y la orgánica, se transfirió la primera de ellas a un tubo limpio y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las levaduras. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 2 mL de agua estéril, centrifugando de nuevo a 4.000 rpm durante 5 minutos. Tras los dos lavados, las células se resuspendieron en 5mL de agua destilada y se repartieron en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1,5 mL. A continuación, se centrifugaron nuevamente a 10.000 rpm durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante las células se resuspendieron en 200µL de tampón de extracción de ADN I. Seguidamente, se añadieron 100 µL de SDS 2% y 50 µL de proteinasa K 4,5 mg/mL y la mezcla se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Teniendo en cuenta la sensibilidad de algunos métodos de caracterización molecular de levaduras, el ADN extraído de las levaduras, ya fuese de cultivos puros o de muestras de mosto, fue sometido al siguiente método de limpieza. Al ADN purificado se le añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico y se mezcló vigorosamente la mezcla hasta

---

---

obtener una solución homogénea. Seguidamente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 8 minutos y se transfirió la fase acuosa de cada muestra a un tubo limpio, donde se le añadió 1/10 del volumen de AcNa 3 M y dos volúmenes de etanol frío al 100%. Las mezclas se incubaron durante 12 horas a -20 °C y después se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante de todas ellas y se lavó el precipitado con 100µL de etanol frío al 70% centrifugando por última vez a 13.000rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de ADN se dejó secar al aire. El ADN precipitado se resuspendió en 30 µL de tampón TE.

### **III.4.2. Caracterización molecular de levaduras**

#### **III.4.2.1. Análisis ITS-RFLP**

Para la identificación de las levaduras se hizo el análisis de los polimorfismos de restricción de las regiones espaciadoras transcritas internas del gen del ADN ribosómico 5.8S (ITS-RFLP). Para su amplificación por PCR se utilizaron los cebadores ITS-1 e ITS-4 (Tabla 5) y los productos de la amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *HhaI* durante 12 horas a 37 °C, siguiendo el protocolo descrito por Esteve-Zarzoso y col. (1999). Los fragmentos generados se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) y los patrones obtenidos se compararon con los incluidos en la base de datos [www.yeast-id.org](http://www.yeast-id.org) y otras publicaciones.

#### **III.4.2.2. Secuenciación de la región D1/D2**

Las levaduras que no pudieron ser identificadas mediante ITS-RFLP debido a que los fragmentos de restricción obtenidos no eran específicos, se analizaron mediante secuenciación de la región D1/D2 del ADN ribosómico 26S. Basándonos en el protocolo establecido por Kurtzman y Robnett (1998), se amplificó dicha región del ADN ribosómico mediante PCR utilizando los cebadores NL-1 y NL-4 (Tabla 5). Los productos

obtenidos se purificaron con el kit *QIAquick PCR purification* de Quiagen, eluyendo el ADN en 25  $\mu$ L de agua miliQ estéril. La integridad del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v (Sambrook y col., 2006) y su concentración se determinó utilizando un *NanoDrop 2000c* de Thermo Scientific. La secuenciación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en un secuenciador *ABI 3130 XL* en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Las secuencias obtenidas se compararon con las incluidas en la base de datos de secuencias no redundantes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el programa BlastN (Altschul y col., 1997).

#### III.4.2.3. AFLP

La caracterización intraespecífica de las levaduras aisladas se hizo mediante el análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). En este trabajo se ha utilizado el protocolo que se describe a continuación basado en el Kit *AFLP Microbial Fingerprint* de Applied Biosystems y en los estudios de Vos y col. (1995).

1º. Restricción/Ligación: se tomaron entre 75 y 300 ng de ADN genómico purificado y se incubaron a 37 °C durante 12 horas junto con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* y los adaptadores *EcoRI*-1p, *EcoRI*-2p, *MseI*-A1 y *MseI*-A2 (Tabla 7). Las reacciones se llevaron a cabo empleando las siguientes concentraciones y reactivos en un volumen final de 11  $\mu$ L: 1 U de *MseI*, 5 U de *EcoRI*, 1 U de *T4* ADN Ligasa, 20 mM de los adaptadores *MseI*, 2 mM de los adaptadores *EcoRI* y 0,1  $\mu$ L de NaCl 0,5 M. Finalizado el proceso de restricción/ligación se añadieron 19  $\mu$ L de tampón TE, un volumen 10 veces menor a lo indicado en el protocolo de *Applied Biosystems*, para obtener una muestra más concentrada y garantizar de esta manera el éxito del proceso.

2°. PCR preselectiva: 4  $\mu$ L de la solución resultante del paso anterior fueron utilizados como molde en la reacción de PCR preselectiva [0.5  $\mu$ M de los cebadores *EcoRI*-1p y *MseI*-0 (Tabla 6); 0,625 mM de cada dNTP; 1mM de  $MgCl_2$ ; 1x de tampón *Taq* polimerasa; 1 U de *Taq* polimerasa]. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 72 °C durante 2 minutos; 20 ciclos de 94 °C 20 segundos, 56 °C 30 segundos, 72 °C 2 minutos; 4 °C indeterminado.

3°. PCR selectiva: se emplearon 1,5  $\mu$ l de la reacción anterior como molde para llevar a cabo esta amplificación selectiva [0.25 $\mu$ M de cada uno de los cebadores de los pares M, N, J, Q, H, G o S (Tabla 6); 0,625 mM de cada dNTP; 1 mM de  $MgCl_2$ ; 1x del tampón *Taq* polimerasa; 1 U de *Taq* polimerasa]. En esta reacción uno de los cebadores específicos estaba marcado con un fluoróforo (HEX o FAM). Los parámetros utilizados en el termociclador para llevar a cabo esta reacción se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Programa de amplificación selectiva para la obtención de AFLP.**

| Temperatura estable | Ciclos    |               |              | Nº de ciclos |
|---------------------|-----------|---------------|--------------|--------------|
| 94 °C 2 min.        | -         | -             | -            | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 66 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 65 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 64 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 63 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 62 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 61 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 60 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 59 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 58 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 57 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 1            |
| -                   | 94 °C 20s | 56 °C 30 sec. | 72 °C 2 min. | 20           |
| 60 °C 30 min.       | -         | -             | -            | 1            |
| 4 °C indeterminado  | -         | -             | -            | 1            |

4°. Electroforesis capilar: los fragmentos amplificados en la reacción anterior se resolvieron mediante electroforesis capilar en un sistema *ABI 3130 XL* en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Las muestras se prepararon con 0,5  $\mu$ L de la reacción de PCR anterior, 0,25  $\mu$ L de patrón interno GeneScan™ 500ROX y 9,25  $\mu$ L de Formamida Hi-Di™. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 3 minutos, seguidamente se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se resolvieron en el equipo de electroforesis.

5°. Análisis de resultados: los AFLP resueltos por el sistema ABI3130 XL fueron analizados utilizando el programa *GeneMapper* de Applied Biosystems, que muestra el producto de la electroforesis capilar como electroferogramas coloreados en función del fluoróforo utilizado: HEX (verde) y FAM (azul). Cada uno de los picos de los electroferogramas se corresponden con uno de los alelos, o fragmentos AFLP generados. La posición de estos picos en el eje de abscisas indica el tamaño en pb del alelo, y su altura la abundancia del mismo en unidades de fluorescencia. Los electroferogramas obtenidos con el mismo par de oligonucleótidos a partir de aislados de la misma especie fueron analizados entre ellos por comparación (superposición) para identificar los alelos comunes y diferenciales entre muestras de una misma especie con un error de +/-0.5 pb. Únicamente fueron considerados los alelos cuya abundancia fue superior a las 200 unidades de fluorescencia (copias), considerándose los que presentaron valores inferiores como ruido de fondo. Cabe destacar que los alelos con tamaños inferiores a los 100 pb no fueron tenidos en cuenta, debido a que son comunes entre muestras de diferentes especies. De igual manera, los alelos de más de 400 pb fueron descartados en el análisis debido a su escasez. La información contenida en cada electroferograma también es muestra de manera numérica por el software en una tabla, lo que facilita la

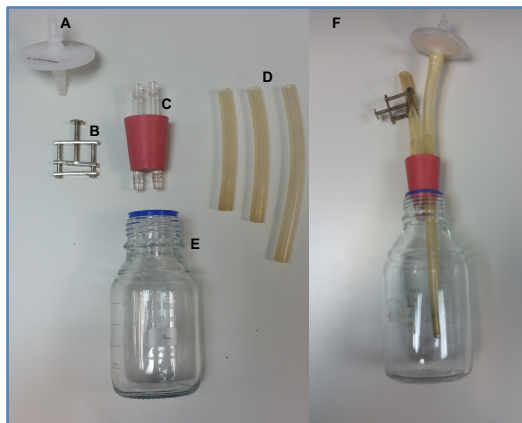
---

---

comparación e identificación de los alelos AFLP comunes entre diferentes muestras de levadura.

### III.5. FERMENTACIONES

Las fermentaciones que se llevaron a cabo en el laboratorio para este estudio se realizaron empleando como medio normalizado mosto de uva *Tempranillo* esterilizado por sulfatación. Se partió de un mosto con una concentración inicial de 65 grados Brix, que se diluyó hasta los 19,5 grados Brix con agua destilada estéril para dejar una concentración de azúcares similar a la de los mostos naturales de uva tinta. Además se le añadieron 15 g/hL de fosfato amónico (Laffort) como fuente de nitrógeno. Se utilizaron volúmenes de mosto de 50 ó 240 mL que se introdujeron en matraces de 100 mL o en botellas/fermentadores de 250 mL respectivamente (Figura 11).



**Figura 11. Fermentador diseñado para llevar a cabo fermentaciones en el laboratorio. A:** filtro Midisart 2000 (0,20 $\mu$ M PTFE); **B:** llave Hoffman; **C:** tapón de goma maciza (diámetro mayor de 3,5 cm y menor de 2,8 cm) con dos orificios atravesados por dos cilindros de vidrio de 9 cm de longitud, un diámetro exterior de 0,9 cm y un diámetro interior de 0,6 cm; **D:** tubos de silicona de 13,5 ó 10,5 cm con un diámetro exterior de 1,2 cm y un diámetro interior de 0,8 cm; **E:** botella pírax de 250 mL; **F:** fermentador listo para su uso. Todo el material fue suministrado por Arpival salvo los filtros Midisart, que fueron suministrados por Sartorius.

Todas las fermentaciones tuvieron lugar en una sala a oscuras y con una temperatura controlada y estable de 19°C. El tiempo de fermentación osciló

desde los 4-5 días en algunas fermentaciones individuales (mosto inoculado con una única levadura), hasta los 22 días en las fermentaciones complejas (mosto inoculado con más de una levadura). La finalización del proceso fermentativo se fijó en base a la disminución en la producción de CO<sub>2</sub> hasta que ser imperceptible y/o en un valor de densidad del mosto inferior a 1 g/mL. Diariamente, se homogeneizaron de manera suave los matraces y botellas, y se permitió la salida de los gases cuando se seguían produciendo, lo que facilitó el control del avance de la fermentación. Para medir la densidad de los mostos se utilizó un mostímetro (Probodega), que es un densímetro especializado de doble escala con el que poder medir las variaciones de densidad (comprendida entre 0,980 y 1,130 g/mL) y el porcentaje de alcohol probable (rango entre 3 y 17%), factores que varían con la evolución de la fermentación en función del consumo de azúcares.

En lo que respecta a las levaduras se llevaron a cabo tres tipos de fermentaciones: individuales, dobles y complejas. En las fermentaciones individuales sólo se inocularon levaduras de géneros no-*Saccharomyces* de manera singular, en las fermentaciones dobles se inoculó una levadura de tipo no-*Saccharomyces* junto a una del género *Saccharomyces* y en las fermentaciones complejas se utilizaron diferentes combinaciones con más de dos levaduras. Se empleó un método de inoculación secuencial: el día 0 se añadieron las levaduras de los géneros no-*Saccharomyces* y 3 días después del inicio de la fermentación se añadieron las levaduras del género *Saccharomyces*. La concentración inicial de cada levadura inoculada en el mosto osciló entre las 1.000 y los 3 millones de células/mL, dependiendo del experimento y la especie de levaduras.

### **III.6. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES VINCULADOS CON EL AROMA DEL VINO**

Para poder determinar la influencia de las levaduras en la calidad de los vinos tintos fermentados en el laboratorio, se llevó a cabo un análisis sensorial de sus propiedades organolépticas y un análisis químico de su fracción volátil.

---

---

### III.6.1. Análisis sensorial

Los mostos fermentados individualmente fueron evaluados en base a su color, aroma y sabor por un panel de cata formado por 5 evaluadores: 2 expertos que dirigían la cata y 3 investigadores. El cuarto en el que se llevó a cabo la cata se mantuvo a una temperatura constante de 18°C y los vinos se sirvieron a temperatura ambiente en vasos certificados y codificados. La evaluación de la calidad de los vinos fue hecha con las opciones de deseable (7-9 puntos), aceptable (4-6 puntos) y no deseable (1-3 puntos). Las puntuaciones finales fueron calculadas en base a la media teniendo en cuenta la evaluación de cada catador.

### III.6.2. Análisis de la fracción volátil por GC-FID

Para el estudio de la fracción volátil de algunos de los mostos fermentados se utilizó la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). La preparación de la muestra se hizo añadiendo en un vial de cromatografía 1 mL de mosto fermentado y 100 µL de tetrahidrofurano (25 mg/L) como patrón interno. El método de análisis utilizado fue la inyección directa de las muestras en un cromatógrafo de gases 7980A de Agilent Technologies equipado con un detector de ionización de llama. Las condiciones de la cromatografía fueron: temperatura del inyector y del detector 280°C, el tipo de inyección utilizada split (ratio de Split 10:11) y el tamaño de la muestra 2 µL. Para la separación de los compuestos analizados se utilizó una columna TRB-FFAP de sílica gel (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) suministrada por Teknokroma, helio como gas portador (37,3 psi) y un gradiente de temperatura que iba desde los 60 °C a los 200 °C, manteniendo la temperatura inicial durante un minuto y con un incremento lineal de 20 °C/minuto (Fernández, 2004). Estos análisis se llevaron a cabo en el *Servicio de Cromatografía de Gases del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)*.

Este método fue empleado para detectar acetaldehído, acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y propionato de etilo. La identificación de estos compuestos se hizo en base a los tiempos de retención obtenidos de patrones comerciales empleando el método de análisis previamente descrito (Clemente-Jimenez y col., 2004; de Lerma y Peinado, 2011; López y col., 2011). Los patrones comerciales se prepararon a una concentración de 50 mg/L en agua mili-Q. En todas las muestras fue empleado como patrón interno el tetrahidrofurano (25 mg/L).

### **III.6.3. Análisis de la fracción volátil por HS-SPME-GC-MS**

El otro método empleado en el estudio de la fracción volátil de los mostos fermentados, consistió en la obtención de los compuestos volátiles presentes en el espacio en cabeza mediante microextracción en fase sólida y su posterior identificación haciendo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

Para la extracción de los compuestos volátiles se diluyeron 2 mL de mosto con 8 mL de tampón citrato en un vial de cromatografía de 20 mL. A dicha mezcla se le añadieron 25  $\mu$ L de 4-octanol (50 mg/L) como patrón interno y un imán de agitación. Los viales se cerraron herméticamente con un septum de teflón/silicona y fueron incubados en un sistema *CombiPal* de CTCAnalytics AG a 40 °C con agitación magnética durante 30 minutos, a fin de facilitar la acumulación de los compuestos volátiles en el espacio en cabeza del vial (Xu y col., 2007). Transcurrido el tiempo de incubación se adsorbieron los compuestos volátiles del espacio en cabeza en una fibra 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS de 2cm de longitud (Fan y Qian, 2005). La desorción de los compuestos volátiles se llevó a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases (6890N de Agilen Technologies) a 250 °C (Chen y col., 2013; Fan y col., 2007). Tras la inyección, la fibra se lavó tres veces con etanol 100% para evitar contaminaciones. La separación de los

---

---

compuestos volátiles se llevó a cabo en una columna ZB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,5 mm) suministrada por Zebron, usando helio como gas portador con un caudal de 1,5mL/minuto y con el siguiente programa de temperatura del horno: 40 °C de temperatura inicial mantenida durante 4 minutos seguido de una rampa de temperatura de 4 °C/minuto hasta los 230 °C, manteniéndose a esa temperatura final durante 10 minutos (Yuan y Qian, 2015).

Para la detección de los compuestos volátiles se utilizó un espectrómetro de masas 5973N de Agilent, con unas temperaturas en el colector y en el conducto de transferencia de 150 y 230 °C respectivamente. El patrón de fragmentación del espectro de masas se obtuvo empleando 70 eV como voltaje de ionización y una corriente de ionización de 10  $\mu$ A (Fang y Qian, 2006; Pérez-Martín y col., 2015). La cuantificación de los compuestos estudiados se hizo por el método de patrón interno, utilizando las áreas de pico obtenidas con la monitorización de los iones seleccionados (SIM) de cada uno de los compuestos (Marrufo-Curtido y col., 2012; Siebert y col., 2005; Tredoux y col., 2008): ácido decanoico (141), ácido laurico (60), ácido octanoico (77), ácido nonanoico (115), ácido hexanoico (63), butirato de etilo (71), decanoato de etilo (88), hexanoato de etilo (88), octanoato de etilo (88), valerato de etilo (88), succinato de dietilo (101), 2-feniletanol(91), acetato de etilo (66), acetato de feniletilo (91), acetato de hexilo (84), acetato de isobutilo (87) y acetato de isoamilo (56). Para calcular la concentración de los compuestos estudiados, se emplearon rectas de calibrado, que se generaron utilizando patrones comerciales de cada uno de los compuestos. De cada uno de estos patrones se generó un stock a 10.000 mg/L en etanol que fue diluido en tampón tartarato para la obtención de las rectas de calibrado, cuyos puntos se determinaron en función de las concentraciones esperadas para cada compuesto (Aznar y col., 2001; Cañas y col., 2008; Ferreira y col., 2000; Gil y Vallés, 2001) y obtuvieron coeficientes de regresión lineal entre 0,98 y 0,99. Como patrón interno para el cálculo de los puntos de las rectas de calibrado se utilizaron 25  $\mu$ L de 4-octanol (50

mg/L) y se llevaron a cabo por triplicado siguiendo el mismo método de análisis que se empleó para el estudio de la fracción volátil de las muestras de mosto. Para el control de los equipos, la obtención de las rectas de calibrado y análisis de los resultados se empleó el software de Agilent Technologies *MSD ChemStation*.

#### **III.6.4. Análisis estadístico**

Las diferencias que se observaron entre los mostos fermentados obtenidos con diferentes levaduras, fueron estudiadas estadísticamente aplicando un análisis de varianza (ANOVA). Para evaluar la significancia de los análisis se utilizó el test de la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey (Juega y col., 2015). El “software “utilizado para estos análisis fue SPSS® 21 MAC OSX de IBM®.









IV

Resultados



---

## IV.1. TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS

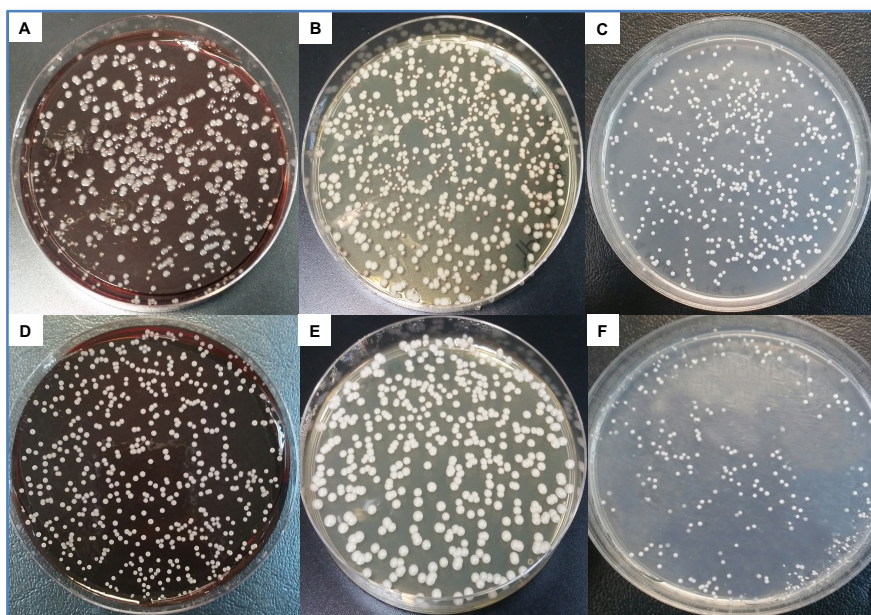
Este trabajo se ha realizado a partir de 17 muestras de uva y 54 muestras de mosto fermentado de la variedad *Tempranillo* de *Vitis vinífera*. Las muestras se recogieron durante las vendimias de 2010, 2011 y 2012 de 17 pagos diferentes de las bodegas Áster y Díaz Bayo, ambas pertenecientes a la D.O. Ribera del Duero. Los procedimientos de recogida y tratamiento de las muestras se han descrito en el Apartado III.3.1 de la Sección Materiales y Métodos.

Las muestras de uvas que se recogieron durante las tres vendimias fueron incubadas en agua o medio YPD a temperatura ambiente durante 72 horas. De dichas suspensiones se hicieron diluciones seriadas y de las diluciones comprendidas entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  se sembraron 100  $\mu\text{L}$  en placas de agar mosto, agar lisina y agar YPD, y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Las colonias de las levaduras presentes en el hollejo de la uva mostraron una gran variabilidad morfológica (Figura 12 A, B y C). Concretamente, se pudieron diferenciar cuatro tonalidades de morado en las colonias que crecieron en placas de agar mosto (Figura 12A), tres tamaños y tres coloraciones diferentes (blanquecino, amarillo y marrón) en aquellas que lo hicieron en placas de YPD (Figura 12B) y dos tamaños diferentes de colonia con la misma tonalidad blanquecina en las placas de agar lisina (Figura 12C). De forma paralela al análisis morfológico de las levaduras aisladas del hollejo de la uva se recogieron muestras de mosto de los tanques de fermentación en bodega (días 2, 5 y 10 tras el inicio de la fermentación) y de las fermentaciones que se desarrollaron en el laboratorio (día 5). De igual manera a como se hizo con las suspensiones de uvas, las muestras de mosto se diluyeron y se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones comprendidas entre  $10^{-5}$  y  $10^{-8}$  en los tres medios previamente mencionados. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Coincidiendo con los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de uvas, se obtuvo una gran variabilidad morfológica en las colonias aisladas de muestras de mosto recogidas los días 2 y 5 del proceso fermentativo, mientras que apenas se registró variabilidad morfológica en las colonias que se aislaron

---

---

de las muestras de mosto recogidas el día 10. Este hecho se debe a la predominancia de las especies del género *Saccharomyces* según avanza el proceso fermentativo. En las placas de YPD en las que se sembraron muestras de mosto recogidas el día 10, tanto el tamaño como el color de las colonias crecidas fue prácticamente el mismo (Figura 12E) y en las placas de agar mosto sólo se detectó una única tonalidad de morado (Figura 12D). Sin embargo, en las placas de agar lisina en las que se sembraron las muestras de mosto del día 10, las colonias presentaron la misma variedad cromática y morfológica que en las muestras correspondientes al día 2 y 5 del proceso fermentativo, aunque la abundancia se redujo entre un 70 y un 90% (Figura 12F).



**Figura 12. Colonias de levaduras indígenas crecidas en diferentes medios de cultivo. A, B, C:** levaduras procedentes de la suspensión de uvas en YPD (dilución  $10^{-2}$ ) crecidas en agar mosto (A), YPD (B) y agar lisina (C); **D, E, F:** levaduras procedentes de mosto recogido el día 10 (la dilución  $10^{-5}$ ) crecidas en agar mosto (D), YPD (E) y agar lisina (F).

A partir de las colonias crecidas en las placas de YPD se pudo determinar la concentración de levaduras en las diferentes muestras analizadas. Se determinó una concentración media de  $2 \cdot 10^6$  ufc/mL en las muestras de uva que se mantuvieron en suspensión en agua estéril, mientras que las que

estuvieron suspendidas en YPD presentaron una concentración media de  $4 \cdot 10^7$  ufc/mL. Esta diferencia se debe al hecho de que las levaduras presentes en el hollejo de la uva pudieron crecer activamente gracias a los nutrientes aportados por el medio YPD. En las muestras de mosto recogidas el día 2 del proceso fermentativo la concentración media de levaduras fue de  $2 \cdot 10^8$  ufc/mL, en las que se tomaron el día 5,  $1 \cdot 10^9$  ufc/mL y en las muestras correspondientes al día 10 la concentración media descendió dos órdenes de magnitud hasta  $1 \cdot 10^7$  ufc/mL. Estos datos corroboran que a medida que avanza la fermentación y se incrementa la concentración de etanol en el mosto, la concentración de levaduras disminuye, quedando únicamente aquellas con una mayor tolerancia al etanol.

Teniendo en cuenta la variabilidad morfológica de las colonias crecidas en los diferentes medios y el origen de las mismas, se seleccionaron un total de 1200 colonias de levaduras indígenas para realizar el estudio: 404 de la vendimia de 2010, 472 de 2011 y 324 de 2012 (Tabla 10), con las que se ha realizado este estudio.

**Tabla 10. Número de aislados de levadura seleccionadas por vendimia y por muestra.**

| Origen aislados                    | Vendimia |      |      |
|------------------------------------|----------|------|------|
|                                    | 2010     | 2011 | 2012 |
| Uvas var. <i>Tempranillo</i>       | 63       | 51   | 47   |
| Mosto fermentado laboratorio día 5 | 107      | 133  | 83   |
| Mosto fermentado en bodega día 2   | 56       | 82   | 56   |
| Mosto fermentado en bodega día 5   | 137      | 130  | 92   |
| Mosto fermentado en bodega día 10  | 41       | 76   | 46   |
| Total aislados                     | 404      | 472  | 324  |

## IV.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INTERESPECÍFICA DE LEVADURAS

La determinación de las especies a las que pertenecían las levaduras aisladas, se hizo mediante análisis ITS-RFLP del ADNr 5,8S y secuenciación

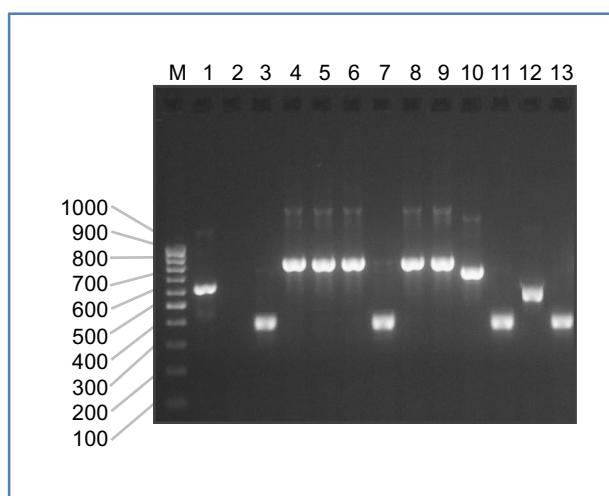
---

---

de la región D1/D2 del ADNr 26S, siguiendo los procedimientos descritos en el Apartado III.4.3 de la Sección Materiales y Métodos.

#### IV.2.1. Análisis ITS-RFLP

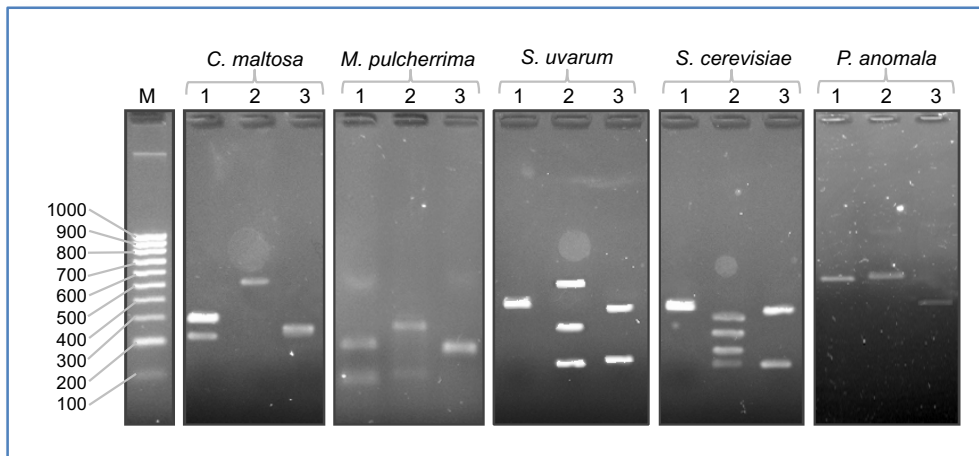
Se utilizaron 100 ng de ADN purificado de levadura como molde en la reacción de amplificación por PCR de la región ITS, obteniéndose fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre los 400 y 900 pb en función de la muestra (Figura 13).



**Figura 13. Regiones ITS amplificadas por PCR de diferentes levaduras.** Gel de agarosa al 1,5% donde pueden apreciarse productos de amplificación de cuatro tamaños diferentes: 400pb (3, 7, 11 y 13), 560pb (12), 640pb (1), 780pb (10), 850pb (4, 5, 6, 8 y 9). Muestras: 1 (DB10.3.3.1), 2 (DB10.1.5.1), 3 (DB10.1.4.2), 4 (DB10.1.6.2), 5 (DB11.3.1.1), 6 (DB11.3.8.3), 7 (DB11.5.7.3), 8 (DB11.2.2.5), 9 (DB12.3.7.8), 10 (DB12.1.1.6), 11 (DB12.4.1.4), 12 (DB12.3.6.6) y 13 (DB12.1.7.1); M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Estos fragmentos de ADN fueron digeridos con las enzimas de restricción *HhaI*, *HaeIII* y *HinfI*, generándose patrones de restricción que permitieron identificar algunos de los aislados analizados. En la Figura 14 se muestran los fragmentos obtenidos tras la digestión con estas enzimas de los aislados DB10.3.3.1, DB10.1.4.2, DB11.3.1.1, DB12.3.7.8 y DB12.1.7.1 que corresponden con las muestras 1, 3, 5, 9 y 12 de la Figura 13 respectivamente. Los patrones de restricción obtenidos se compararon con

los de la base de datos yeast-id-org ([www.yeast-id.org](http://www.yeast-id.org)) y permitieron identificar estas muestras como *Candida maltosa* (DB12.1.7.1), *Metschnikowia pulcherrima* (DB10.1.4.2), *Saccharomyces uvarum* (DB11.3.1.1), *Saccharomyces cerevisiae* (DB12.3.7.8) y *Pichia anomala* (DB10.3.3.1) con un porcentaje de similitud del 100%. Como control se emplearon las levaduras tipo procedentes de la CECT y las levaduras comerciales seleccionadas (Tabla 1).



**Figura 14. Digestiones de la región ITS.** Gel de agarosa al 1,5% donde se muestran los fragmentos de ADN generados tras la digestión de la región ITS con las enzimas de restricción *HhaI* (1), *HaeIII* (2) y *HinfI* (3) de las levaduras: DB12.1.7.1 (*C. maltosa*), DB10.1.4.2 (*M. pulcherrima*), DB11.3.1.1 (*S. uvarum*), DB12.3.7.8 (*S. cerevisiae*) y DB10.3.3.1 (*P. anomala*). M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Este método permitió identificar una gran parte de las levaduras en estudio (1.001) pertenecientes a las especies *C. maltosa*, *M. pulcherrima*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae* y *P. anomala*, sin embargo, no resultó concluyente para otros aislados, ya que los patrones de restricción obtenidos eran comunes a más de una especie, como en el caso de *Hanseniaspora uvarum* y *Dekkera anomala* o *Lachancea thermotolerans* y *Kluyveromyces valtii*. Además, también se analizaron las levaduras tipo procedentes de la CECT y las levaduras comerciales seleccionadas (Tabla 1).

---

---

## IV.2.2. Secuenciación de región D1/D2

Las 199 levaduras que no pudieron ser caracterizadas utilizando el método ITS-RFLP fueron analizadas mediante amplificación y posterior secuenciación de la región D1/D2 (600 pb) del ADN ribosómico 26S (Kurtzman y Robnett, 1998). En este análisis se incluyeron dos aislados de cada una de las especies identificadas previamente mediante ITS-RFLP como controles. Las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos GeneBank NCBI utilizando el programa BlastN (Altschul y col., 1997). La identificación se hizo en base al porcentaje de homología de las secuencias analizadas, que fue en todos los casos mayor o igual al 99% de identidad. Los resultados de la comparación nos permitieron identificar 97 aislados de *Lachancea thermotolerans*, 78 de *Hanseniaspora uvarum*, 14 de *Torulaspota delbrueckii* y 10 de *Pichia carsonii*. Asimismo, las secuencias D1/D2 de las levaduras que ya habían sido caracterizadas previamente mediante ITS-RFLP confirmaron los resultados previos, obteniéndose en los cinco casos una identidad de entre el 99 y el 100 %.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, se pudieron identificar siete especies de levaduras no-*Saccharomyces* y dos *Saccharomyces* en los 1.200 aislados analizados: *H. uvarum* (6.5%), *M. pulcherrima* (28.8%), *L. thermotolerans* (8.1%), *T. delbrueckii* (1.2%), *P. anomala* (3%), *P. carsonii* (0.8%), *C. maltosa* (0.4%), *S. cerevisiae* (47.7%) y *S. uvarum* (3.5%). De las especies identificadas, *S. cerevisiae* fue la única detectada en el 100% de los pagos, mientras que *S. uvarum* fue identificada en cuatro, *M. pulcherrima* en once, *H. uvarum* en ocho, *L. thermotolerans* en siete, *T. delbrueckii* en seis, *P. anomala* en cuatro y *P. carsonii* y *C. maltosa* en uno (Tabla 11). En los pagos Cañada Angosta, vendimia de 2010, y Nave Espaldera, vendimias de 2010 y 2011, se han identificado siete especies de levaduras distintas, cinco de ellas de géneros no-*Saccharomyces*. En la vendimia de 2012, los pagos con una mayor variabilidad de levaduras fueron Valdubón, Desecados y Hoyo Félix, con *S. cerevisiae* y tres especies no-*Saccharomyces*. Cabe destacar que no se obtuvo ningún aislado de *S. uvarum* en la vendimia de 2012.

Además, estudios sensoriales de los diferentes vinos obtenidos en las bodegas por los profesionales de las mismas, indicaron que los caldos mejor valorados eran aquellos en los que se había identificado una mayor variabilidad de levaduras, en concreto, los que tenían al menos tres de las siete levaduras no-*Saccharomyces* identificadas. Los vinos mejor valorados y que más se ajustaban a la tipicidad de la bodega Díaz Bayo fueron los de los pagos Cañada Angosta 2010, Nave Espaldera 2011 y Hoyo Félix 2012 (Tabla 11).

**Tabla 11. Número de aislados de levadura identificados en función del año y el pago de procedencia.** *M. pulcherrima* (Mp), *H. uvarum* (Hu), *L. thermotolerans* (Lt), *P. anomala* (Pa), *T. delbrueckii* (Td), *C. maltosa* (Cm), *P. carsonii* (Pc), *S. cerevisiae* (Sc) y *S. uvarum* (Su). Las cajas verdes remarcan las levaduras aisladas de los mostos mejor valorados en cada añada.

| 2010 |    |    |    |    |    |    |    |    |   | 2011 |    |    |    |    |    |    |    |    |   | 2012 |    |    |    |    |    |    |    |    |   | Pagos                  |
|------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------------------------|
| Mp   | Hu | Lt | Pa | Td | Cm | Pc | Sc | Su |   | Mp   | Hu | Lt | Pa | Td | Cm | Pc | Sc | Su |   | Mp   | Hu | Lt | Pa | Td | Cm | Pc | Sc | Su |   |                        |
| 12   | -  | -  | 5  | -  | -  | -  | -  | 11 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 15   | -  | -  | 8  | -  | -  | -  | -  | 15 | - | Vega Arriba Cercadillo |
| 24   | 8  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 23 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 20   | 5  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 10 | - | San Juan               |
| 12   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 23 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Viñota                 |
| 18   | 4  | 13 | -  | -  | 3  | 4  | 24 | 3  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Cañada Angosta         |
| 21   | 7  | -  | -  | 3  | 2  | 6  | 25 | 7  | - | 35   | -  | 5  | 5  | 2  | -  | -  | 36 | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Nave Espaldera         |
| 17   | -  | 8  | -  | -  | -  | -  | -  | 22 | 4 | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Nave Vaso              |
| -    | -  | 9  | 8  | 2  | -  | -  | -  | 23 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | 9  | 6  | 1  | -  | -  | -  | 27 | - | Valdubón               |
| 21   | 8  | 12 | -  | -  | -  | -  | -  | 12 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 14   | 6  | 7  | -  | -  | -  | -  | -  | 8  | - | Desecados              |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 34   | 19 | -  | -  | -  | -  | -  | 55 | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Hombria                |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | 1  | -  | -  | 53 | 12 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Lobera                 |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 29   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 49 | 16 | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Hoyo Aurelia           |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 31   | -  | 26 | -  | 2  | -  | -  | 62 | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | Estocada               |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | 8  | 8  | -  | -  | -  | -  | -  | 21 | - | Albillo                |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 12   | -  | -  | 4  | 2  | -  | -  | -  | 17 | - | Hoyo Félix             |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 14   | 6  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 9  | - | Rubial                 |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | 17   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 24 | - | Peñaranda              |
| -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | -    | 7  | -  | -  | 1  | -  | -  | -  | 23 | - | Valdebrero             |

Lo expuesto en este apartado permite concluir que la variabilidad de especies de levaduras indígenas que pueden aislarse en los entornos de una bodega, son notoriamente dependientes de la añada y el área de recolección de la uva (pago). No obstante, la identificación de las especies de levadura no es suficiente para el estudio que se aborda en el presente trabajo, en el que se pretende establecer una diferenciación a nivel de cepa. Por ello se continuó con la caracterización intraespecífica de las levaduras aisladas, con el fin de poder seleccionar las cepas directamente involucradas en conferir la tipicidad a los mejores vinos de las bodegas colaboradoras.

---

---

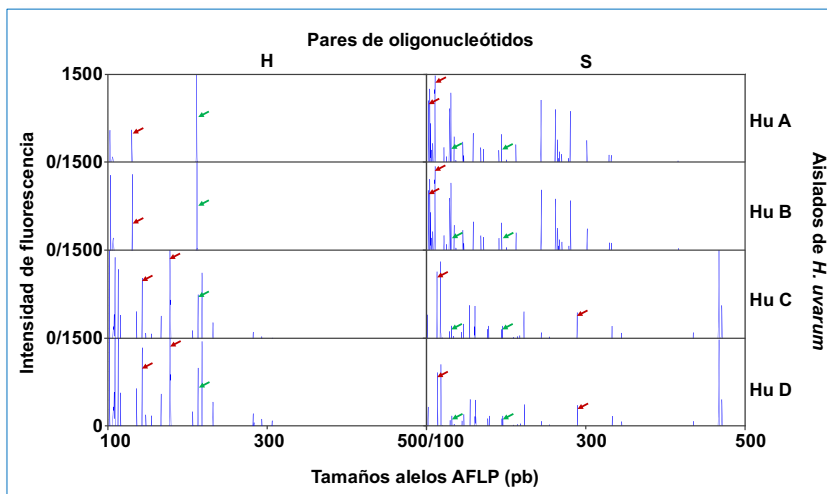
### IV.2.3. Caracterización intraespecífica

Para analizar si entre los aislados de levaduras previamente identificados a nivel de especie había diferentes cepas, decidimos llevar a cabo la caracterización intraespecífica de las mismas utilizando marcadores moleculares AFLP. Esta técnica ya había sido utilizada previamente para la caracterización molecular de variedades de plantas y de cepas microbianas debido a su alto poder de discriminación, su fiabilidad y a que es una técnica que permite rastrear todo el genoma sin la necesidad de tener información precisa sobre su secuencia.

El análisis se llevó a cabo con 43 aislados de levadura de la vendimia 2010 pertenecientes a 6 pagos diferentes. La selección de estas muestras se hizo en base a la presencia relativa de cada una de las especies y a su relevancia en las primeras fases del proceso fermentativo, por ello las especies *P. carsonii* y *C. maltosa* no fueron consideradas. Se usaron once aislados de *M. pulcherrima*, seis de *L. thermotolerans*, cuatro de *H. uvarum*, tres de *T. delbrueckii*, cuatro de *P. anomala*, seis de *S. uvarum* y nueve de *S. cerevisiae*.

Se obtuvieron perfiles AFLP de todas las muestras utilizando los siete pares de oligonucleótidos seleccionados inicialmente (Tabla 6, Apartado III.2.4 de Materiales y Métodos). El análisis de los resultados se hizo en primer lugar comparando los electroferogramas obtenidos con todas las muestras de una misma especie y los diferentes oligonucleótidos utilizados. En la comparación solo se incluyeron fragmentos AFLP de tamaños comprendidos entre los 100 y los 400 pb, debido a que los fragmentos de menor tamaño estaban presentes en todas las muestras estudiadas y los de mayor tamaño no resultaban relevantes debido a su escasez (aparecían en menos del 5% de las muestras). Además, únicamente se tuvieron en cuenta los fragmentos con una abundancia superior a 150 copias (un valor menor se estimó como ruido de fondo) y se consideró un error de +/-0,5 pb en el tamaño de los fragmentos AFLP.

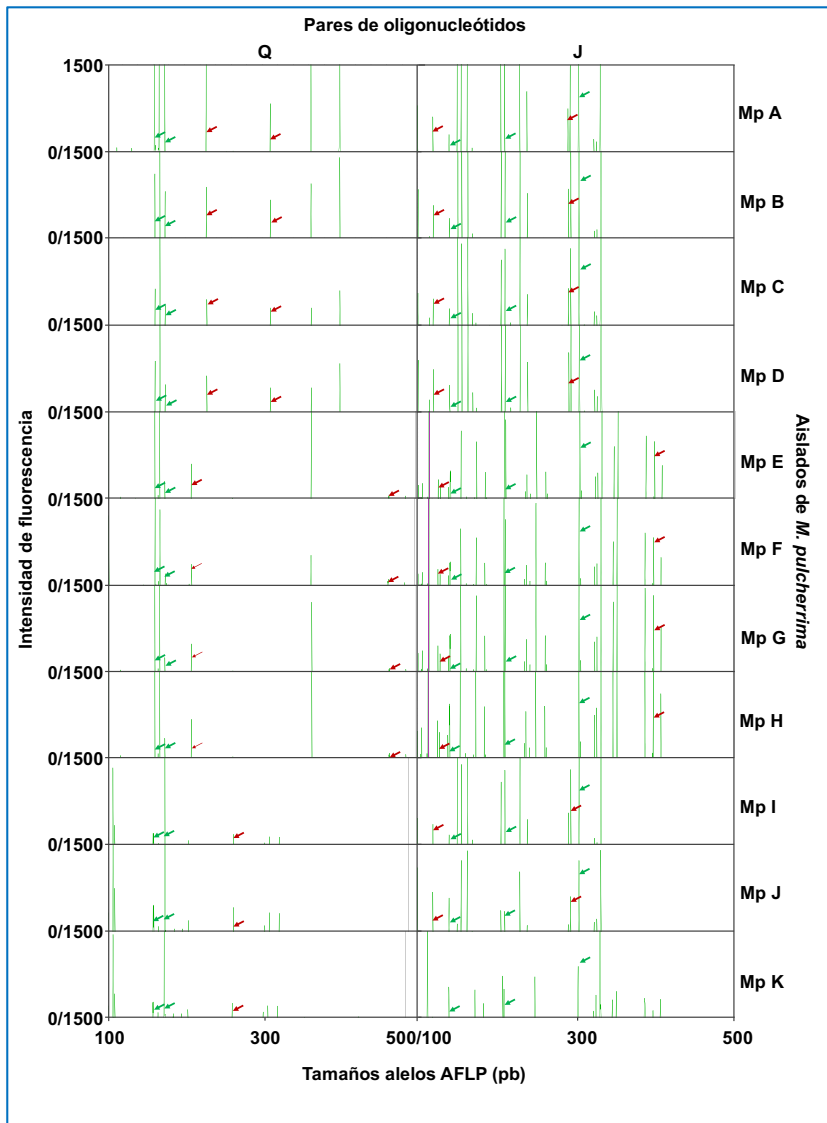
Este análisis comparativo se realizó con 308 electroferogramas, algunos de los cuales se muestran a continuación. En la Figura 15 se muestra la comparación de los electroferogramas de las cuatro levaduras seleccionadas de la especie *H. uvarum*, obtenidos con los pares de oligonucleótidos H y S. En este caso se obtuvieron dos tipos de perfiles diferentes con todos los pares de oligonucleótidos utilizados, lo que permitió la identificación de dos cepas de *H. uvarum*. En el Anexo 1 se incluye la comparación de los electroferogramas obtenidos con los pares de oligonucleótidos Q y J, de estas cuatro levaduras, que también permiten identificar dos perfiles diferentes y por tanto corrobora la presencia de dos cepas distintas.



**Figura 15. Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *H. uvarum*.** Comparación de electroferogramas obtenidos con los pares de oligonucleótidos H y S de 4 aislados de *H. uvarum*: Hu A a Hu D. Los alelos AFLP comunes a todas las cepas se indican con flechas verdes (→); Los alelos AFLP diferenciales entre cepas se indican con flechas rojas (→).

La comparación de los electroferogramas obtenidos con los 11 aislados analizados de *M. pulcherrima* permitió detectar dos perfiles diferentes con los pares de oligonucleótidos H, M, N y G, tres con el par de oligonucleótidos Q y cuatro con los pares de oligonucleótidos J y S. El análisis permitió identificar alelos AFLP presentes en todos los aislados de *M. pulcherrima* y otros que únicamente estaban presentes en algunos de ellos. En la Figura 16 se

muestran algunos de los detectados con los pares de oligonucleótidos Q y J (marcados con el fluoróforo HEX) y en el Anexo 1 se incluyen algunos de los obtenidos con los oligonucleótidos H y S, marcados con el fluoróforo FAM. El análisis global de los datos permitió diferenciar cuatro cepas indígenas diferentes de *M. pulcherrima*.



**Figura 16. Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *M. pulcherrima*.** Comparación de electroferogramas obtenidos con los pares de oligonucleótidos Q y J de 11 aislados de *M. pulcherrima*: Mp A a Mp K. Los alelos AFLP comunes a todas las cepas se indican con flechas verdes (→); Los alelos AFLP diferenciales entre cepas se indican con flechas rojas (→).

En el caso de *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii*, de los seis y tres aislados analizados respectivamente, se pudieron diferenciar dos cepas con los oligonucleótidos S y J. La única especie de la que sólo se caracterizó una cepa fue *P. anomala*, independientemente del par de oligonucleótidos utilizados. En cuanto a los 16 aislados de las dos especies del género *Saccharomyces*, se pudieron diferenciar dos cepas de *S. uvarum* con los pares de oligonucleótidos Q, J, M y S y dos cepas de *S. cerevisiae* con los pares de oligonucleótidos Q, J y S.

**Tabla 12. Número de cepas identificadas de las especies analizadas en función al par de oligonucleótidos utilizado para obtener los AFLP.**

| Levadura                 | Par de oligonucleótidos |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------|-------------------------|---|---|---|---|---|---|
|                          | J                       | M | N | Q | G | H | S |
| <i>M. pulcherrima</i>    | 4                       | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| <i>L. thermotolerans</i> | 2                       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| <i>H. uvarum</i>         | 2                       | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| <i>T. delbrueckii</i>    | 2                       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| <i>P. anomala</i>        | 1                       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>S. cerevisiae</i>     | 2                       | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| <i>S. uvarum</i>         | 2                       | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |

Como resultado global del análisis realizado con 43 levaduras indígenas y siete pares de cebadores, se han podido diferenciar 15 cepas de levadura pertenecientes a siete especies diferentes (Tabla 12), pudiendo concluir que el empleo de los marcadores moleculares AFLP permite una destacable discriminación de cepas en los aislados seleccionados.

### IV.3. BASE DE DATOS DE MARCADORES AFLP DE LEVADURAS VÍNICAS

Los resultados previamente expuestos demuestran la alta capacidad de discriminación de los marcadores AFLP y de ahí su interés en utilizarlos como herramienta para la caracterización molecular de levaduras vínicas. Uno de los objetivos de este trabajo era el desarrollo de un procedimiento rápido y

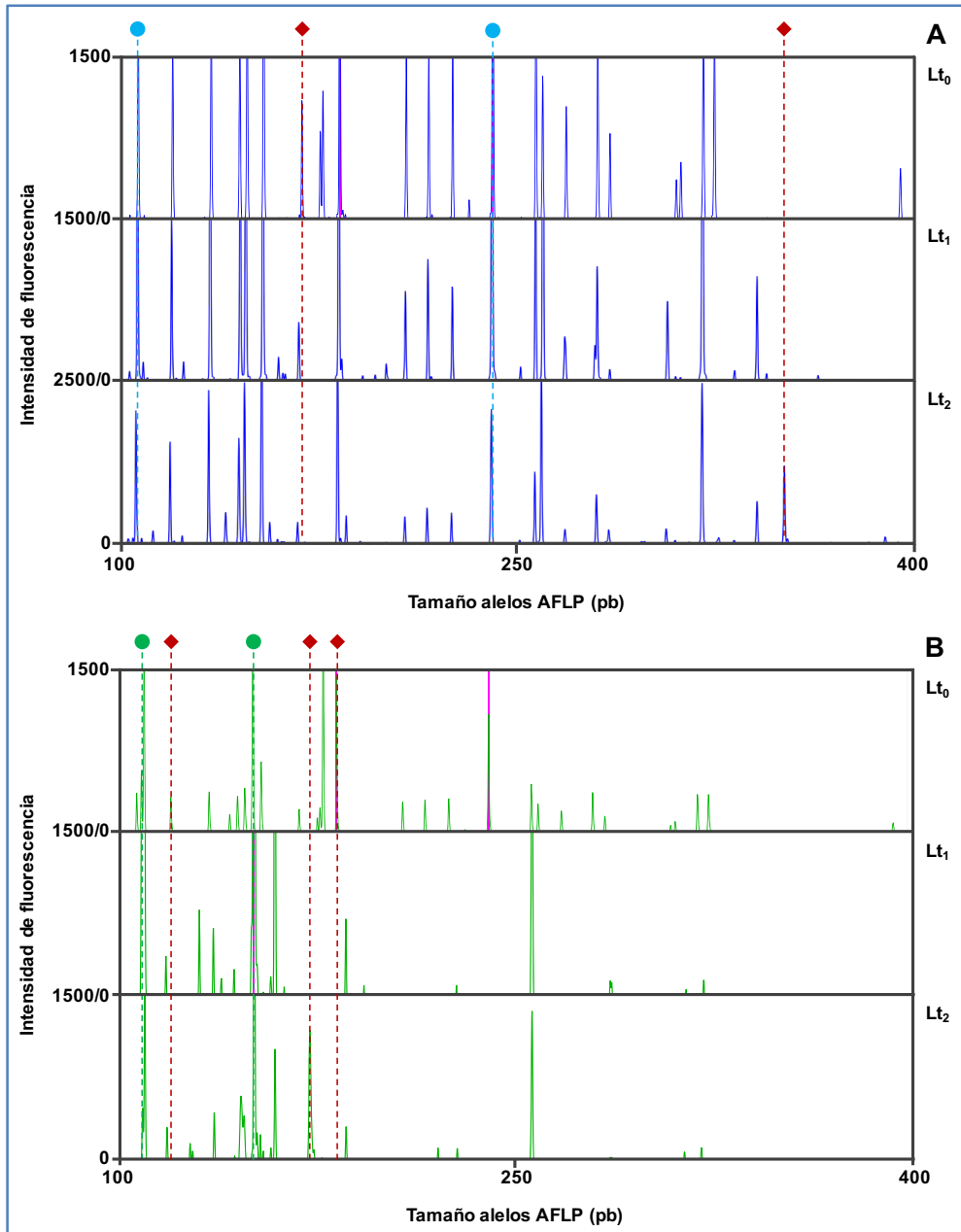
---

---

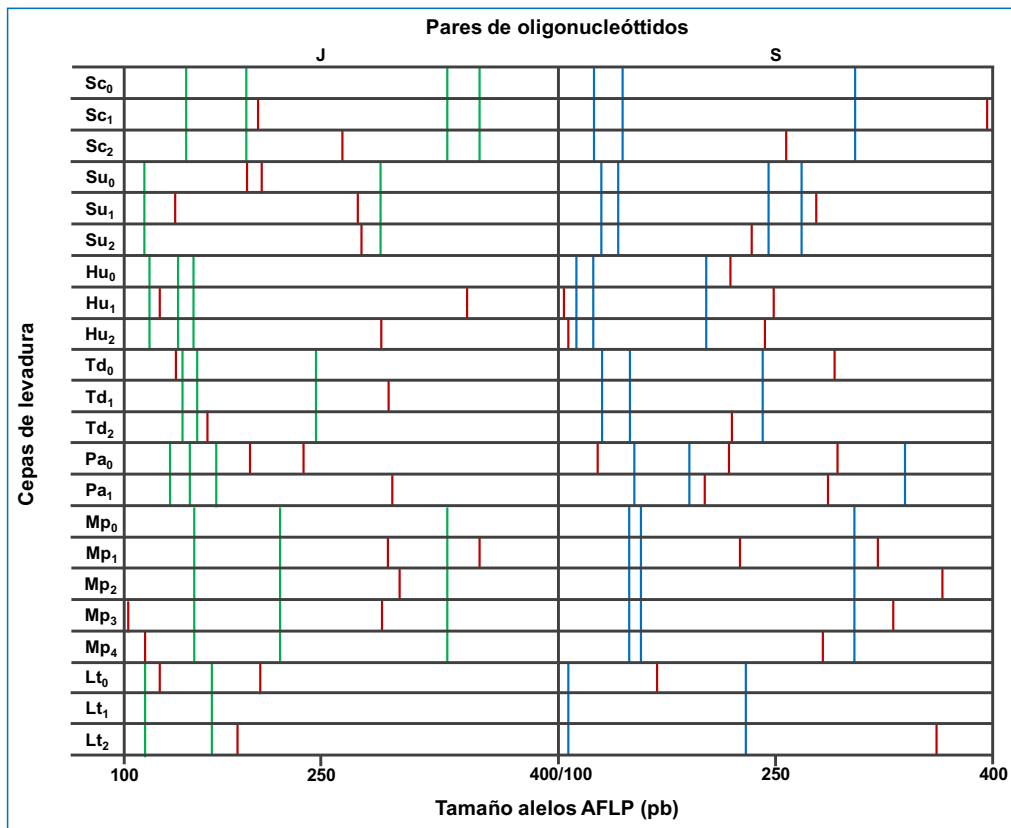
eficaz para caracterizar las levaduras presentes en muestras complejas como el hollejo de las uvas o el mosto. Para ello, se ha generado una base de datos de alelos AFLP que incluye los alelos específicos de las 7 especies y las 15 cepas de levadura que se han identificado en este trabajo utilizando los cebadores S y J, es decir, aquellos que únicamente se identificaron en los electroferogramas de muestras de una misma especie o cepa. Se seleccionaron los alelos obtenidos con estos dos cebadores por ser los que mostraron una mayor complejidad y variabilidad en los perfiles AFLP, y en consecuencia un mayor grado de discriminación entre cepas.

Con el fin de validar la base de datos generada en base a los alelos seleccionados, se obtuvo el patrón AFLP de las levaduras tipo utilizadas como control en los análisis previos de identificación molecular (ITS y D1/D2), utilizando los cebadores S y J. Se analizaron las levaduras comerciales *S. cerevisiae* (ES42) y *L. thermotolerans* (CH Kt 421 CHR-HANSEN), además de otras levaduras procedentes de la colección española de cultivos tipo: *S. uvarum* CECT12641, *H. uvarum* CECT12946, *M. pulcherrima* CECT12825, *T. delbrueckii* CECT12698 y *P. anomala* CECT12765.

A modo de ejemplo, en la Figura 17 se muestra el resultado obtenido al comparar los electroferogramas S y J de dos cepas indígenas de *L. thermotolerans* ( $L_{t_1}$  y  $L_{t_2}$ ) con la cepa comercial *L. thermotolerans* (CH Kt 421 CHR-HANSEN) denominada  $L_{t_0}$ . Las comparaciones realizadas con el resto de levaduras se muestran en el Anexo 2. Este análisis ha permitido determinar los alelos AFLP comunes únicamente entre todas las cepas de una misma especie y los que están presentes exclusivamente en alguna de las cepas analizadas. Tras el análisis comparativo realizado con las levaduras vínicas estudiadas en el presente trabajo en base a los cebadores S y J, se pudieron establecer un total de 14 perfiles específicos de especie y 44 específicos de cepa. Estos perfiles específicos representados como códigos de barras se muestran en la Figura 18 y constituyen la base para la identificación de levaduras vínicas en base a su huella molecular AFLP.



**Figura 17. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores  $\underline{S}$  y  $\underline{J}$  de tres cepas de *L. thermotolerans*. Cepas: una control ( $Lt_0$ ) y dos indígenas ( $Lt_1$  y  $Lt_2$ ). Cebadores:  $\underline{S}$  (A) y  $\underline{J}$  (B). (●) Alelos AFLP específicos de especie obtenidos con el cebador  $\underline{S}$ ; (●) Alelos AFLP específicos de especie obtenidos con el cebador  $\underline{J}$ ; (◆) Alelos AFLP específicos de cepa obtenidos con el cebador  $\underline{S}$  o  $\underline{J}$ .**



**Figura 18. Representación esquemática de los perfiles AFLP específicos de especie y cepa de levadura obtenidos con los cebadores S y J.** Alelos AFLP específicos de especie (verde/azul) y específicos de cepa (rojo). Especies de levaduras: *S. cerevisiae* (Sc), *S. uvarum* (Su), *H. uvarum* (Hu), *T. delbrueckii* (Td), *P. anomala* (Pa), *M. pulcherrima* (Mp) y *L. thermotolerans* (Lt). El subíndice 0 indica la levadura tipo usada como control y 1 a 4 diferentes cepas indígenas.

La identificación de muestras desconocidas haciendo uso de la base de datos se fundamenta en el empleo de los datos numéricos que proporciona el programa *GeneMapper* referentes a los alelos AFLP presentes en los electroferogramas (tamaño de los alelos e intensidad de fluorescencia entre otros). Estos datos son incluidos en una hoja de cálculo dinámica y comparados con los alelos AFLP de la base de datos, empleando un algoritmo comparativo que asigna un valor 1, cuando un alelo de la muestra coincide con un alelo de un perfil de la base de datos, y un 0 cuando no existe similitud. La resolución de la matriz que se genera de unos y ceros se expresa como

un porcentaje de similitud entre 0 y 100% entre la muestra problema y cada uno de los perfiles incluidos en la biblioteca. Una similitud del 100% indica que todos los alelos específicos de una especie o cepa de levadura están presentes en la muestra y por lo tanto puede confirmarse la presencia de esta levadura. Un porcentaje de similitud inferior al 50% se relaciona con la ausencia de dicha levadura en la muestra. Para asegurar una detección precisa, cuando el porcentaje es inferior al 100%, pero superior al 50%, los electroferogramas son verificados manualmente para asegurar la presencia (o ausencia) de los alelos concretos, tal como se describe en el Apartado III.4.2.3 (Sección Materiales y Métodos). Únicamente se confirma la presencia de una levadura en una muestra cuando todos los alelos específicos de especie y/o cepa se detectan inequívocamente.

Para verificar la eficacia del algoritmo utilizado, se analizaron por este procedimiento el resto de levaduras previamente caracterizadas mediante ITS-RFLP y secuenciación de la región D1/D2 (Apartado IV.2.1 de la presente Sección). Los perfiles AFLP obtenidos de estos aislados se incluyeron en la hoja dinámica como muestra problema para su comparación con aquellos incluidos en la base de datos. De este modo se reconfirmó la identidad de estas levaduras y todas ellas se pudieron identificar con alguna de las cepas detectas. Por tanto, se pudo concluir que no se aislaron más cepas de las ya identificadas y que el uso del algoritmo y la base de datos es preciso y fiable. Asimismo, para corroborar la capacidad de discriminación de la herramienta, se analizaron cuatro especies de levadura vinculadas con características aromáticas no deseables en el vino: *Dekkera bruxillensis* CECT12005, *Picchia membranifaciens* CECT1115, *Zygosaccharomyces bailli* CECT 11042 y *Zygosaccharomyces rouxi* CECT 11121. En todos los casos el resultado obtenido tras la incorporación de los valores numéricos de los electroferogramas S y J en la base de datos fue de un 0% de similitud como era de esperar. Estos datos sirven para validar la especificidad de la base de datos generada.

---

---

Una vez comprobada la especificidad y fiabilidad de la información almacenada en la base de datos de alelos AFLP generada, se planteó la posibilidad de utilizarla para la identificación directa de las levaduras presentes en muestras complejas como el mosto de uva, sin la necesidad de un aislamiento previo de las levaduras mediante cultivo microbiológico.

#### **IV.4. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN MUESTRAS COMPLEJAS**

La base de datos AFLP previamente descrita, se ha mostrado que es de utilidad para la identificación de levaduras previamente aisladas. Con el fin de dar un uso adicional a esta herramienta, nos planteamos analizar su utilidad en la identificación de levaduras presentes en muestras de mosto sin necesidad de cultivos microbiológicos. Esta aplicación permitiría conocer las poblaciones de levaduras presentes en el mosto antes o durante la fermentación, información muy relevante para los enólogos ya que les permitiría predecir y/o adecuar el mosto para que el proceso fermentativo se desarrolle adecuadamente. Para poder aplicar esta metodología al objetivo plantado lo primero que se hizo fue determinar el límite de detección de la técnica.

##### **IV.4.1. Límite de detección de la técnica AFLP**

Para establecer el nivel de sensibilidad de la técnica en muestras con más de un tipo de levaduras, se aplicó el método de obtención de AFLP previamente descrito a muestras preparadas en el laboratorio, en las que se mezclaron células o ADN purificado de diferentes especies de levaduras.

###### **IV.4.1.1. Límite de detección con combinaciones de células**

Se prepararon 12 muestras en las que se mezclaron cinco de las levaduras con mayor presencia durante las tres vendimias analizadas: *S. cerevisiae* ( $Sc_1$ ), *L. thermotolerans* ( $Lt_1$ ), *M. pulcherrima* ( $Mp_3$ ), *P. anomala* ( $Pa_1$ ) y *T. delbrueckii* ( $Td_1$ ). La concentración final de levaduras en cada muestra estuvo comprendida entre  $1 \cdot 10^3$  y  $1 \cdot 10^8$  células/mL y las mezclas

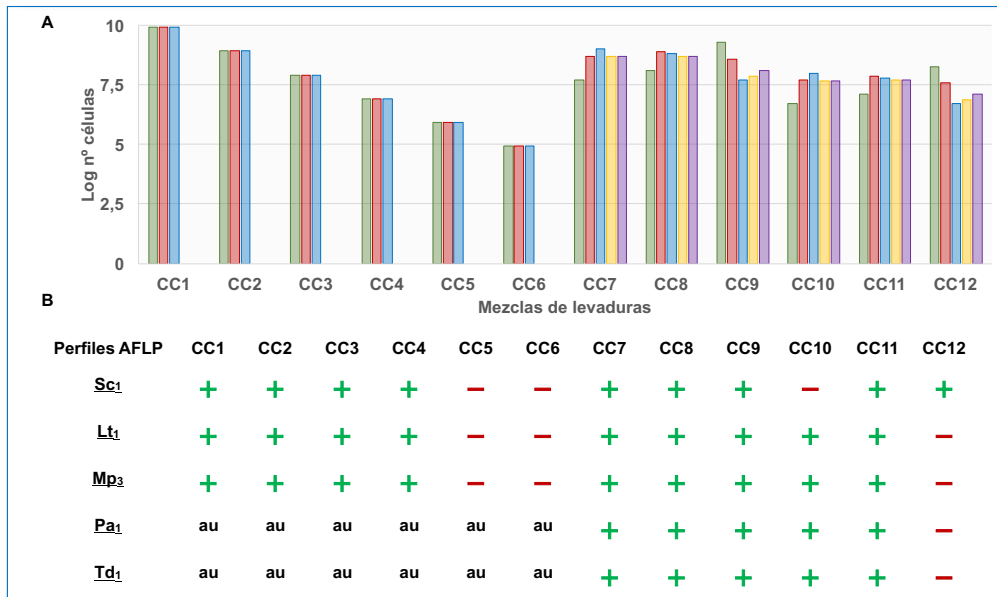
se hicieron variando tanto el número de cepas (3 o 5) como su concentración (entre  $8,3 \cdot 10^4$  y  $8,3 \cdot 10^9$  células) (Figura 19A). Las muestras CC1 a CC6 incluyen únicamente tres levaduras mientras que las muestras CC7 a CC12 simulan la heterogeneidad habitual en muestras de mosto recogidas durante la fermentación: días 1 a 3 (CC7 y CC10), días 3 a 5 (CC8 y CC11), últimos días (CC9 y CC12). El objetivo en todos los casos es determinar la mínima cantidad de células que permiten su detección en muestras complejas.

El ADN total de todas las muestras se purificó utilizando el kit *MasterPure™ DNA Purification* de Epicentre. Se obtuvieron concentraciones de ADN comprendidas entre  $8.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (CC1) y  $8.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (CC5). En la muestra CC6 no se pudo cuantificar el ADN obtenido debido a la baja concentración de levaduras en la muestra.

Para obtener los AFLP se utilizó  $1 \mu\text{l}$  del ADN purificado como molde, de modo que la concentración de ADN de partida variaba en cada caso. Los electroferogramas obtenidos con los oligonucleótidos S y J, se compararon con la base de datos AFLP previamente generada utilizando el algoritmo de comparación descrito en el Apartado IV.3.2 de Resultados. En la Figura 19B se muestran los resultados obtenidos, pudiéndose apreciar que la identificación de las cepas *S. cerevisiae* ( $Sc_1$ ), *M. pulcherrima* ( $Mp_3$ ) y *L. thermotolerans* ( $Lt_1$ ) fue positiva en las mezclas CC1, CC2, CC3 y CC4, en las que el número de células de cada levadura estaba por encima de las  $8,6 \cdot 10^6$  células. En las combinaciones CC1 y CC2 se obtuvo un 100% de similitud para las tres levaduras presentes, mientras que en las combinaciones CC3 y CC4 el porcentaje de similitud de  $Mp_3$  fue del 67% y del 75% para  $Lt_1$  en CC4. En las muestras en las que el número de células estaba por debajo de  $1,6 \cdot 10^6$ , el porcentaje de similitud era menor al 50% y por lo tanto no se podía asegurar su detección (combinaciones CC5 y CC6).

En las muestras preparadas con 5 levaduras diferentes, la detección de todas ellas fue posible cuando el número de células utilizado era superior a  $1 \cdot 10^7$  células (CC7, CC8, CC9 y CC11). Por ejemplo, en la combinación

CC10, con menos de  $1 \cdot 10^7$  células del género *Saccharomyces* (Figura 18A y B), sólo pudieron detectarse las cepas presentes de los géneros no-*Saccharomyces*, aunque con porcentajes de similitud inferiores al 100%:  $Lt_1$  (75%),  $Mp_3$  (67%),  $Pa_1$  (64%) and  $Td_1$  (71%). Lo contrario ocurre en la combinación CC12 (Figura 19A y B), en la que todas las levaduras de géneros no-*Saccharomyces* están en cantidades inferiores a  $1 \cdot 10^7$  células, excepto la cepa  $Lt_1$  de *L. thermotolerans* ( $3,7 \cdot 10^7$  células), mientras que de  $Sc_1$  se adicionaron  $1,88 \cdot 10^8$  células. En este caso el porcentaje de similitud para las levaduras no-*Saccharomyces* estaba por debajo del 50% y únicamente se detectó  $Sc_1$  con un 100% de similitud. La concentración de *L. thermotolerans* ( $Lt_1$ ) en la muestra era suficiente para ser detectada, pero el resultado negativo obtenido puede estar indicando una menor eficiencia en la purificación de ADN de levaduras de los géneros no-*Saccharomyces* frente a *S. cerevisiae*.



**Figura 19. Representación gráfica de las combinaciones de levaduras realizadas para el estudio del límite de detección y resultado del análisis. A:** representación gráfica; **B:** resultado de la comparación de los electroferogramas obtenidos de las combinaciones de levaduras con la base de datos de patrones AFLP. Levaduras empleadas:  $Sc_1$  (●);  $Lt_1$  (●);  $Mp_3$  (●);  $Pa_1$  (●);  $Td_1$  (●). Levadura detectada (+); levadura no detectada (-); levadura ausente (au).

#### IV.4.1.2. Límite de detección con combinaciones de ADN

Con la intención de determinar si el método de extracción de ADN era un factor limitante o presentaba una eficiencia diferente en función de la especie de levadura, se prepararon 12 muestras en las que se mezclaron diferentes cantidades de ADN previamente purificado de cada una de las levaduras utilizadas en el experimento anterior (Figura 20A). Las concentraciones de ADN finales de las diferentes muestras fue de 75, 150 ó 300 ng/ $\mu$ L y se utilizó un microlitro de ADN de cada muestra (entre 3 y 100 ng de ADN de cada levadura) para obtener los AFLP con los oligonucleótidos S y J. Los productos obtenidos se compararon con la base de datos generada en este trabajo y el resultado de la identificación se muestra en la Figura 20B.

En conjunto se puede concluir que una concentración de ADN superior a los 40 ng/ $\mu$ L es suficiente para detectar las levaduras presentes en las muestras analizadas con un 100% de fiabilidad ( $Lt_1$ ,  $Mp_3$  y  $Sc_1$  en las muestras CD1 y CD2) (Figura 20B). En la muestra CD3 con una concentración de ADN de 30 ng/ $\mu$ L y tres levaduras diferentes, únicamente  $Sc_1$  se pudo detectar con un 100% de similitud, mientras que  $Lt_1$  y  $Mp_3$  se detectaron con un 75 y un 78% de similitud respectivamente. En las muestras CD4 a CD6, con concentraciones de ADN comprendidas entre 37,5 y 75 ng/ $\mu$ L, se detectaron todas las levaduras presentes ( $Lt_1$ ,  $Mp_3$  y  $Sc_1$ ), aunque  $Mp_3$  con un porcentaje de similitud del 67% en lugar del 100% como el resto. Sin embargo, cuando la concentración de ADN de cualquier levadura estaba por debajo de los 20 ng/ $\mu$ L no era posible su detección: *L. thermotolerans* en muestras CD7 y CD9, *M. pulcherrima* en CD7 y CD8 y *S. cerevisiae* en CD8 y CD9.

En las muestras con ADN de cinco levaduras diferentes (CD10, CD11 y CD12) la detección de *S. cerevisiae* ( $Sc_1$ ) no fue posible en CD10 (3 ng/ $\mu$ L), pero si lo fue en CD11 (7,5 ng/ $\mu$ L) y CD12 (112,5 ng/ $\mu$ L) con porcentajes de similitud del 78 y 100% respectivamente. En cuanto a las especies no-*Saccharomyces*,  $Lt_1$ ,  $Mp_3$ ,  $Td_1$  y  $Pa_1$ , se detectaron con un 100% de similitud

en CD11, donde las concentraciones de su DNA estaban comprendidas entre 30 y 45 ng/μL. Sin embargo, en CD10, donde las concentraciones empleadas variaron entre los 28,5 y los 60 ng/μL, se obtuvieron porcentajes de similitud del 71% para Mp<sub>3</sub>, del 89% para Td<sub>1</sub> y del 73% para Pa<sub>1</sub>. En la muestra CD12 (3 a 22,5 ng/μL) no fue posible la identificación de ninguna de las cuatro cepas.



**Figura 20. Gráfico de las combinaciones de ADN de levaduras analizadas para el estudio del límite de detección y resultado del análisis. A:** gráfico de las combinaciones; **B:** resultado de la comparación de los electroferogramas obtenidos de las combinaciones de levaduras con la base de datos de patrones AFLP. Levaduras empleadas: Sc<sub>1</sub> (●); Lt<sub>1</sub> (●); Mp<sub>3</sub> (●); Pa<sub>1</sub> (●); Td<sub>1</sub> (●). Levadura detectada (+); levadura no detectada (-); levadura ausente (au).

La eficiencia en la purificación de ADN empleando métodos tradicionales es de 100 ng por 10<sup>7</sup> células de *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos indican que para una identificación eficiente de levaduras empleando el método AFLP previamente descrito, se necesitan entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> células de levadura por muestra. Estos resultados concuerdan con los experimentos llevados a cabo con mezclas de ADN purificado, en los que se ha

determinado que la mínima cantidad de ADN requerida para una detección efectiva de levaduras empelando este método oscila entre 25 y 30 ng. En el caso de *S. cerevisiae* esta cantidad de ADN se puede obtener a partir de  $3 \cdot 10^6$  células. En el caso de levaduras no-*Saccharomyces*, para una detección eficiente el número necesario de células asciende a  $10^7$  posiblemente debido a una menor eficiencia en la purificación de ADN. Teniendo en cuenta estos datos y aplicándolos al método descrito en el que se parte de 25 mL de mosto fermentado, puede concluirse que el límite de detección del método oscila entre  $1,2 \cdot 10^5$  y  $4 \cdot 10^5$  células/mL para levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* respectivamente.

#### IV.4.2. Identificación de levaduras en muestras de mosto

Una vez establecido el procedimiento y determinado el límite de detección de la técnica, nos planteamos aplicar el método de obtención de AFLP a muestras de mosto en diferentes estadios de fermentación con el fin de identificar las levaduras presentes. Para ello se seleccionaron 24 muestras de mosto recogidas de diferentes pagos durante las vendimias estudiadas (Tabla 13). El mosto fermentado es un medio bastante complejo que no reúne las condiciones idóneas para una eficiente purificación de ácidos nucleicos. Por ello, las muestras se sometieron al tratamiento descrito en el apartado III.4.1 de la Sección Materiales y Métodos, con el fin de eliminar todos aquellos componentes del mosto que pudieran interferir negativamente en la purificación de ADN.

Las muestras de mosto utilizadas en este análisis ya habían sido empleadas para el aislamiento e identificación de levaduras indígenas siguiendo los procedimientos previamente explicados en este trabajo, por lo que fueron empleadas como controles en este análisis. Asimismo, cabe destacar que los mostos M18, M19, M23 y M24 corresponden a mezclas de dos o tres mostos de los cuales se habían aislado las levaduras presentes en el día 2 del proceso fermentativo, pero no en el día 5 ó 10 como se hizo con los otros 20 mostos. En todos los casos se partió de 150 ng de ADN purificado

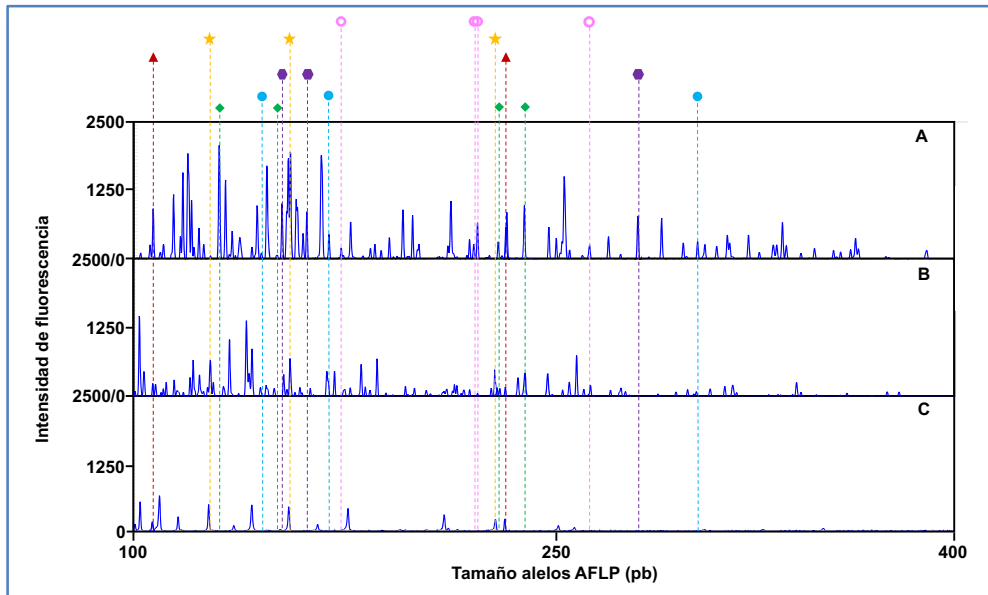
de las levaduras totales del mosto para la obtención de los AFLP con los pares de oligonucleótidos S y J. Como cabía esperar, los electroferogramas obtenidos mostraron una mayor complejidad que aquellos que se obtuvieron de levaduras individuales, y el número y cantidad de alelos AFLP obtenidos en cada uno de ellos, variaba en función de la muestra analizada.

**Tabla 13. Mostos utilizados para la identificación de levaduras mediante AFLP.** Las muestras de mosto de un mismo origen se delimitan por colores; la escala de grises hace referencia al día de la fermentación: días 2 a 3 (**negro**), días 5 a 8 (**gris oscuro**), días 10 a 15 (**gris medio**), días 19 a 21 (**gris claro**).

| Mostos analizados |                |     |               |                |     |               |   |     |
|-------------------|----------------|-----|---------------|----------------|-----|---------------|---|-----|
| Vendimia 2010     |                |     | Vendimia 2011 |                |     | Vendimia 2012 |   |     |
| Mosto             | Pago           | Día | Mosto         | Pago           | Día | Mosto         | Pago                                    | Día |
| M1                | Valdubón       | 2   | M9            | Nave Espaldera | 2   | M17           | Hoyo Félix                              | 5   |
| M2                |                | 5   | M10           |                | 7   | M18           | Rubial +<br>Desecados                   | 10  |
| M3                |                | 15  | M11           |                | 21  | M19           |   | 21  |
| M4                |                | 22  | M12           | Lobera         | 10  | M20           |   | 3   |
| M5                | Desecadas      | 5   | M13           | Hoyo Aurella   | 2   | M21           | Vega Arriba<br>Cercadillo               | 8   |
| M6                | Nave Espaldera | 2   | M14           |                | 10  | M22           |   | 19  |
| M7                | San Juan       | 15  | M15           | Estocada       | 10  | M23           | Desecados +<br>Nave Vaso +<br>Peñaranda | 5   |
| M8                | Cañada Angosta | 2   | M16           |                | 21  | M24           |   | 15  |

En la Figura 21 se presenta la comparación de los electroferogramas obtenidos con el par de cebadores S, a partir de tres muestras de mosto (M9, M10, M11) de la vendimia de 2011 del pago Nave Espaldera (Tabla 13). Se puede ver como la complejidad de alelos varía en función de la muestra, siendo la muestra más compleja la del mosto M9 (día 2) y la menos compleja la de M11 (día 21). Por lo tanto, la variación en la población de levaduras a lo largo del proceso fermentativo se corresponde con cambios apreciables en el perfil de alelos AFLP. En la muestra M9 se identificaron cinco especies de levadura: *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *P. anomala*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (Figura 21A, Tabla 14). En M10 se detectó *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* y en M11 únicamente *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. Además, se puede apreciar que la intensidad de los alelos que se obtienen decrece a medida que el mosto se encuentra en un estado más avanzado de fermentación, siendo muy baja su intensidad en M11 (día21) (Figura 21C). Este hecho podría deberse al engrosamiento de las paredes celulares de las levaduras y/o al mal estado intracelular de las mismas por las

condiciones presentes en el mosto en los estadios finales del proceso fermentativo, lo que podría repercutir en una peor calidad del ADN obtenido.



**Figura 21. Comparación de electroferogramas obtenidos de tres muestras de mosto recogidas los días 2 (M9), 7 (M10) y 21 (M11) de la fermentación.** Los símbolos y líneas indican los alelos AFLP específicos de especie: *M. pulcherrima* (●), *P. anomala* (●), *T. delbrueckii* (◆), *L. thermotolerans* (▲) y *S. cerevisiae* (★). Los alelos huérfanos también se indican (○). **A:** mosto M9; **B:** mosto M10; **C:** mosto M11.

Los alelos no resaltados en los electroferogramas de la Figura 21, son alelos inespecíficos presentes en las especies identificadas. Sin embargo, aparecen alelos que no se han podido asignar a ninguna de las levaduras previamente identificadas. Estos alelos se han denominado alelos huérfanos y se han identificado ocho en diferentes muestras de mosto correspondientes a los primeros días de la fermentación, como los cuatro señalados en la Figura 21 (○). Este hecho, podría indicar que existen en el mosto otras levaduras que no han podido ser identificadas en este trabajo debido, tal vez, a las técnicas empleadas para el crecimiento de microorganismos, o sencillamente no fueron elegidas durante la selección aleatoria de colonias crecidas en las placas de cultivo (Apartado IV.1, Sección de Resultados).

**Tabla 14. Especies y cepas de levaduras identificadas mediante la técnica AFLP en las muestras de mosto analizadas.** Las muestras de mosto de un mismo origen se delimitan por colores; la escala de grises hace referencia al día de la fermentación: días 2 a 3 (**negro**), días 5 a 8 (**gris oscuro**), días 10 a 15 (**gris medio**), días 19 a 21 (**gris claro**); levadura detectada (+); levadura no detectada (-).

| Muestras de mosto | Perfiles AFLP   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                   | Sc <sub>1</sub> | Sc <sub>2</sub> | Su <sub>1</sub> | Su <sub>2</sub> | Lt <sub>1</sub> | Lt <sub>2</sub> | Mp <sub>1</sub> | Mp <sub>2</sub> | Mp <sub>3</sub> | Mp <sub>4</sub> | Hu <sub>1</sub> | Hu <sub>2</sub> | Pa <sub>1</sub> | Td <sub>1</sub> | Td <sub>2</sub> |
| M1                | -               | -               | -               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | +               |
| M2                | +               | -               | -               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | -               |
| M3                | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M4                | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M5                | +               | +               | -               | -               | +               | +               | +               | -               | +               | -               | +               | +               | -               | -               | -               |
| M6                | -               | -               | -               | -               | +               | +               | -               | +               | +               | -               | -               | +               | -               | -               | -               |
| M7                | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M8                | +               | +               | -               | -               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -               | -               | -               |
| M9                | -               | -               | -               | -               | +               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | +               | +               | +               |
| M10               | +               | -               | -               | -               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               |
| M11               | +               | -               | -               | -               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M12               | +               | -               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               |
| M13               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M14               | +               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M15               | +               | -               | -               | -               | +               | -               | -               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | +               | +               |
| M16               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M17               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | -               | -               | -               | +               | +               | +               |
| M18               | +               | +               | -               | -               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | -               | -               |
| M19               | +               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M20               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | +               | +               | -               | -               | -               | +               | -               | -               |
| M21               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | -               |
| M22               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |
| M23               | +               | -               | -               | -               | -               | +               | -               | +               | +               | -               | +               | -               | -               | -               | -               |
| M24               | +               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               |

Tras el análisis de los electroferogramas obtenidos de todas las muestras de mosto analizadas (Tabla 13) utilizando la base de datos AFLP generada, se ha determinado que en 18 de las 24 muestras se identificó a alguna de las dos cepas indígenas de *S. cerevisiae* previamente caracterizadas (Sc<sub>1</sub> y Sc<sub>2</sub>). La cepa Sc<sub>1</sub> fue identificada en seis de los mostos de 2010 (M2, M3, M4, M5, M7 y M8), seis de 2011 (M10, M11, M12, M14, M15 y M16) y siete de 2012 (M17, M18, M19, M21, M22, M23 y M24). Los porcentajes de similitud con el perfil de la base de datos oscilaron entre el 67 y el 100%, en función del estadio de la fermentación y de la procedencia del mosto. En lo que respecta a la cepa Sc<sub>2</sub> su abundancia resultó mucho menor, habiéndose detectado sólo en dos muestras de mosto de 2010 (M5 y M8) y tres de 2012 (M17, M18 y

M19), con un porcentaje de similitud del 100% en todos los casos. La otra especie del género *Saccharomyces* incluida en la base de datos, *S. uvarum*, fue detectada en seis de los mostos analizados con porcentajes de similitud comprendidos entre el 75 y el 100%. La cepa Su<sub>1</sub> se halló en un mosto de Lobera (M12) y otro de Hoyo Aurelia (M14), mientras que Su<sub>2</sub> sólo se identificó en el mostos M14 de Hoyo Aurelia (Tabla 14). Obsérvese que estas cuatro cepas (Sc<sub>1</sub>, Sc<sub>2</sub>, Su<sub>1</sub> y Su<sub>2</sub>) sólo se detectaron en muestras de mosto recogidas a partir del día 5 de fermentación. Este hecho no es extraño dado que durante los primeros días del proceso fermentativo son las levaduras de géneros no-*Saccharomyces* son las que dirigen la fermentación y por lo tanto son mucho más abundantes.

La heterogeneidad de especies no-*Saccharomyces* en el mosto se reducía al aumentar el tiempo de fermentación, hasta ser indetectables en las muestras de mosto de los últimos días del proceso (Tabla 14). *M. pulcherrima* es la especie que presentó una mayor diversidad con cuatro cepas indígenas (Mp<sub>1</sub>, Mp<sub>2</sub>, Mp<sub>3</sub> y Mp<sub>4</sub>) que se pudieron identificar juntas en una de las muestras (mostos M8, Cañada Angosta de 2010), con porcentajes de homología que oscilaron entre el 75 y el 100%. También se reconocieron todas las cepas, a excepción de Mp<sub>4</sub>, en el mosto M20 (Vega Arriba Cercadillo de 2012) con porcentajes de similitud de entre el 63 y el 100%. En otros mostos se identificaron dos de las cepas: Mp<sub>1</sub>/Mp<sub>2</sub> en M9 y M13, Mp<sub>1</sub>/Mp<sub>3</sub> en M5 y Mp<sub>2</sub>/Mp<sub>3</sub> en M6, M15 y M23, siempre con similitudes de homología que oscilaron entre el 75 y el 100%. La única cepa identificada individualmente en un mosto fue Mp<sub>2</sub> en M17 (Hoyo Félix 2012).

En cuanto a la especie *L. thermotolerans*, la cepa Lt<sub>1</sub> se detectó más frecuentemente que Lt<sub>2</sub>, identificada sólo en las muestras de mosto M1, M2, M5, M6, M8 y M23, con un porcentaje de similitud del 100% en los cinco casos. La cepa Lt<sub>1</sub> se detectó en otras trece muestras analizadas (M1, M2, M5, M6, M8, M9, M10, M11, M15 y M18).

---

---

La cepa Hu<sub>1</sub> de *H. uvarum*, se detectó conjuntamente con Hu<sub>2</sub> en la muestra de mosto de Desecados (M5) y Cañada Angosta 2010 (M8). En los mostos M6 (Nave Espaldera 2010) y M18 (Rubial+Desecados 2012) se identificó sólo Hu<sub>2</sub>, y en M23 (Desecados+Nave Vaso+Peñaranda 2012) se detectó Hu<sub>2</sub>. La cepa Hu<sub>1</sub> fue identificada con porcentajes de similitud del 100%, mientras que los de Hu<sub>2</sub> oscilaron entre el 67 y el 100%.

Respecto a *P. anomala*, esta levadura se detectó en dos muestras de la vendimia de 2010 (M1 y M2), en una de 2011 (M9) y en tres de la de 2012 (M17, M20 y M21), con un porcentaje de homología del 100% en los seis casos.

Las cepas Td<sub>1</sub> y Td<sub>2</sub> de *T. delbrueckii* se identificaron conjuntamente en los pagos de Nave Espaldera (M9), Estocada (M15) y Hoyo Félix (M17). La cepa Td<sub>1</sub> fue identificada individualmente en la muestra M12 del los pago Lobera de 2011, mientras que la cepa Td<sub>2</sub> se detectó en muestras de los pagos Valdubón 2010 (M1) y Nave Espaldera 2011 (M10). En todos los casos los porcentajes de similitud obtenidos al comparar las muestras de mosto con los patrones de la base de datos, oscilaron entre el 71 y el 100%.

La variabilidad de cepas y especies de levadura identificadas mediante AFLP en los mostos estudiados, es coherente y concuerda con la identificación que se hizo previamente a partir de las colonias de levadura aisladas de cada uno de los mostos. Cabe destacar que habiéndose obtenido los mismos resultados, el tiempo empleado para la identificación directa a partir del ADN total de los mostos fue de 2-3 días, mientras que utilizando los métodos microbiológicos y moleculares clásicos el tiempo estimado era de 1-2 semanas.

Además, para asegurar que las levaduras identificadas eran las únicas presentes en los mostos analizados, se hizo una comparación de los perfiles AFLP de cada mosto con los perfiles AFLP completos de todas las levaduras caracterizadas. Esta comparación permitió identificar alelos en algunos de los

mostos que no estaban presentes en los perfiles AFLP de ninguna levadura. Concretamente, se identificaron ocho alelos independientes con un rango de tamaños de entre 130 y 280 pares de bases y más de 150 unidades de fluorescencia. Estos alelos se detectaron en los mostos Valdubón (M1, M2), Nave Espaldera (M6, M9), Cañada Angosta (M8), Hoyo Félix (M17) y Vega Arriba Cercadillo (M20), todos ellos recogidos antes del día 10 de fermentación y en distintos años. Este resultado podría indicar que en estos mostos hay mas levaduras de las que se han aislado y caracterizado en este trabajo. Esto no es de extrañar, ya que es bien sabido que el aislamiento de microorganismo por los métodos microbiológicos tradicionales no permite el crecimiento de algunos microorganismos, debido a que la condiciones de crecimiento utilizadas y /o los medios de cultivo no son los idóneos.

No obstante, teniendo en cuenta este hecho, se puede concluir que la cepa Sc<sub>1</sub> es la más habitual en todos los pagos analizados a lo largo de las tres vendimias, mientras que las especies menos habituales resultaron ser *H. uvarum*, que no se detectó en ninguna de las muestras analizadas de la vendimia de 2011, y *S. uvarum*, que únicamente fue identificada en tres de las muestras de 2011. De las levaduras no-*Saccharomyces*, la especie *M. pulcherrima* es la más ampliamente extendida, concretamente las cepas Mp<sub>1</sub> y Mp<sub>2</sub>, que se han detectado en 9 de los 16 pagos analizados. De las cepas de *L. thermotolerans* también se puede afirmar que son muy frecuentes, además de haberse podido identificar en muestras de mosto de los últimos días del proceso fermentativo, mientras que *P. anomala* es la menos frecuente. En relación a *T. delbrueckii* se pudo concluir que es más habitual la presencia de Td<sub>2</sub> en solitario, que de Td<sub>1</sub>.

Estos resultados nos permiten afirmar la eficacia de la base de datos AFLP generada, para la detección de levaduras indígenas en muestras de mosto sin necesidad de cultivo microbiológico. Hay que matizar que la aplicabilidad de esta técnica se restringe a laboratorios especializados por la minuciosidad de la técnica y que para ampliar su aplicabilidad a muestras de cualquier

---

---

origen, es necesario seguir ampliando la base de datos con levaduras vínicas indígenas procedentes de otras bodegas y regiones.

#### **IV.5. INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS INDÍGENAS EN EL AROMA DEL VINO**

Una vez realizada la caracterización molecular mediante AFLP de las levaduras indígenas en estudio, el siguiente paso es analizar el potencial enológico de estas levaduras con el fin de seleccionar las cepas que influyan positivamente en el aroma del vino. Para el desarrollo de este estudio se ha contado en todo momento con los consejos y recomendaciones de la enóloga de la bodega *Díaz Bayo*, María Berzal, quien nos ha guiado en la selección de cepas a estudiar y en los análisis sensoriales de los vinos. El estudio se ha centrado en el análisis de algunos de los compuestos volátiles más relevantes en la percepción aromática de los vinos de la variedad *Tempranillo* como el octanoato de etilo (flores, albaricoque), hexanoato de etilo (piña, plátano) y acetato de isobutilo (grosella, jacinto rosa), entre otros. También se han analizado otros compuestos como el acetaldehído o el acetato de etilo, caracterizados por sus aromas desagradables a éter y barniz respectivamente.

Tras la vendimia de 2010, el vino de mayor intensidad y calidad aromática de la bodega *Díaz Bayo* fue el elaborado a partir de las uvas del pago Cañada Angosta. Este fue el motivo por el que el estudio se inició con las cepas de las levaduras indígenas caracterizadas de este pago: *L. thermotolerans* (Lt<sub>1</sub> y Lt<sub>2</sub>), *M. pulcherrima* (Mp<sub>1</sub>, Mp<sub>2</sub>, Mp<sub>3</sub> y Mp<sub>4</sub>), *H. uvarum* (Hu<sub>1</sub> y Hu<sub>2</sub>) y *S. cerevisiae* (Sc<sub>1</sub>). Para ello, se han realizado fermentaciones en el laboratorio con mosto estandarizado de uva de la variedad *Tempranillo* y diferentes combinaciones de levaduras indígenas.

##### **IV.5.1. Fermentaciones individuales**

Las primeras fermentaciones se hicieron en matraces de 100 mL con 50 mL de mosto de uva *Tempranillo* a 19,5 grados Brix. Se inocularon

---

---

individualmente  $1 \times 10^6$  células/mL de cada una de las levaduras de tipo no-*Saccharomyces* seleccionadas: Lt<sub>1</sub>, Lt<sub>2</sub>, Mp<sub>1</sub>, Mp<sub>2</sub>, Mp<sub>3</sub>, Mp<sub>4</sub>, Hu<sub>1</sub> y Hu<sub>2</sub>. Estas levaduras se caracterizan por una menor tolerancia al etanol que *S. cerevisiae* y, en consecuencia, una incapacidad para fermentar todos los azúcares presentes en el mosto. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 19 °C y se dieron por concluidas una vez se detuvo la producción “visible” de CO<sub>2</sub> en los matraces (burbujeo en el mosto tras la resuspensión de las levaduras), hecho que tuvo lugar en un intervalo de entre 4 y 10 días dependiendo de la levadura empleada (Materiales y Métodos, Apartado III.5). Finalizadas las fermentaciones, se tomaron muestras de 10 mL de mosto fermentado que se almacenaron a -20 °C hasta su análisis químico. Los 40 mL restantes se mantuvieron cerrados a 4 °C para conservar sus propiedades organolépticas hasta que se llevó a cabo el análisis sensorial.

En este caso el panel de cata valoró el color, aroma y sabor de los ocho mostos parcialmente fermentados siguiendo las indicaciones descritas en el Apartado III.6.1 (análisis sensorial) de la Sección de Materiales y Métodos, y sus conclusiones se resumen en la Tabla 15. En el caso de las fermentaciones llevadas a cabo con *M. pulcherrima*, únicamente la cepa Mp<sub>3</sub> fermentó parcialmente el mosto, originando aromas herbáceos y de fruta ácida característicos de los vinos tintos, lo que llevó a la fermentación FI3 a ser una de las mejor valoradas por el panel de cata (Tabla 15). Las dos cepas de *H. uvarum* (Hu<sub>1</sub> y Hu<sub>2</sub>) fermentaron parcialmente los azúcares del mosto, si bien la cepa Hu<sub>1</sub> (FI5) originó un exceso de ácido acético que enmascaraba completamente el aroma a frutos rojos, mientras que la cepa Hu<sub>2</sub> (FI6), generó un intenso aroma a barniz. Respecto a las fermentaciones con las cepas de *L. thermotolerans*, en ambos casos (FI7 y FI8) se pudo apreciar un intenso aroma a frutos rojos, característico de los vinos de la variedad *Tempranillo* de la D.O. Ribera del Duero. No obstante, había diferencias entre ambas fermentaciones, en el caso de FI7 (Lt<sub>1</sub>) el aroma a frutos rojos iba acompañado de una percepción a ácido acético (menor a la de FI5), mientras que en FI8 (Lt<sub>2</sub>) se percibía un aroma a confitura, lo que hizo que esta última fuera la fermentación mejor valorada por el panel de cata (Tabla 15). Estos

resultados preliminares permitieron afirmar que la presencia de unas u otras cepas de levadura de tipo no-*Saccharomyces* durante la primera etapa del proceso fermentativo, puede influir significativamente en el aroma secundario de los vinos.

**Tabla 15. Valoración de las fermentaciones individuales realizadas con levaduras indígenas de tipo no-*Saccharomyces* por el panel de cata.**

| Fermentación | Especie                  | Cepa | Color       | Aroma                      | Puntuación |
|--------------|--------------------------|------|-------------|----------------------------|------------|
| FI1          | <i>M. pulcherrima</i>    | Mp1  | Mora        | Mosto                      | 1          |
| FI2          |                          | Mp2  | Mora        | Mosto                      | 1          |
| FI3          |                          | Mp3  | Cereza      | Hierba/Fruta ácida         | 7          |
| FI4          |                          | Mp4  | Mora        | Tierra                     | 1,6        |
| FI5          | <i>H. uvarum</i>         | Hu1  | Mora/Cereza | Frutos rojos/Ácido acético | 6,4        |
| FI6          |                          | Hu2  | Mora        | Barniz                     | 2,6        |
| FI7          | <i>L. thermotolerans</i> | Lt1  | Cereza      | Frutos rojos/Ácido acético | 7          |
| FI8          |                          | Lt2  | Mora        | Frutos rojos/Confitura     | 7,4        |

Con el objetivo de poder correlacionar las valoraciones del panel de cata con la producción de compuestos volátiles concretos, se llevó a cabo el análisis químico de la fracción volátil de las ocho fermentaciones realizadas. Para ello, se tomaron 2 µL de cada mosto y se inyectaron en un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID), según se describe en el Apartado III.6.2.1 de la Sección Materiales y Métodos. Se analizaron seis compuestos volátiles elegidos por su relevancia en el perfil aromático de vinos tintos de la variedad *Tempranillo*. La identificación se hizo en base a los tiempos de retención relativos obtenidos con los seis patrones comerciales analizados: 1-propanol (1,668 minutos), acetaldehído (1,267 minutos), propionato de etilo (3,112 minutos), hexanoato de etilo (6,721 minutos), octanoato de etilo (9,218 minutos), y acetato de etilo (1,607 minutos), valores que están acordes con la estructura química de los compuestos.

Los resultados obtenidos se analizaron en base a la abundancia relativa de los compuestos analizados, calculada como el cociente entre la señal

cromatografía registrada de cada compuesto y la máxima señal obtenida del mismo. De esta manera, fue posible comparar la producción de estos seis compuestos en función de las diferentes levaduras analizadas (Figura 22).



**Figura 22. Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones individuales F11 a F18.**

Este análisis permitió detectar que el 1-propanol (aroma a fruta madura), único alcohol estudiado, no fue identificado en F17 ( $Lt_1$ ), mientras que en F11 ( $Mp_1$ ) su producción fue entre un 31 y un 65% mayor a la obtenida en las demás fermentaciones (Figura 22, **rosa**). No obstante, la fermentación F11 fue descrita por el panel de cata como pobre aromáticamente, como ya ha sido mencionado (Tabla 15). El acetaldehído, caracterizado por su aroma a manzana y hierba verde, presentó una producción similar en las fermentaciones F12, F13, F15 y F16, siendo al menos un 41% mayor a la obtenida en F11, F14, F17 y F18 (Figura 22, **amarillo**). De los tres ésteres analizados, el propionato de etilo (aromas a ron y piña) no presentó diferencias significativas ( $\leq 5\%$ ) en su producción entre las fermentaciones F11 a F14, realizadas por las diferentes cepas de *M. pulcherrima*, ni con F17

---

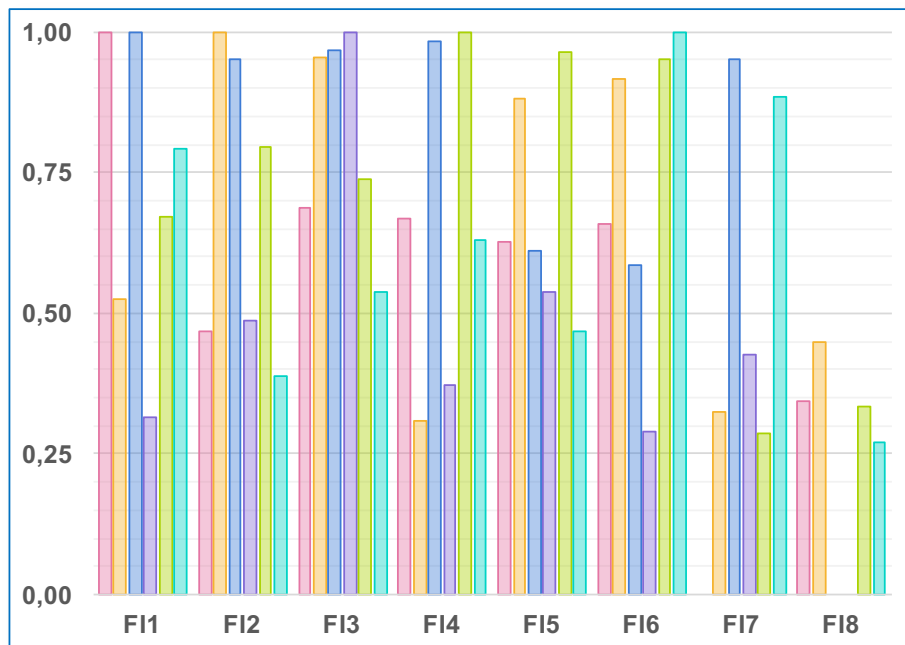
---

(Lt<sub>1</sub>). Sin embargo, no fue detectado en F18 (Lt<sub>2</sub>), una de las fermentaciones mejor valoradas por el panel de cata (Figura 22, azul). El hexanoato de etilo (aroma a piña y plátano) tampoco se detectó en F18, pero alcanzó una producción significativamente más elevada en F13 (Mp<sub>3</sub>) en relación a las otras fermentaciones (Figura 22, morado). En cuanto al octanoato de etilo (flores y suave aroma a albaricoque), se detectó en cantidades elevadas y similares en todas las fermentaciones excepto en las realizadas con *L. thermotolerans* (F17 y F18), en las que se cuantificó entre un 25 y un 72% por debajo del resto (Figura 22, verde). El último compuesto analizado fue el acetato de etilo (barniz y aromas suaves afrutados), registrándose su mayor producción en F16 (Figura 22, turquesa). Cabe destacar que esta fermentación fue valorada por el panel de cata con aromas a pegamento y barniz, representativos del acetato de etilo cuando está presente en concentraciones superiores a los 150 mg/L. Si bien, la diferencia en la producción relativa del compuesto con F17 (Lt<sub>1</sub>), la segunda con la producción más alta, es de un 12% y esta fermentación fue valorada positivamente por el panel de cata.

El análisis global de los resultados indican que la cepa Mp<sub>3</sub> (F13), destaca por la elevada producción de hexanoato de etilo (piña), cuya presencia es muy valorada en los vinos de calidad por sus notas aromáticas a piña y plátano. Las cepas Hu<sub>1</sub> (F15), Hu<sub>2</sub> (F16) y Mp<sub>4</sub> (F14), destacaron en la producción de octanoato de etilo, responsable en parte de la percepción a aromas florales y matices a albaricoque en el vino. Las levaduras Lt<sub>1</sub> (F17) y Lt<sub>2</sub> (F18) no influyen de manera destacable en la producción de ninguno de los seis compuestos estudiados. Además, cabe destacar que en la fermentación realizada por Hu<sub>2</sub> (F16), se registró la concentración más alta de acetato de etilo, compuesto vinculado a vinos de baja calidad, ya que en elevadas concentraciones (>150 mg/L) proporciona un fuerte olor a barniz o pegamento como el descrito en F16 (Hu<sub>2</sub>).

Para tener una visión global sobre la influencia de los compuestos analizados en la percepción aromática final, se representaron las

concentraciones relativas de todos los compuestos analizados en cada fermentación (Figura 23).



**Figura 23. Comparación de los perfiles de los compuestos volátiles analizados en las fermentaciones F11 a F18 en base a su producción relativa.** Compuestos volátiles: 1-propanol (●), acetaldehído (●), propionato de etilo (●), hexanoato de etilo (●), octanoato de etilo (●) y acetato de etilo (●).

Se puede apreciar que la fermentación F13 (Mp<sub>3</sub>) es la única que presentó producciones elevadas de casi todos los compuestos analizados, sin embargo, la puntuación otorgada por el panel de cata (7) fue la misma que la de la fermentación F17 (Lt<sub>1</sub>), caracterizada por una menor producción de todos los compuestos analizados, a excepción del acetato de etilo, y por la ausencia de 1-propanol (Figura 23, rosa). Cabe destacar que la fermentación mejor valorada por el panel de cata fue F18 (Lt<sub>2</sub>), en la que no se ha detectado hexanoato de etilo (piña) y la producción de los demás compuestos estudiados está por debajo del 50% de la producción máxima detectada en el conjunto de fermentaciones (Figura 23, morado). Este hecho podría indicar que la percepción aromática del vino no depende de la presencia de

---

---

compuestos concretos en concentraciones elevadas, sino de un un equilibrio entre un conjunto de compuestos volátiles que dan lugar a un aroma agradable en el vino. Además, teniendo en cuenta la descripción organoléptica realizada por el panel de cata de las fermentaciones FI5, FI7 y FI8 (aromas a frutos rojos), las cepas Hu<sub>1</sub>, Lt<sub>1</sub> y Lt<sub>2</sub> respectivamente, podrían estar vinculadas con la producción de otros compuestos volátiles diferentes a los estudiados y responsables de este tipo de aromas tan apreciados en los vinos tintos.

Teniendo en cuenta estos resultados, y el hecho de que las fermentaciones individuales analizadas no llegaron a concluir por la baja tolerancia al etanol de las especies no-*Saccharomyces*, se decidió continuar el estudio incluyendo levaduras de tipo *Saccharomyces* en las fermentaciones.

#### **IV.5.2. Fermentaciones dobles**

Estas fermentaciones se realizaron combinando las levaduras no-*Saccharomyces* que se utilizaron en las fermentaciones individuales descritas anteriormente, con la cepa autóctona de *S. cerevisiae* Sc<sub>1</sub>, o con la cepa comercial *S. cerevisiae* ES42 (Sc<sub>0</sub>), empleada en algunas ocasiones en la bodega *Díaz Bayo* (Tabla 16). Las fermentaciones se prepararon siguiendo las indicaciones descritas en el Apartado III.5 de la Sección de Materiales y Métodos, inoculando en 50 mL de mosto *Tempranillo* (19,5 grados Brix) las levaduras pertenecientes a los géneros no-*Saccharomyces* a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/mL y tres días después del inicio de la fermentación se añadió *Saccharomyces* a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/mL. Además, se hicieron dos fermentaciones control en las que el mosto se inoculó individualmente con cada una de las dos cepas empleadas de *S. cerevisiae* (Sc<sub>1</sub> y Sc<sub>0</sub>). De igual forma a como se hizo con las fermentaciones individuales, la evolución de las fermentación se estimó en base a la producción de CO<sub>2</sub> y en este caso, debido a la presencia de *S. cerevisiae*, las fermentaciones finalizaron a los 15-18 días.

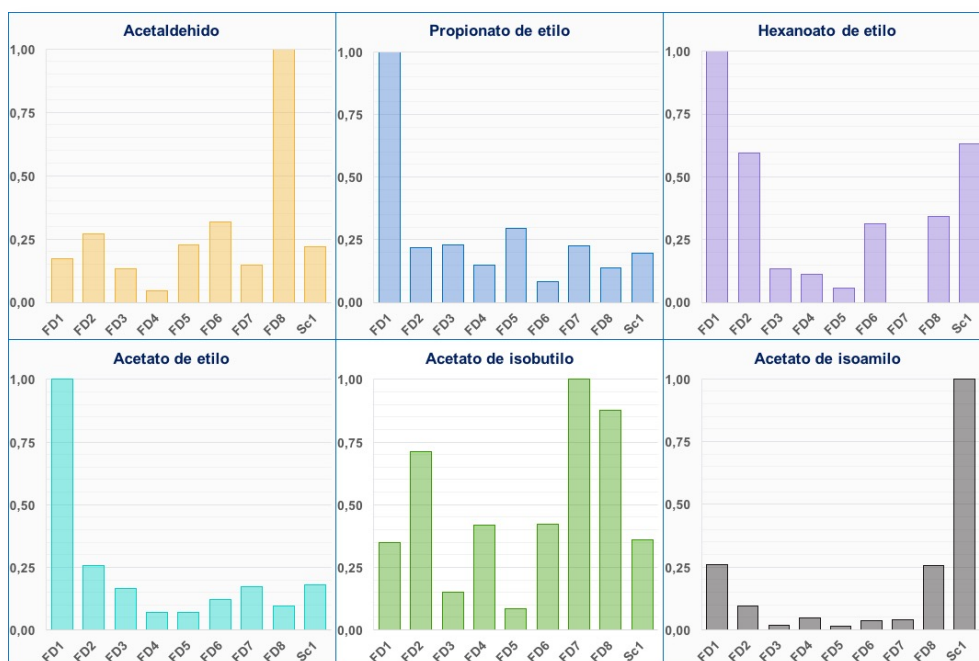
Una vez concluidas las fermentaciones se analizó la fracción volátil de las 18 muestras siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las fermentaciones individuales (Apartado III.6.2.1 de la Sección Materiales y Métodos). En este grupo de fermentaciones se analizó la producción relativa de hexanoato de etilo, propionato de etilo, acetaldehído, acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de isobutilo. En este caso se ha incluido el análisis de los acetatos de isoamilo (4.658 minutos) e isobutilo (2.725 minutos), por ser dos compuestos muy valorados en los vinos de la D.O. Ribera del Duero debido a sus aromas a fruta dulce (pera, plátano) y grosella respectivamente. En cambio, no se ha valorado la producción de propionato de etilo y 1-propanol, ya que pese a ser dos compuestos muy interesantes fueron más abundantes en dos de las fermentaciones peor valoradas por el panel de cata (FI1 y FI4). El análisis de los datos se ha hecho comparando la concentración relativa de cada compuesto en las diferentes fermentaciones, de la misma manera a como se hizo para las fermentaciones individuales.

**Tabla 16. Fermentaciones dobles realizadas mediante inoculación secuencial de las cepas de levaduras indígenas de tipo no-*Saccharomyces* seleccionadas y *S. cerevisiae* Sc<sub>1</sub> o Sc<sub>0</sub>.**

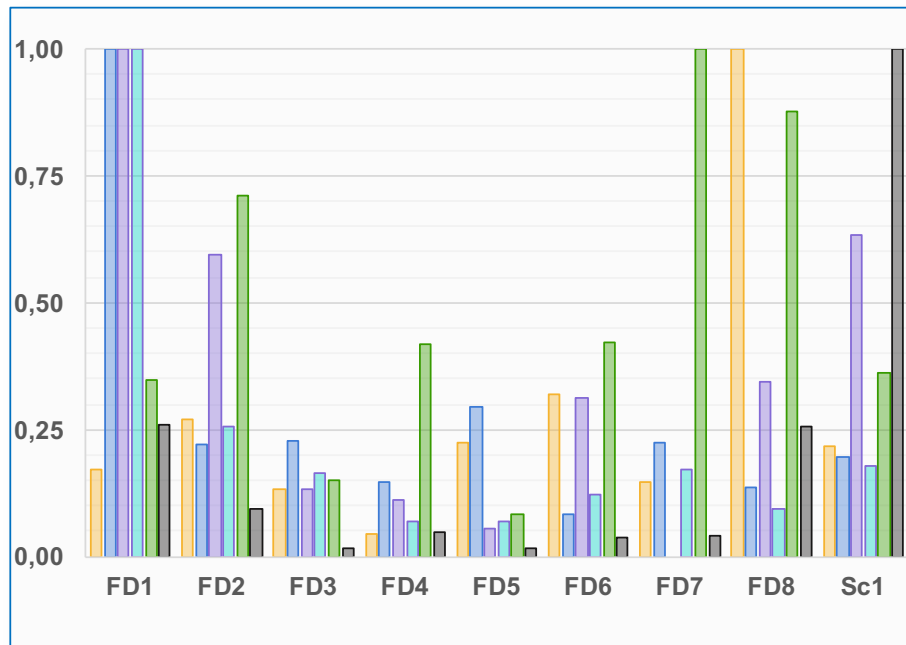
| Fermentación | Cepa no- <i>Saccharomyces</i> | Cepa <i>Saccharomyces</i> |
|--------------|-------------------------------|---------------------------|
| FD1          |                               | Mp <sub>1</sub>           |
| FD2          | <i>M. pulcherrima</i>         | Mp <sub>2</sub>           |
| FD3          |                               | Mp <sub>3</sub>           |
| FD4          |                               | Mp <sub>4</sub>           |
| FD5          |                               |                           |
| FD6          | <i>H. uvarum</i>              | Hu <sub>1</sub>           |
| FD7          | <i>L. thermotolerans</i>      | Lt <sub>1</sub>           |
| FD8          |                               | Lt <sub>2</sub>           |
| FD9          |                               | Mp <sub>1</sub>           |
| FD10         | <i>M. pulcherrima</i>         | Mp <sub>2</sub>           |
| FD11         |                               | Mp <sub>3</sub>           |
| FD12         |                               | Mp <sub>4</sub>           |
| FD13         |                               |                           |
| FD14         | <i>H. uvarum</i>              | Hu <sub>1</sub>           |
| FD15         | <i>L. thermotolerans</i>      | Lt <sub>1</sub>           |
| FD16         |                               | Lt <sub>2</sub>           |

Los resultados presentados en la Figura 24, muestran que en FD8 (Lt<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub>), la producción de acetaldehído (**amarillo**) fue significativamente

mayor que en el resto de fermentaciones ( $\geq 68\%$ ). En cuanto a la producción de los dos ésteres analizados, propionato de etilo (azul) y hexanoato de etilo (morado), puede observarse que en la fermentación FD1 (Mp<sub>1</sub>/Sc<sub>1</sub>) se registró la producción más alta de ambos compuestos. La cantidad relativa de propionato de etilo fue al menos un 70% mayor a la obtenida en las otras 8 fermentaciones, mientras que la de hexanoato de etilo era un 41% más elevada. Asimismo, en FD1 también se obtuvo la mayor producción de acetato de etilo (notas frutales, barniz), con diferencias significativas respecto a las demás fermentaciones ( $\geq 74\%$ ) (Figura 24, turquesa). En cuanto al acetato de isobutilo (plátano y fruta dulce), la mayor producción se obtuvo en las fermentaciones con *L. thermotolerans* (FD7 y FD8), con diferencias que oscilan entre el 18 y el 85% en comparación con la cantidad detectada en FD2 y FD5 respectivamente (Figura 24, verde). En la fermentación control realizada exclusivamente por *S. cerevisiae* Sc<sub>1</sub>, destacó la elevada producción de acetato de isoamilo (aromas a plátano y pera), con una cantidad relativa  $\geq 75\%$  que el resto de fermentaciones (Figura 24, gris).



**Figura 24. Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones dobles FD1 a FD8 y la control Sc<sub>1</sub>.**



**Figura 25. Perfiles aromáticos obtenidos en las fermentaciones dobles FD1 a FD8 y la control con Sc<sub>1</sub> en base a la producción relativa de los compuestos volátiles analizados.** Compuestos volátiles: acetaldehído (•), propionato de etilo (•), hexanoato de etilo (•), acetato de etilo (•), acetato de isobutilo (•) y acetato de isoamilo (•).

Al comparar los perfiles aromáticos globales obtenidos en las diferentes fermentaciones (Figura 25) se puede apreciar que la cepa de *S. cerevisiae* Sc<sub>1</sub>, es una gran productora de acetato de isoamilo (fruta dulce, pera), si bien en fermentaciones conjuntas con cualquiera de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas, la producción de este compuesto se reduce de manera notable (Figura 25, gris). El resto de compuestos analizados presentan variaciones más o menos significativas en función de la levadura no-*Saccharomyces* empleada. En la fermentación FD3 (Mp<sub>3</sub>/Sc<sub>1</sub>) todos los compuestos analizados están presentes en baja cantidad pero muy equilibrados a excepción del acetato de isoamilo (grosella, jacinto rosa) que está en niveles muy bajos (Figura 25). El perfil global de la fermentación FD2 (Mp<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub>) es muy similar al obtenido en la fermentación control con Sc<sub>1</sub>, a excepción de los acetatos de isobutilo y de isoamilo (Figura 25, verde y gris). En las fermentaciones con *H. uvarum* (FD5 y FD6), la cantidad registrada de

---

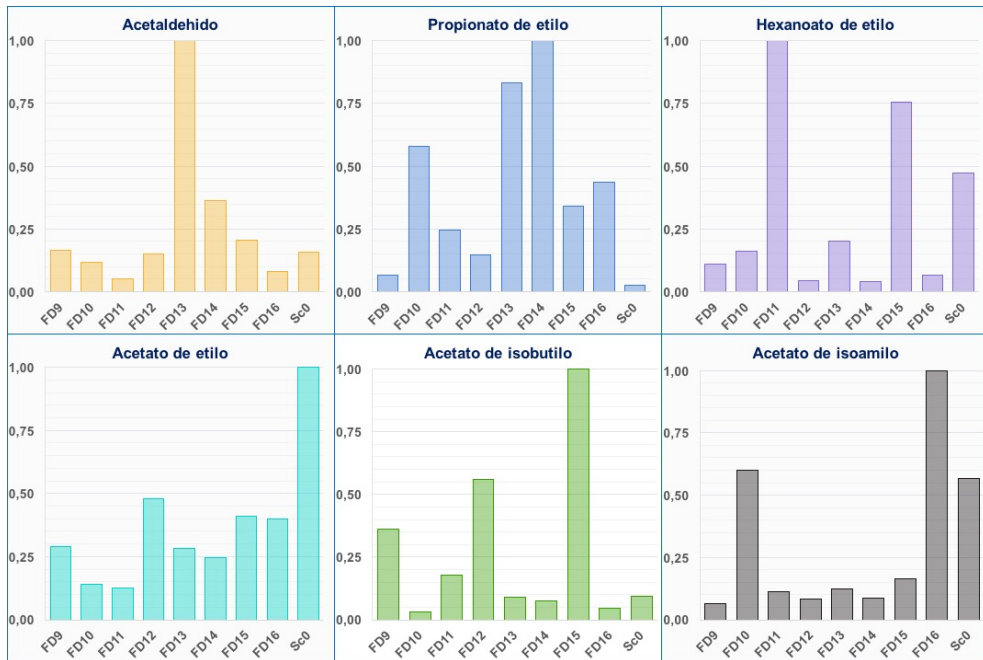
---

todos los compuestos fue muy baja en comparación a las demás fermentaciones, a excepción del propionato de etilo (piña) en FD6 (Hu<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub>) que era la segunda más elevada (Figura 25, azul). Las fermentaciones realizadas con las cepas de *L. thermotolerans*, FD7 (Lt<sub>1</sub>/Sc<sub>1</sub>) y FD8 (Lt<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub>), muestran una elevada producción de acetato de isoamilo y diferencias significativas en el resto de compuestos, destacando el acetaldehído (manzana, hierba verde) que en FD8 se cuantificó un 83% más que en FD7 (Figura 25, amarillo).

De todos los resultados obtenidos en las fermentaciones dobles empleando Sc<sub>1</sub>, cabe destacar que la presencia conjunta de Mp<sub>1</sub>/Sc<sub>1</sub> (FD1) durante la fermentación favorece la producción de propionato de etilo (aroma a piña) y hexanoato de etilo (aroma a plátano y piña), lo que favorecería la producción de vinos con aromas frutales. Sin embargo, esta combinación también produjo la mayor concentración de acetato de etilo, lo que podría generar un aroma a barniz similar al identificado con Hu<sub>2</sub> en las fermentaciones individuales (FI6). Por otro lado, las combinaciones Lt<sub>1</sub>/Sc<sub>1</sub> (FD7) o Lt<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub> (FD8) favorecen la presencia de acetato de isobutilo, lo que originaría una percepción agradable a fruta dulce y plátano. Además, el par Lt<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub> (FD16) generó la mayor producción de acetaldehído (manzana, hierba verde), lo que aportaría aromas a manzana y hierba verde.

Los resultados de las fermentaciones dobles realizadas con la levadura comercial Sc<sub>0</sub> (fermentaciones FD9 a FD16) se muestran en la Figura 26. En este caso, las fermentaciones en las que participaron las cepas de *H. uvarum*, FD13 (Hu<sub>1</sub>/Sc<sub>0</sub>) y F14 (Hu<sub>2</sub>/Sc<sub>0</sub>), registraron las mayores producciones de acetaldehído (manzana, hierba) y propionato de etilo (piña) respectivamente (Figura 26, amarillo y azul). Hay que destacar que la combinación de Hu<sub>2</sub> con Sc<sub>1</sub> destacó por la escasa producción de propionato de etilo, lo que indica que las interacciones entre diferentes cepas de levaduras influyen en gran medida en la concentración final de compuestos interesantes para el aroma del vino. Algo similar ocurre con el hexanoato de etilo (aromas a piña, plátano), de la que se ha detectado la mayor producción en la combinación Mp<sub>3</sub>/Sc<sub>0</sub> (FD11),

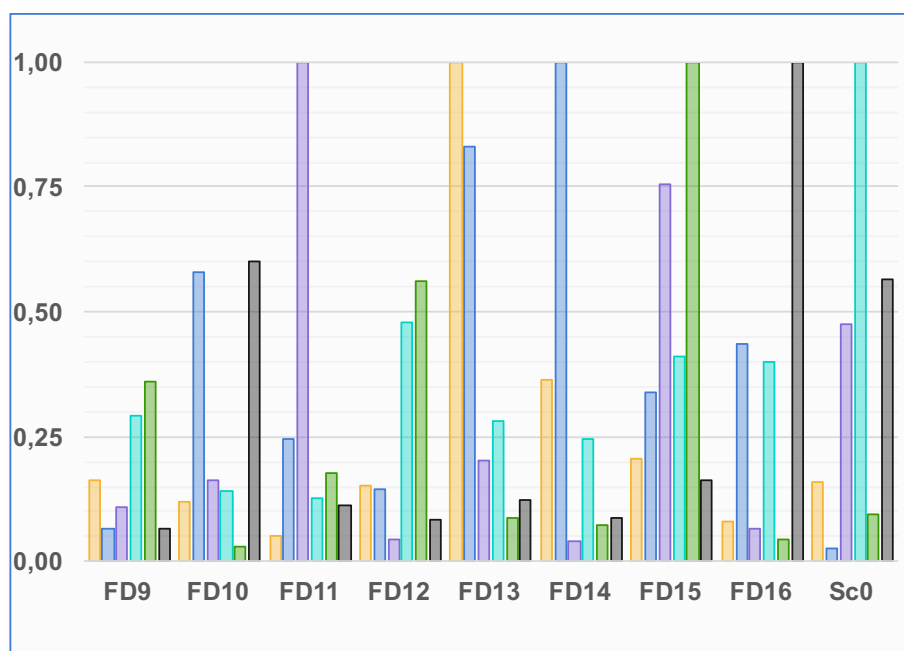
si bien la combinación  $Mp_3/Sc_1$  (FD10) fue una de las que menos hexanoato de etilo produjo (Figura 23, **morado**). La mayor producción de acetato de isobutilo (grosella, jacinto rosa) e isoamilo (fruta dulce, pera) se detectó en presencia de  $Lt_2$  (FD16), siendo al menos un 37% mayor a la de las demás (Figura 26, **verde** y **gris**). El acetato de etilo fue el único cuya producción más elevada se registró en ausencia de una cepa no-*Saccharomyces*, siendo un 52% más levada la producción registrada sólo en presencia de  $Sc_0$  a la obtenida en las demás fermentaciones (Figura 26, **turquesa**).



**Figura 26. Producción relativa de los seis compuestos volátiles analizados en las fermentaciones dobles FD9 a FD16 y la control  $Sc_0$ .**

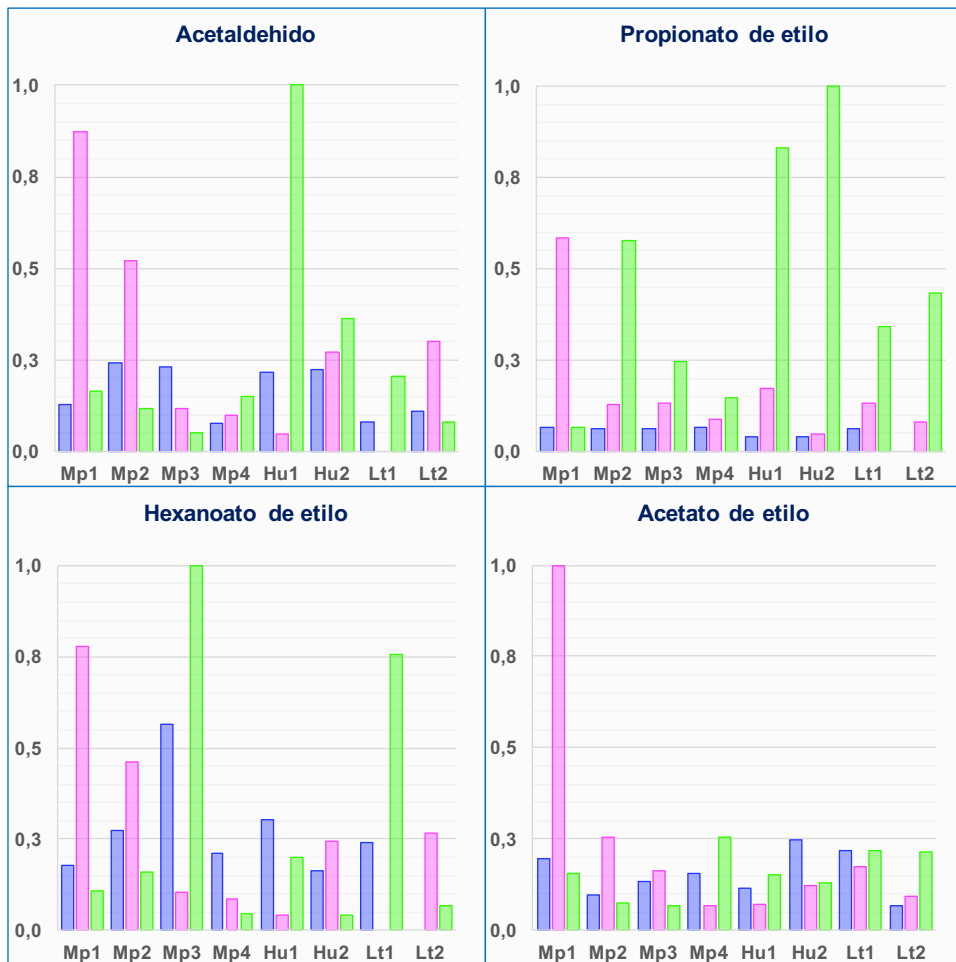
El análisis de los perfiles aromáticos globales de estas nueve fermentaciones (Figura 27) permite decir que la cepa comercial de *S. cerevisiae* ES42 ( $Sc_0$ ) es una buena productora de hexanoato de etilo (**morado**), acetato de etilo (**turquesa**) y acetato de isoamilo (**gris**), cuando se inocula individualmente. Si bien, en combinación con las cepas  $Mp_2$  (FD10) y  $Lt_2$  (FD16) se registró una producción mayor de acetato de isoamilo y en presencia de  $Mp_3$  (FD11) y  $Lt_1$  (FD15) de hexanoato de etilo. Teniendo esto en cuenta se podría afirmar que el empleo de  $Sc_0$  en combinación con alguna

de las cuatro cepas indígenas mencionadas ( $Mp_2$ ,  $Mp_3$ ,  $Lt_1$  o  $Lt_2$ ) garantizaría la producción de acetato de isoamilo y hexanoato de etilo, lo que supondría una mayor percepción de los aromas frutales a pera, plátano y piña en el vino. También se puede decir que el empleo conjunto de  $Sc_0$  con cualquiera de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas excepto  $Mp_1$ , produce un incremento en la cantidad de propionato de etilo (Figura 27, azul), lo que supone la obtención de vinos tintos con matices aromáticos a fruta ácida (piña). Además, cabe destacar que el empleo del par  $Lt_1/Sc_0$  (FD15), genera la mayor producción de acetato de isobutilo, lo que permite asegurar la percepción en el vino de aromas a bayas (grosella) y flores (jacinto, rosa). Del mismo modo hay que destacar la combinación  $Hu_1/Sc_0$  (FD13) por la elevada producción de acetaldehído (Figura 27, amarillo), responsable de la percepción de aromas a manzana y hierba.



**Figura 27. Comparación de perfiles globales de producción relativa de los compuestos volátiles analizados en las fermentaciones dobles FD9 a FD16 y la control con  $Sc_0$ .** Compuestos volátiles: acetaldehído (●), propionato de etilo (●), hexanoato de etilo (●), acetato de etilo (●), acetato de isobutilo (●) y acetato de isoamilo (●).

De todos los compuestos analizados en las 24 fermentaciones realizadas hasta el momento, solo cuatro eran comunes: el propionato de etilo, hexanoato de etilo, acetaldehído y acetato de etilo. Para poder estimar mejor la producción de estos compuestos, se compararon sus producciones relativas en las fermentaciones individuales y dobles (Figura 28).



**Figura 28. Comparación de las cantidades relativas obtenidas de los cuatro compuestos comunes analizados entre las fermentaciones individuales y dobles.** Los compuestos estudiados son: propionato de etilo, hexanoato de etilo, acetaldehído y acetato de etilo. Fermentaciones: F11 a F18 (•); FD1 a FD8 (•); FD9 a FD16 (•).

El análisis de los resultados permitió concluir que la presencia de *S. cerevisiae* ( $Sc_1$  o  $Sc_0$ ) durante la fermentación potencia significativamente la producción de propionato de etilo, lo que supondría una mayor percepción a

---

---

fruta ácida (piña) en el aroma vino. Las fermentaciones en las que la producción de este compuesto fue más significativa fueron FD9 (Mp<sub>1</sub>/Sc<sub>1</sub>), FD10 (Mp<sub>2</sub>/Sc<sub>0</sub>), FD13 (Hu<sub>1</sub>/Sc<sub>0</sub>) y FD14 (Hu<sub>2</sub>/Sc<sub>0</sub>). También se puede afirmar que las cepas de *M. pulcherrima* resultan ser buenas productoras de hexanoato de etilo, en especial las cepas Mp<sub>1</sub> y Mp<sub>3</sub>. La presencia de estas levaduras en el mosto inicial podría garantizar una mayor percepción frutal a plátano y piña en el vino. En relación al acetaldehído, se puede decir que la presencia de Sc<sub>1</sub> o Sc<sub>0</sub> conjuntamente con las cepas no-*Saccharomyces*, favorecen su producción, lo que incrementa la percepción a manzana y hierba verde. Si bien en presencia de la cepa Mp<sub>3</sub>, la mayor concentración del compuesto se obtuvo en ausencia de *S. cerevisiae*. Respecto al acetato de etilo, teniendo en cuenta la producción registrada en FI6 (Hu<sub>2</sub>) del compuesto y que el panel de cata describió en el aroma de esta fermentación las notas a barniz características del acetato de etilo (Tabla 15), se puede desaconsejar la inoculación conjunta de Mp<sub>2</sub>/Sc<sub>1</sub> (FD2), Mp<sub>4</sub>/Sc<sub>0</sub> (FD12) o Lt<sub>1</sub>/Sc<sub>0</sub> (FD15), con el fin de evitar la obtención de vinos de baja calidad por sus aromas desagradables (barniz, pegamento).

Teniendo en consideración estos resultados, se decidió continuar el trabajo realizando fermentaciones con mayor complejidad microbiológica, simulando así la situación real de las fermentaciones espontáneas que tienen lugar en la bodega, con el fin de determinar las combinaciones de levaduras que mejor se adapten a la producción de vinos con los perfiles aromáticos deseados.

#### **IV.6. ESTUDIO DEL POTENCIAL ENOLÓGICO DE TRES LEVADURAS INDÍGENAS DE TIPO NO-SACCHAROMYCES**

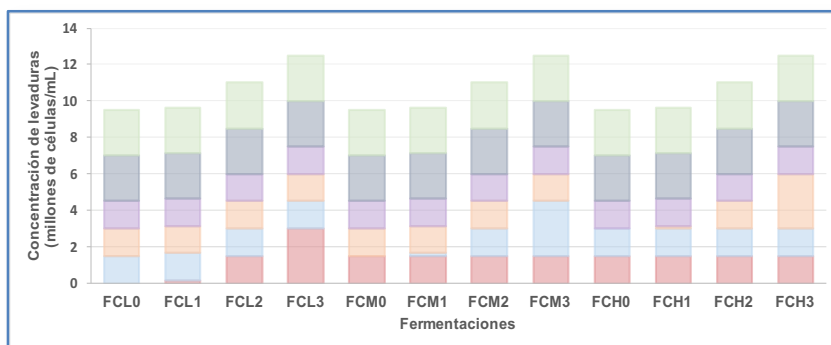
Las fermentaciones que tienen lugar en las bodegas de manera natural son procesos complejos en los que participan de manera conjunta varias poblaciones de levadura, tanto de géneros *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*. En base a las fermentaciones individuales y dobles realizadas anteriormente, de las ocho levaduras no-*Saccharomyces*

analizadas, se seleccionaron tres cepas para realizar un estudio más detallado: Mp<sub>3</sub>, Hu<sub>1</sub> y Lt<sub>1</sub>. Estas levaduras fueron escogidas por su contribución a la producción de compuestos con aromas frutales como el hexanoato de etilo (piña, plátano) y el acetato de isobutilo (fruta dulce, plátano). Además, estas levaduras producen poco acetato de etilo (barniz), que en altas concentraciones puede resultar perjudicial para el aroma del vino.

El objetivo del estudio fue analizar el efecto de estas levaduras en la composición química (aromática) del vino, en un entorno similar al de las fermentaciones naturales que se producen en las bodegas. Para ello se hicieron fermentaciones en las que se mantuvieron constantes las poblaciones de cinco levaduras y se variaba la concentración inicial de la levadura a estudiar ( $0$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  células/mL). La población fija de levaduras en todas las fermentaciones incluía las cepas Td<sub>1</sub>, Sc<sub>1</sub> y Su<sub>1</sub>, junto a dos de las tres cepas anteriormente citadas. La inclusión de la cepa Td<sub>1</sub>, aislada del pago Nave Espaldera, se hizo por el creciente interés que *Torulasporea delbrueckii* está suscitando al haberse vinculado con la producción de compuestos interesantes como el propionato de etilo (Renault y col., 2015). Esta levadura se inoculó a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/mL. Las dos levaduras del género *Saccharomyces* utilizadas fueron Sc<sub>1</sub> y Su<sub>1</sub>, y ambas se inocularon a concentración de  $2,5 \times 10^6$  células/mL. Ambas cepas fueron seleccionadas debido a su participación en la fermentación del mosto del pago Cañada Angosta, que produjo el vino mejor valorado durante la vendimia de 2010.

La inoculación de las levaduras se hizo de modo secuencial, primero se inoculó el mosto con el conjunto de levaduras de tipo no-*Saccharomyces* y tres días después del inicio de la fermentación se adicionaron las dos levaduras de tipo *Saccharomyces*. Las combinaciones de levaduras empleadas en las doce fermentaciones se muestran en la Figura 29. Las fermentaciones se hicieron

por triplicado en 240 mL de mosto *Tempranillo* (19,5 grados Brix) a 19 °C de temperatura y se dieron por concluidas cuando la densidad del mosto alcanzó valores inferiores a 1 g/L, hecho que tuvo lugar a los 19-22 días del inicio de la fermentación.



**Figura 29. Levaduras inoculadas en las fermentaciones complejas para estudiar la influencia de  $Lt_1$ ,  $Mp_3$  y  $Hu_1$  en el aroma secundario de los vinos.** Levaduras empleadas:  $Lt_1$  (\*),  $Mp_3$  (•),  $Hu_1$  (◊),  $Td_1$  (◊),  $Su_1$  (◊) y  $Sc_1$  (◊).

Una vez concluidas las fermentaciones se procedió a extraer la fracción volátil de los mostos fermentados empleando el método de microextracción en fase sólida del espacio en cabeza (HS-SPME), descrito en el apartado III.6.3 de la Sección de Materiales y Métodos. En este mismo apartado, se especifica el método de análisis de la fracción volátil, para el que se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos volátiles fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y los niveles de semejanza entre los valores obtenidos fueron calculados aplicando el test de Tukey (Apartado III.6.4, Sección Materiales y Métodos).

Teniendo en cuenta los compuestos volátiles vinculados con el aroma del vino más característicos de los vinos de la variedad *Tempranillo* y los resultados previos, se analizaron los siguientes compuestos volátiles: un alcohol (alcohol de feniletilo), cinco acetatos (acetato de etilo, acetato de hexilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo y acetato de feniletilo), seis ésteres (butirato de

etilo, decanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, valerato de etilo y succinato de dietilo) y cinco ácidos (ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico y ácido laurico). Muchos de estos compuestos se relacionan con aromas frutales o florales de percepción agradable. No es así para los ácidos, vinculados en su mayoría con aromas desagradables (grasa, queso). Los descriptores aromáticos de estos compuestos se recogen en la Tabla 7 de la Sección de Materiales y Métodos.

#### **IV.6.1. *Lachancea thermotolerans* (Lt<sub>1</sub>)**

Las fermentaciones realizadas para estudiar el efecto de la cepa Lt<sub>1</sub> en la composición final de compuestos volátiles que afecten al perfil aromático del vino fueron FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3, en las que se inocularon 0,  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  células/mL de Lt<sub>1</sub> respectivamente (Figura 28).

De los cinco acetatos estudiados, el **acetato de 2-feniletilo** (aromas a rosa, fruta y miel) fue el único que se registró en todos los casos a una concentración inferior a su umbral mínimo de percepción (3-5 mg/L) (Figura 30C). Un resultado similar se obtuvo con el **acetato de hexilo** (cereza, pera y flores), este compuesto únicamente se detectó a concentraciones por encima de su umbral mínimo de percepción en FCL3, cuando se inoculó la mayor cantidad de levaduras Lt<sub>1</sub> ( $3 \times 10^6$  células/mL) (Figura 30D), si bien, la concentración registrada no presentaba diferencias estadísticamente significativas con la obtenida en FCL2 (Tabla 17). En relación a los **acetatos de isobutilo** (aromas a grosella, jacinto y rosa), **isoamilo** (fruta dulce, plátano y pera) y **etilo** (barniz, frutal) (Figura 30A, B y E), al incrementar el número de células Lt<sub>1</sub> inoculadas se produce un descenso de su concentración en el mosto fermentado. No obstante, las diferencias registradas solo eran estadísticamente significativas en los **acetatos de etilo e isoamilo** entre las concentraciones obtenidas en FCL0 respecto a las otras tres fermentaciones.

Tabla 17. Análisis estadístico de la concentración (mg/L) de los acetatos cuantificados en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3.

|                         | Fermentaciones                               |  |  |  |
|-------------------------|--|--|--|--|
|                         | FCL0<br>(Lt <sub>1</sub> 0 células/mL)       | FCL1<br>(Lt <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCL2<br>(Lt <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>6</sup> células/mL) | FCL3<br>(Lt <sub>1</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL) |
| Acetato de isobutilo    | 1,060 <sup>a</sup> ± 8,7x10 <sup>-2</sup>    | 0,903 <sup>a</sup> ± 3,8x10 <sup>-2</sup>                | 0,875 <sup>a</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>                | 0,846 <sup>a</sup> ± 4,8x10 <sup>-2</sup>              |
| Acetato de isoamilo     | 0,086 <sup>a</sup> ± 3,3x10 <sup>-3</sup>    | 0,084 <sup>ab</sup> ± 6,1x10 <sup>-3</sup>               | 0,078 <sup>b</sup> ± 1,4x10 <sup>-3</sup>                | 0,077 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>              |
| Acetato de 2-feniletilo | 0,345 <sup>a</sup> ± 1,4x10 <sup>-2</sup>    | 0,245 <sup>b</sup> ± 2,1x10 <sup>-3</sup>                | 0,218 <sup>c</sup> ± 3,1x10 <sup>-3</sup>                | 0,162 <sup>c</sup> ± 3,3x10 <sup>-3</sup>              |
| Acetato de hexilo       | 3,9x10 <sup>-4b</sup> ± 1,4x10 <sup>-4</sup> | 4,9x10 <sup>-4b</sup> ± 4,9x10 <sup>-6</sup>             | 1,3x10 <sup>-3a</sup> ± 1,8x10 <sup>-4</sup>             | 2,3x10 <sup>-3a</sup> ± 3,3x10 <sup>-4</sup>           |
| Acetato de etilo        | 44,05 <sup>a</sup> ± 1,68                    | 28,75 <sup>b</sup> ± 0,04                                | 32,12 <sup>b</sup> ± 0,43                                | 32,23 <sup>b</sup> ± 0,14                              |

<sup>a,b,c</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.

aac

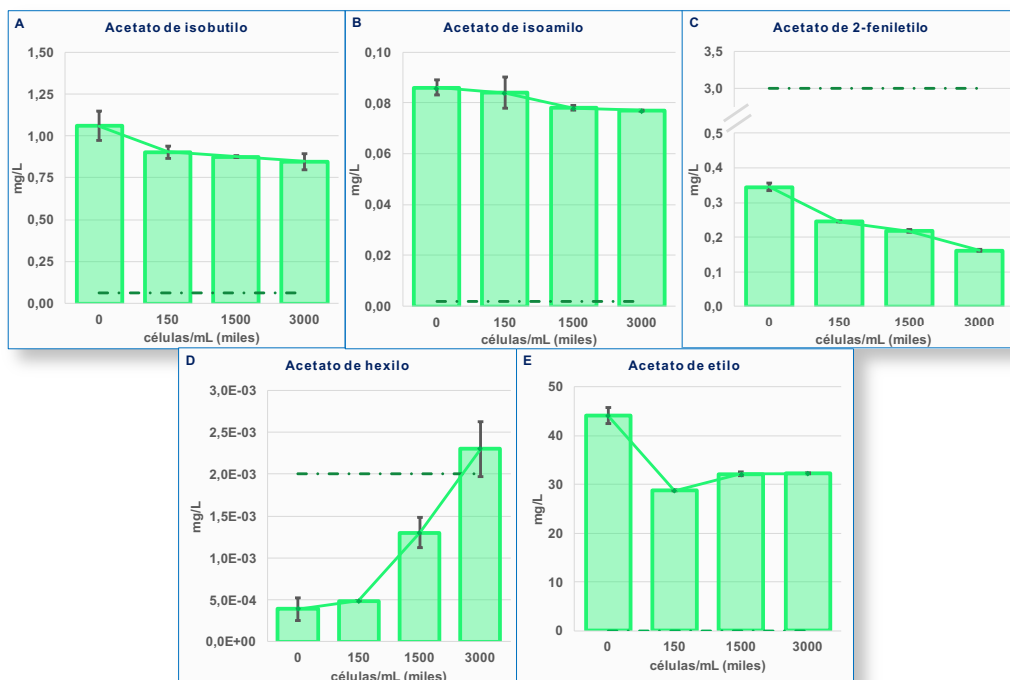


Figura 30. Representación gráfica de la concentración (mg/L) registrada de los acetatos estudiados en función de la concentración inicial de Lt<sub>1</sub>. La línea discontinua representa el umbral mínimo de percepción de cada acetato.

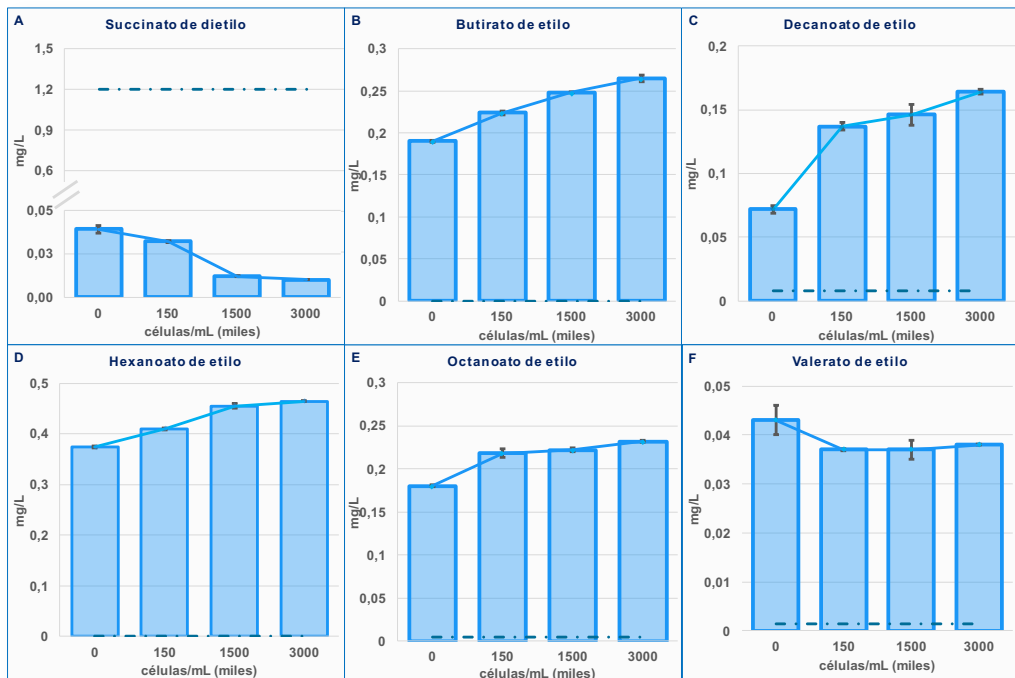
En relación a los ésteres analizados, únicamente el **succinato de dietilo** (suaves notas frutales y florales) se cuantificó en todos los casos en cantidades aromáticamente imperceptibles (Figura 31A). El **valerato de etilo** (manzana) fue el único cuya concentración descendía cuando se inoculaba Lt<sub>1</sub> en el mosto (Figura 31F), si bien este descenso no era estadísticamente significativo (Tabla 18). Los otros cuatro ésteres (**butirato de etilo**, **decanoato de etilo**, **hexanoato de etilo** y **octanoato de etilo**) (aromas a

piña, plátano y melocotón) presentaron un comportamiento similar, su concentración aumentaba proporcionalmente al incremento en el número de células empleadas de de  $Lt_1$  de manera estadísticamente significativa (Figura 31, Tabla 18). Si bien, las diferencias en la concentración de **hexanoato de etilo** fueron estadísticamente significativas cuando el número de células inoculadas de  $Lt_1$  fue mayor a  $1,5 \times 10^5$  células/mL (Tabla 18).

**Tabla 18. Concentraciones (mg/L) obtenidas en FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3 de los ésteres estudiados y resultado de su comparación estadística (ANOVA).**

|                             | Fermentaciones                   |  |  |  |
|-----------------------------|----------------------------------|--|--|--|
|                             | FCL0<br>( $Lt_1$ 0 células/mL)   | FCL1<br>( $Lt_1$ $1,5 \times 10^5$ células/mL) | FCL2<br>( $Lt_1$ $1,5 \times 10^6$ células/mL) | FCL3<br>( $Lt_1$ $3 \times 10^6$ células/mL) |
| <b>Succinato de dietilo</b> | $0,039^a \pm 0,2 \times 10^{-2}$ | $0,032^b \pm 6,5 \times 10^{-4}$               | $0,012^c \pm 1,4 \times 10^{-4}$               | $0,011^c \pm 7,1 \times 10^{-6}$             |
| <b>Butirato de etilo</b>    | $0,191^d \pm 0,1 \times 10^{-2}$ | $0,224^c \pm 0,2 \times 10^{-2}$               | $0,248^b \pm 0,2 \times 10^{-4}$               | $0,265^a \pm 0,4 \times 10^{-2}$             |
| <b>Decanoato de etilo</b>   | $0,072^c \pm 0,3 \times 10^{-2}$ | $0,137^b \pm 0,3 \times 10^{-2}$               | $0,146^b \pm 0,8 \times 10^{-2}$               | $0,164^a \pm 0,2 \times 10^{-2}$             |
| <b>Hexanoato de etilo</b>   | $0,374^b \pm 0,2 \times 10^{-2}$ | $0,411^b \pm 0,2 \times 10^{-2}$               | $0,455^a \pm 0,4 \times 10^{-2}$               | $0,464^a \pm 0,1 \times 10^{-2}$             |
| <b>Octanoato de etilo</b>   | $0,182^c \pm 0,1 \times 10^{-2}$ | $0,218^b \pm 0,5 \times 10^{-2}$               | $0,222^{ab} \pm 0,2 \times 10^{-2}$            | $0,232^a \pm 0,1 \times 10^{-2}$             |
| <b>Valerato de etilo</b>    | $0,043^a \pm 3 \times 10^{-3}$   | $0,037^a \pm 0,1 \times 10^{-3}$               | $0,037^{2a} \pm 2,4 \times 10^{-3}$            | $0,038^a \pm 1,2 \times 10^{-4}$             |

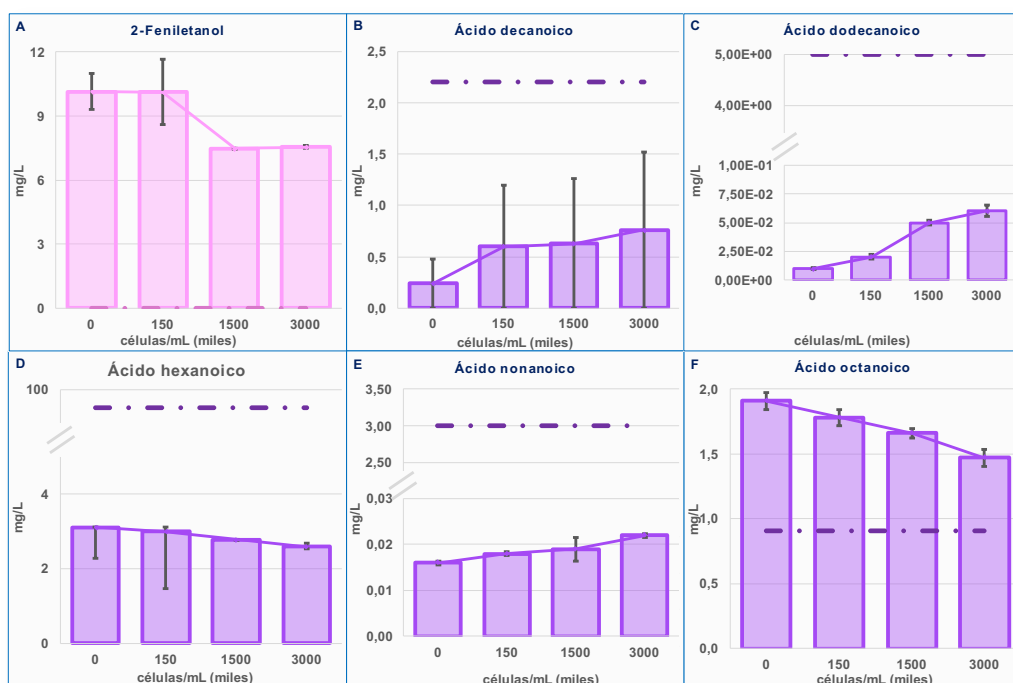
<sup>a,b,c,d</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.



**Figura 31. Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) obtenidas tras la cuantificación de ésteres en función del número de células inoculadas de  $Lt_1$ .** La línea discontinua muestra los umbrales mínimos de percepción para cada compuesto.

El **2-feniletanol**(rosa, notas a melocotón) fue el único alcohol cuantificado y se detectó un descenso estadísticamente significativo en su producción cuando la concentración inicial de  $L_{t_1}$  en el mosto era igual o superior a  $1,5 \times 10^6$  cels/ml (Tabla 19, Figura 32A). No obstante, la concentración del compuesto en las cuatro fermentaciones era suficiente para ser apreciable aromáticamente en el vino.

De los ácidos cuantificados, el único detectado en concentración superiores a su umbral mínimo de percepción es el **ácido octanoico** (aromas a rancio y fruta ácida) (Figura 32F). En este caso, a medida que se incrementa la concentración inicial de  $L_{t_1}$  en el mosto, disminuye su concentración, llegando a ser diferencias estadísticamente significativas cuando su concentración es mayor o igual a  $1,5 \times 10^6$  cels/ml (Tabla 19).



**Figura 32. Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) registradas de alcohol de feniletanol y ácidos en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3. Las líneas discontinuas señalan el margen del umbral mínimo de percepción de cada compuesto.**

Tabla 19. Concentración (mg/L) y análisis de varianza ANOVA de los alcoholes y ácidos estudiados que se registraron en las fermentaciones FCL0, FCL1, FCL2 y FCL3.

|                   | Fermentaciones                               |  |  |  |
|-------------------|--|--|--|--|
|                   | FCL0<br>(Lt: 0 células/mL)                   | FCL1<br>(Lt: 1,5x10 <sup>8</sup> células/mL) | FCL2<br>(Lt: 1,5x10 <sup>8</sup> células/mL) | FCL3<br>(Lt: 3x10 <sup>8</sup> células/mL)   |
| 2-Feniletanol     | 10,131 <sup>a</sup> ± 8,4x10 <sup>-1</sup>   | 10,124 <sup>ab</sup> ± 1,5x10 <sup>-1</sup>  | 7,473 <sup>b</sup> ± 1,3x10 <sup>-2</sup>    | 7,545 <sup>b</sup> ± 5,6x10 <sup>-2</sup>    |
| Ácido decanoico   | 0,244 <sup>d</sup> ± 8x10 <sup>-3</sup>      | 0,601 <sup>c</sup> ± 7x10 <sup>-3</sup>      | 0,633 <sup>b</sup> ± 3x10 <sup>-3</sup>      | 0,764 <sup>a</sup> ± 7x10 <sup>-3</sup>      |
| Ácido dodecanoico | 0,011 <sup>b</sup> ± 1x10 <sup>-3</sup>      | 0,021 <sup>b</sup> ± 2x10 <sup>-3</sup>      | 0,048 <sup>a</sup> ± 2x10 <sup>-3</sup>      | 0,061 <sup>a</sup> ± 5x10 <sup>-3</sup>      |
| Ácido hexanoico   | 3,112 <sup>a</sup> ± 1,2x10 <sup>-2</sup>    | 2,989 <sup>ab</sup> ± 1,2x10 <sup>-2</sup>   | 2,679 <sup>ab</sup> ± 3x10 <sup>-3</sup>     | 2,591 <sup>b</sup> ± 9,8x10 <sup>-2</sup>    |
| Ácido nonanoico   | 1,6x10 <sup>-2a</sup> ± 4,1x10 <sup>-4</sup> | 1,8x10 <sup>-2a</sup> ± 4,3x10 <sup>-4</sup> | 0,019 <sup>a</sup> ± 2,6x10 <sup>-3</sup>    | 2,2x10 <sup>-2a</sup> ± 4,3x10 <sup>-4</sup> |
| Ácido octanoico   | 1,911 <sup>a</sup> ± 6,6x10 <sup>-2</sup>    | 1,784 <sup>a</sup> ± 4,6x10 <sup>-2</sup>    | 1,657 <sup>b</sup> ± 3,5x10 <sup>-2</sup>    | 1,467 <sup>b</sup> ± 6,4x10 <sup>-2</sup>    |

<sup>a,b,c,d</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.

El conjunto de los resultados mostrados permite afirmar que la presencia de Lt<sub>1</sub> entre las levaduras iniciadoras de la fermentación, influye favorablemente en la obtención de vinos con una elevada concentración de ésteres como el **butirato de etilo**, el **decanoato de etilo**, el **hexanoato de etilo** y el **octanoato de etilo**. Esto proporcionaría aromas frutales ácidos (piña) y dulces (uva, melocotón y pera), además de los característicos aromas a frutos rojos (cereza) de vinos tintos de la variedad *Tempranillo*. Sin embargo, en el caso del **acetato de isoamilo** y el **2-feniletanol** ocurre lo contrario, cuanto mayor es el inóculo de Lt<sub>1</sub>, menor es la concentración registrada de ambos compuestos. Esto indicaría que una mayor concentración de Lt<sub>1</sub> al inicio de la fermentación podría suponer una menor percepción a fruta dulce (plátano, pera, melocotón) y flores (rosa, jacinto rosa) en el vino. Lo mismo ocurría con el **acetato de etilo**, compuesto que en concentraciones superiores a los 150 mg/L da lugar a una desagradable percepción a barniz en el vino, pero que en concentraciones inferiores, como las registradas en este estudio, potencia la percepción de las notas frutales. También debe tenerse en cuenta que cuanto mayor es el número de células inoculadas de Lt<sub>1</sub>, menor es la concentración de **ácido octanoico**, lo que supone una disminución de la acidez total del vino. Además, las concentraciones registradas de este compuesto sugieren que en el aroma del vino no serían percibidas sus características notas a rancio, mientras que si una sensación aromática a fruta ácida. De manera global, a la vista de los resultados mostrados se puede afirmar que la cepa Lt<sub>1</sub> influye positivamente en el aroma

del vino potenciando los aromas frutales a piña, uva, melocotón, pera y cereza, y disminuyendo la acidez.

#### IV.6.2. *Metschnikowia pulcherrima* (Mp<sub>3</sub>)

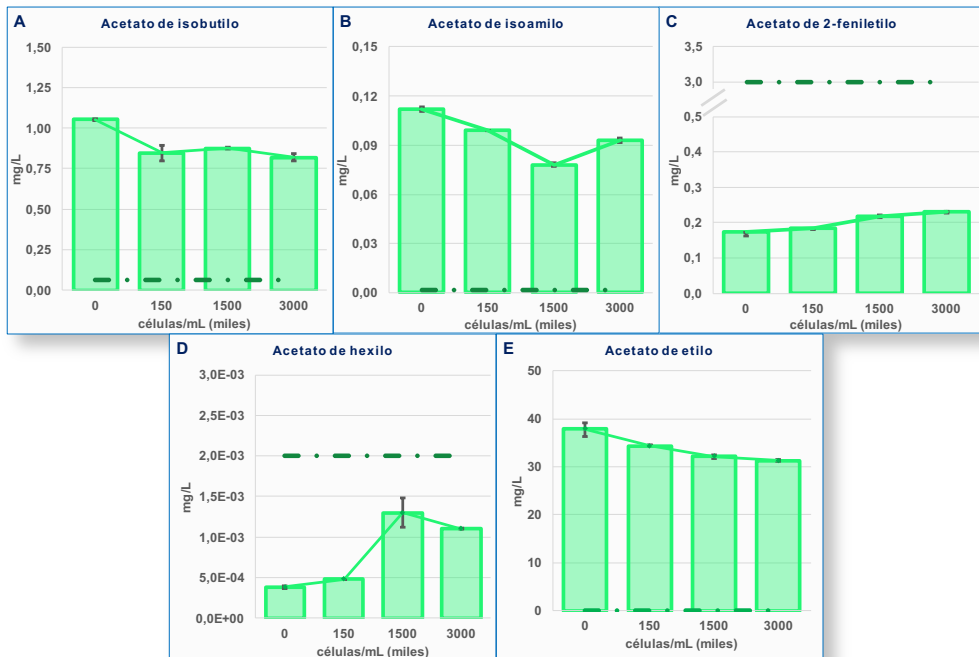
El estudio con la cepa Mp<sub>3</sub>, se hizo de modo similar a lo expuesto anteriormente, analizando las fermentaciones FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3 (Figura 29).

En este caso, tres de los cinco acetatos analizados se cuantificaron por encima de sus umbrales mínimos de percepción, los **acetatos de isobutilo**, **isoamilo** y **etilo** (Figura 33A, B y E). En los tres casos la concentración de los acetatos disminuía a medida que se incrementaba el inóculo de la levadura estudiada, siendo las diferencias en las concentraciones de **acetato de etilo** (barniz, notas frutales) y **acetato de isoamilo** (plátano, pera) estadísticamente significativas (Tabla 20). En cambio la variación en la concentración de **acetato de isobutilo** (grosella, jacinto rosa) únicamente fue significativa, desde un punto de vista estadístico, en FCM0 respecto a las demás fermentaciones (Tabla 20). Los **acetatos de 2-feniletilo** (rosa, afrutado, miel) y **hexilo** (cereza, pera, manzana, flores) no presentaron concentraciones perceptibles en ninguna de las cuatro fermentaciones. No obstante, puede observarse que la concentración de **acetato de hexilo** se incrementaba de manera significativa cuando la concentración de Mp<sub>3</sub> era igual o superior a  $1,5 \times 10^6$  cels/ml.

**Tabla 20. Resultado de la cuantificación (mg/L) de los acetatos seleccionados llevada a cabo en las fermentaciones FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3 y su comparación estadística.**

|                         | Fermentaciones                               |  |  |  |
|-------------------------|--|--|--|--|
|                         | FCM0<br>(Mp <sub>3</sub> 0 células/mL)       | FCM1<br>(Mp <sub>3</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCM2<br>(Mp <sub>3</sub> 1,5x10 <sup>6</sup> células/mL) | FCM3<br>(Mp <sub>3</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL) |
| Acetato de isobutilo    | 1,052 <sup>a</sup> ± 0,6x10 <sup>-2</sup>    | 0,846 <sup>b</sup> ± 4,8x10 <sup>-2</sup>                | 0,875 <sup>b</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>                | 0,819 <sup>b</sup> ± 2,2x10 <sup>-2</sup>              |
| Acetato de isoamilo     | 0,112 <sup>a</sup> ± 1,3x10 <sup>-3</sup>    | 0,099 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>                | 0,078 <sup>c</sup> ± 1,4x10 <sup>-3</sup>                | 0,093 <sup>b</sup> ± 1,2x10 <sup>-3</sup>              |
| Acetato de 2-feniletilo | 0,173 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-3</sup>    | 0,183 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>                | 0,218 <sup>a</sup> ± 3,1x10 <sup>-3</sup>                | 0,230 <sup>a</sup> ± 2,3x10 <sup>-3</sup>              |
| Acetato de hexilo       | 3,8x10 <sup>-4b</sup> ± 0,2x10 <sup>-4</sup> | 4,8x10 <sup>-4b</sup> ± 0,2x10 <sup>-6</sup>             | 1,3x10 <sup>-3a</sup> ± 1,8x10 <sup>-4</sup>             | 1,1x10 <sup>-3a</sup> ± 0,4x10 <sup>-5</sup>           |
| Acetato de etilo        | 37,93 <sup>a</sup> ± 1,28                    | 34,37 <sup>b</sup> ± 0,17                                | 32,12 <sup>bc</sup> ± 0,43                               | 31,34 <sup>c</sup> ± 0,20                              |

<sup>a,b,c</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.



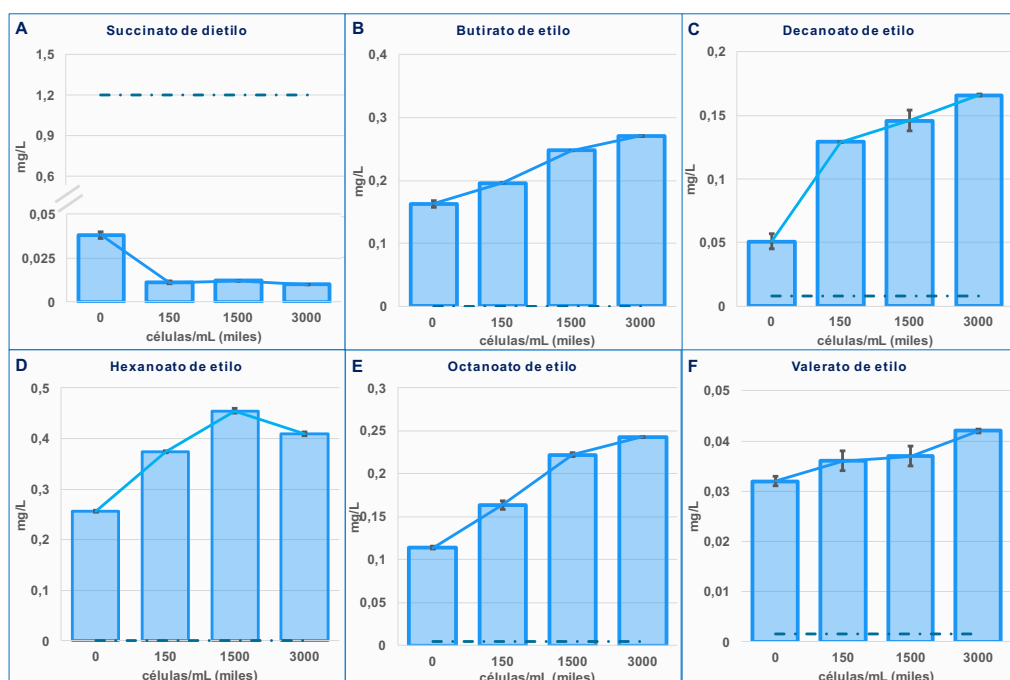
**Figura 33. Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) registradas de los acetatos estudiados en función de la concentración inicial de  $Mp_3$  en el mosto. Las líneas discontinuas representan los umbrales mínimos de detección de cada compuesto.**

De los ésteres cuantificados, **el succinato de dietilo** (suaves notas frutales y florales) fue el único que no alcanzó concentraciones perceptibles aromáticamente, independientemente del número de células inoculadas de  $Mp_3$  (Figura 34A). Para los demás ésteres cuanto mayor era la concentración inicial de  $Mp_3$ , mayor era su concentración final en el mosto fermentado. Este incremento era proporcional al número de células de  $Mp_3$  inoculadas para todos ellos, a excepción del **hexanoato de etilo** (aroma a piña y plátano), en el que la máxima concentración se alcanzó en FCL2 ( $1,5 \times 10^6$  células/mL) (Figura 34D). Además, cabe destacar que todas las variaciones en la concentración de estos cinco ésteres fueron estadísticamente significativas (Tabla 21).

**Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) de las concentraciones (mg/L) registradas de los ésteres estudiados en los mostos fermentados de FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3.**

|                      | Fermentaciones                            |  |  |  |
|----------------------|---|--|--|--|
|                      | FCM0<br>(Mp <sub>3</sub> 0 células/mL)    | FCM1<br>(Mp <sub>3</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCM2<br>(Mp <sub>3</sub> 1,5x10 <sup>6</sup> células/mL) | FCM3<br>(Mp <sub>3</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL) |
| Succinato de dietilo | 0,038 <sup>a</sup> ± 1,1x10 <sup>-4</sup> | 0,011 <sup>bc</sup> ± 5,6x10 <sup>-4</sup>               | 0,012 <sup>b</sup> ± 1,4x10 <sup>-4</sup>                | 0,013 <sup>c</sup> ± 5,9x10 <sup>-4</sup>              |
| Butirato de etilo    | 0,163 <sup>d</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup> | 0,196 <sup>c</sup> ± 1,2x10 <sup>-4</sup>                | 0,248 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-4</sup>                | 0,271 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>              |
| Decanoato de etilo   | 0,051 <sup>c</sup> ± 0,6x10 <sup>-2</sup> | 0,129 <sup>b</sup> ± 0,7x10 <sup>-4</sup>                | 0,146 <sup>b</sup> ± 0,8x10 <sup>-2</sup>                | 0,166 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>              |
| Hexanoato de etilo   | 0,257 <sup>c</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup> | 0,374 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                | 0,455 <sup>a</sup> ± 0,4x10 <sup>-2</sup>                | 0,409 <sup>a</sup> ± 0,4x10 <sup>-2</sup>              |
| Octanoato de etilo   | 0,114 <sup>d</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup> | 0,164 <sup>c</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>                | 0,222 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                | 0,243 <sup>a</sup> ± 4,2x10 <sup>-4</sup>              |
| Valerato de etilo    | 0,032 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup> | 0,036 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                | 0,037 <sup>ab</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>               | 0,042 <sup>a</sup> ± 3,4x10 <sup>-4</sup>              |

a,b,c,d :La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.



**Figura 34. Representación gráfica de las concentraciones (mg/L) de los ésteres estudiados en función de la concentración inicial de  $Mp_3$ .** El umbral mínimo de percepción se presenta con líneas discontinuas.

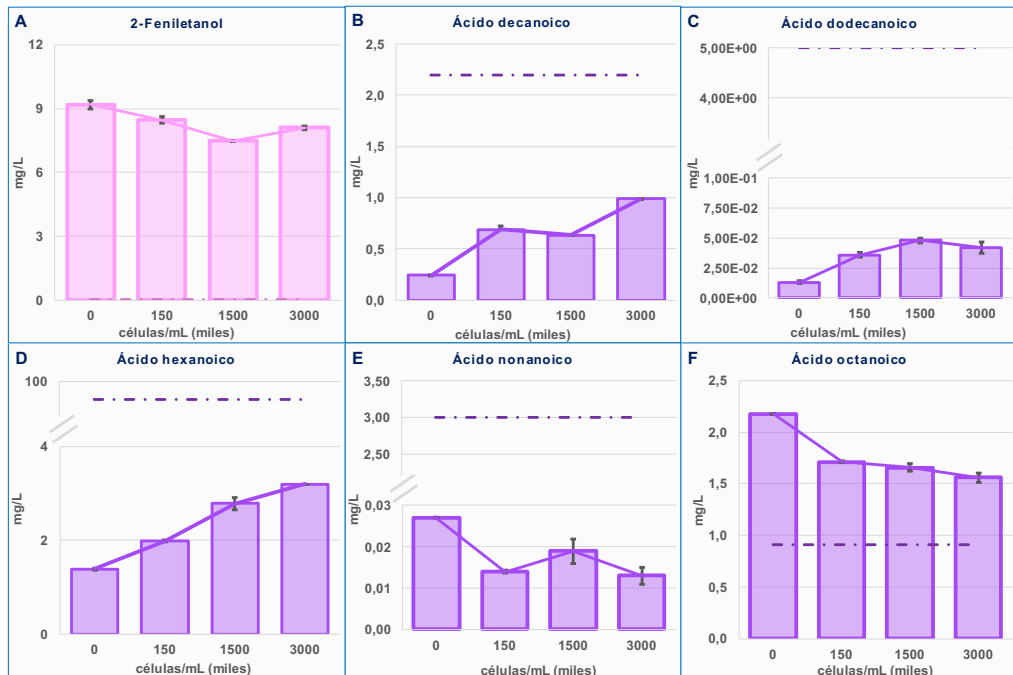
La valoración del **2-feniletanol**(rosa, melocotón) indicaba que la presencia de  $Mp_3$  en el mosto provocaba un descenso en su concentración, si bien en todos los casos los valores registrados aseguraban la percepción del compuesto (Figura 35A). Las variaciones de este compuesto resultaron estadísticamente significativa en todas las fermentaciones, salvo entre FCM1 y FCM3 (Tabla 22).

De los cinco ácidos cuantificados, solamente el **ácido octanoico** (aroma a fruta ácida y rancio) estaba presente en concentraciones perceptibles aromáticamente, si bien la presencia de  $Mp_3$  durante la fermentación provocaba una reducción estadísticamente significativa en su concentración (Tabla 22).

**Tabla 22. Producción en mg/L que se cuantificó del alcohol y ácidos estudiados en los mostos de las fermentaciones FCM0, FCM1, FCM2 y FCM3.**

|                 | Fermentaciones                   |  |  |  |
|-----------------|----------------------------------|--|--|--|
|                 | FCM0<br>( $Mp_3$ 0 células/mL)   | FCM1<br>( $Mp_3$ $1,5 \times 10^5$ células/mL) | FCM2<br>( $Mp_3$ $1,5 \times 10^6$ células/mL) | FCM3<br>( $Mp_3$ $3 \times 10^6$ células/mL) |
| 2-Feniletanol   | $9,186^a \pm 2,1 \times 10^{-1}$ | $8,469^b \pm 1,4 \times 10^{-1}$               | $7,473^c \pm 1,0 \times 10^{-2}$               | $8,106^b \pm 9,2 \times 10^{-2}$             |
| Ácido decanoico | $0,244^c \pm 0,4 \times 10^{-2}$ | $0,691^b \pm 3,0 \times 10^{-2}$               | $0,633^b \pm 0,3 \times 10^{-2}$               | $0,987^a \pm 0,7 \times 10^{-2}$             |
| Ácido laurico   | $0,013^c \pm 4,2 \times 10^{-4}$ | $0,036^{bc} \pm 1,5 \times 10^{-2}$            | $0,048^a \pm 0,2 \times 10^{-2}$               | $0,042^{ab} \pm 0,1 \times 10^{-2}$          |
| Ácido hexanoico | $1,381^d \pm 1,8 \times 10^{-2}$ | $1,980^c \pm 2,6 \times 10^{-2}$               | $2,780^b \pm 1,3 \times 10^{-1}$               | $3,189^a \pm 0,7 \times 10^{-2}$             |
| Ácido nonanoico | $0,027^a \pm 0,7 \times 10^{-4}$ | $0,014^b \pm 4,0 \times 10^{-4}$               | $0,019^b \pm 0,3 \times 10^{-2}$               | $0,013^b \pm 0,2 \times 10^{-2}$             |
| Ácido octanoico | $2,177^a \pm 0,5 \times 10^{-2}$ | $1,711^b \pm 1,1 \times 10^{-2}$               | $1,657^{bc} \pm 3,5 \times 10^{-2}$            | $1,558^c \pm 4,4 \times 10^{-2}$             |

<sup>a,b,c,d</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.



**Figura 35. Representación gráfica de la concentración que se obtuvo de alcohol de feniletanol y ácidos en las fermentaciones FCM0 a FCM3, en las que se varió la concentración inicial de  $Mp_3$ . Los umbrales de percepción de cada compuesto se presentan como líneas discontinuas en cada gráfico.**

---

---

Estos resultados indican que la presencia de la cepa Mp<sub>3</sub> en el mosto de partida supone un descenso en la concentración de **acetato de isoamilo**, **acetato de isobutilo**, **2-feniletanol** y **ácido octanoico** en el mosto fermentado. Por ello, se puede afirmar que el empleo de Mp<sub>3</sub> daría lugar a vinos con una menor percepción aromática a frutas dulces (plátano, pera), bayas (grosella) y flores (rosa, jacinto rosa). Además, esta levadura provoca una reducción de la acidez (menor concentración ácido octanoico) y mantiene los niveles de **acetato de etilo** en concentraciones favorables para la percepción de los aromas frutales (<150 mg/L). Sin embargo, la concentración de **butirato de etilo**, **decanoato de etilo**, **hexanoato de etilo**, **octanoato de etilo** y **valerato de etilo** aumenta significativamente y de manera proporcional a la concentración de levaduras Mp<sub>3</sub> inoculadas. Por ello, se concluye que el empleo de Mp<sub>3</sub> favorecería la percepción de aromas a piña, uva, plátano, manzana y melocotón en el vino.

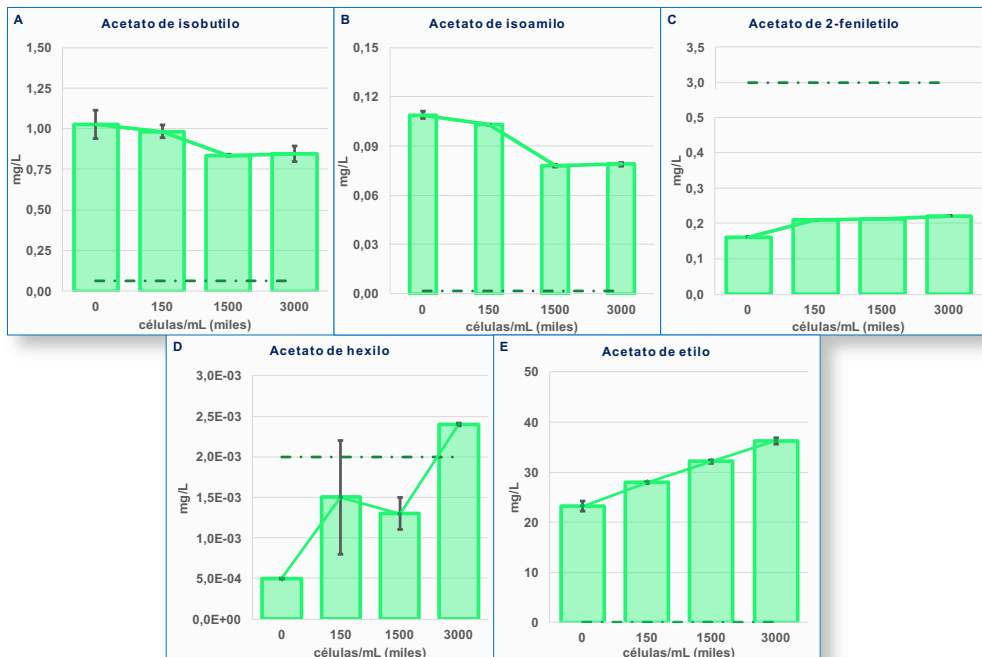
Teniendo en cuenta las conclusiones y afirmaciones expuestas, se puede manifestar que al igual que en el caso de Lt<sub>1</sub>, la utilización de la cepa de *M. pulcherrima* Mp<sub>3</sub> en la fermentación de mosto de uva *Tempranillo*, influiría positivamente en el aroma del vino generando aromas afrutados a piña, uva, plátano, manzana y melocotón.

#### IV.6.3. *Hanseniaspora uvarum* (Hu<sub>1</sub>)

La tercera levadura analizada en detalle fue Hu<sub>1</sub>, variando su concentración en el mosto de partida en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCH2 y FCH3.

En lo que se refiere a la producción de acetatos,, la concentración de los **acetatos de isobutilo** (notas aromáticas de grosella y jacinto rosa) e **isoamilo** (aromas a fruta dulce) desciende a medida que se incrementa la concentración de Hu<sub>1</sub> en el mosto de partida (Figura 36A y B), variación que resulta estadísticamente significativas a partir de FCH2 ( $1,5 \times 10^6$  cels/ml) (Tabla 23). El **acetato de 2-feniletilo** (aromas florales y frutales) fue el único

que se cuantificó por debajo del umbral mínimo de percepción en todas las fermentaciones (Figura 36C). El **acetato de hexilo** (aromas a cereza, pera, manzana y flores), alcanza concentraciones perceptibles aromáticamente cuando se inoculan en el mosto  $3 \times 10^6$  células/mL de Hu<sub>1</sub> (FCH3), la máxima concentración analizada (Figura 36D). Además, las variaciones registradas en la concentración de este compuesto, eran estadísticamente significativas entre las cuatro fermentaciones (Tabla 23). El **acetato de etilo**, se registró por encima de su umbral mínimo de percepción en las cuatro fermentaciones. Además, su concentración se incrementaba de manera estadísticamente significativa en el mosto a medida que se aumentó el número de células inoculadas de Hu<sub>1</sub> al inicio de la fermentación (Tabla 23).



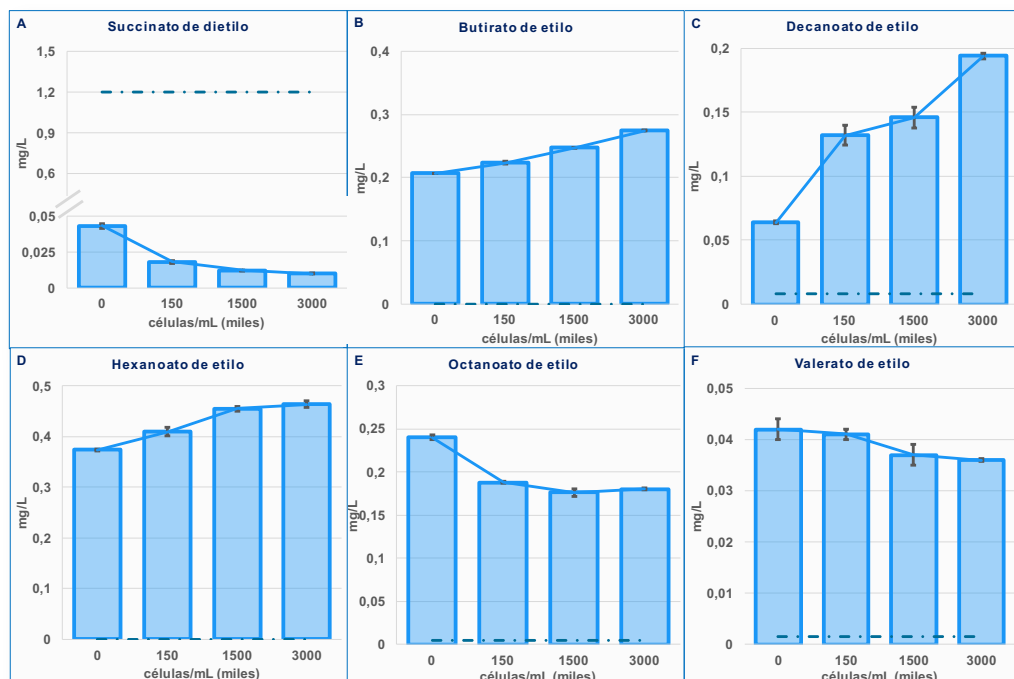
**Figura 36. Representación gráfica de las concentraciones, en mg/L, que se registraron de los cinco acetatos estudiados en las fermentaciones con variaciones en la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>. Las líneas discontinuas representan el umbral mínimo de percepción de cada compuesto.**

**Tabla 23. Concentración (mg/L) de los seis acetatos estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3 y comparación estadística de los datos.**

|                         | Fermentaciones                              |  |  |   |
|-------------------------|---|--|--|---|
|                         | FCH0<br>(Hu: 0 células/mL)                  | FCH1<br>(Hu: 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCH2<br>(Hu: 1,5x10 <sup>6</sup> células/mL) | FCH3<br>(Hu: 3x10 <sup>6</sup> células/mL)  |
| Acetato de isobutilo    | 1,028 <sup>a</sup> ± 1,7x10 <sup>-2</sup>   | 0,983 <sup>a</sup> ± 0,7x10 <sup>-2</sup>    | 0,875 <sup>b</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>    | 0,866 <sup>b</sup> ± 3,4x10 <sup>-2</sup>   |
| Acetato de isoamilo     | 0,109 <sup>a</sup> ± 2,2x10 <sup>-3</sup>   | 0,103 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>    | 0,078 <sup>b</sup> ± 1,4x10 <sup>-3</sup>    | 0,079 <sup>b</sup> ± 1,1x10 <sup>-3</sup>   |
| Acetato de 2-feniletilo | 0,162 <sup>c</sup> ± 3,4x10 <sup>-3</sup>   | 0,209 <sup>b</sup> ± 0,8x10 <sup>-4</sup>    | 0,218 <sup>ab</sup> ± 3,1x10 <sup>-3</sup>   | 0,221 <sup>a</sup> ± 1,4x10 <sup>-3</sup>   |
| Acetato de hexilo       | 5,0x10 <sup>-4</sup> ± 0,1x10 <sup>-4</sup> | 1,5x10 <sup>-3</sup> ± 0,7x10 <sup>-3</sup>  | 1,3x10 <sup>-3</sup> ± 1,8x10 <sup>-4</sup>  | 2,4x10 <sup>-3</sup> ± 0,2x10 <sup>-4</sup> |
| Acetato de etilo        | 23,21 <sup>d</sup> ± 1,02                   | 27,94 <sup>c</sup> ± 0,21                    | 32,12 <sup>b</sup> ± 0,43                    | 36,24 <sup>a</sup> ± 0,61                   |

<sup>a,b,c</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.

De los ésteres cuantificados, únicamente el **succinato de dietilo** (notas frutales y florales) presentó una concentración inferior a su umbral de percepción en las cuatro fermentaciones (Figura 37A).



**Figura 37. Representación gráfica de las concentraciones, en mg/L, que se registraron de los ésteres cuantificados en las cuatro fermentaciones en las que se varió la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>. Los límites de los umbrales mínimos de percepción de cada compuesto se presentan con líneas discontinuas.**

La concentración de **butirato de etilo** (aroma a fruta ácida), **decanoato de etilo** (notas frutales) y **hexanoato de etilo** (aromas a piña y plátano)

aumentaba de manera proporcional al número de células inoculadas de Hu<sub>1</sub> (Figura 37B, C y D). En el caso del **decanoato de etilo**, al comparar la fermentación FCH3 ( $3 \times 10^6$  cels/mL) con FCH0 (sin Hu<sub>1</sub>), se detectó un incremento en la concentración del compuesto superior al 150%. Las variaciones del **butirato de etilo** y el **hexanoato de etilo**, eran más graduales y mantenidas. No obstante, las diferencias eran estadísticamente significativas y dependientes del número de células inoculadas de Hu<sub>1</sub> (Tabla 24). De manera opuesta, cuanto mayor fue el número de levaduras inoculadas de Hu<sub>1</sub>, menor fue la producción de **octanoato de etilo** (notas florales y a albaricoque) (Figura 37E) y **valerato de etilo** (aroma a manzana) (Figura 37F), aunque sólo las variaciones del **octanoato de etilo** fueron estadísticamente significativas (Tabla 24).

**Tabla 24. Comparación estadística de las concentraciones (mg/L) que se registraron de los seis ésteres estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3.**

|                             | Fermentaciones                            |  |  |  |
|-----------------------------|---|--|--|--|
|                             | FCH0<br>(Hu <sub>1</sub> 0 células/mL)    | FCH1<br>(Hu <sub>1</sub> $1,5 \times 10^6$ células/mL) | FCH2<br>(Hu <sub>1</sub> $1,5 \times 10^6$ células/mL) | FCH3<br>(Hu <sub>1</sub> $3 \times 10^6$ células/mL) |
| <b>Succinato de dietilo</b> | 0,043 <sup>a</sup> ± $1,6 \times 10^{-3}$ | 0,018 <sup>b</sup> ± $1,0 \times 10^{-3}$              | 0,012 <sup>c</sup> ± $1,4 \times 10^{-4}$              | 0,010 <sup>c</sup> ± $5,9 \times 10^{-4}$            |
| <b>Butirato de etilo</b>    | 0,207 <sup>d</sup> ± $3,5 \times 10^{-4}$ | 0,222 <sup>c</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$              | 0,248 <sup>b</sup> ± $0,2 \times 10^{-4}$              | 0,275 <sup>a</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$            |
| <b>Decanoato de etilo</b>   | 0,064 <sup>c</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$ | 0,132 <sup>b</sup> ± $0,8 \times 10^{-2}$              | 0,146 <sup>b</sup> ± $0,8 \times 10^{-2}$              | 0,194 <sup>a</sup> ± $0,2 \times 10^{-2}$            |
| <b>Hexanoato de etilo</b>   | 0,322 <sup>b</sup> ± $0,2 \times 10^{-2}$ | 0,392 <sup>b</sup> ± $0,8 \times 10^{-2}$              | 0,455 <sup>a</sup> ± $0,4 \times 10^{-2}$              | 0,459 <sup>a</sup> ± $0,7 \times 10^{-2}$            |
| <b>Octanoato de etilo</b>   | 0,240 <sup>a</sup> ± $0,3 \times 10^{-2}$ | 0,188 <sup>b</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$              | 0,222 <sup>ab</sup> ± $0,2 \times 10^{-2}$             | 0,180 <sup>b</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$            |
| <b>Valerato de etilo</b>    | 0,042 <sup>a</sup> ± $0,2 \times 10^{-2}$ | 0,041 <sup>a</sup> ± $0,1 \times 10^{-2}$              | 0,037 <sup>a</sup> ± $0,2 \times 10^{-2}$              | 0,036 <sup>a</sup> ± $2,7 \times 10^{-4}$            |

<sup>a,b,c,d</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.

La cuantificación del **2-feniletanol** (aroma a rosa y melocotón) y los ácidos seleccionados, siguieron la misma pauta que en el resto de fermentaciones, únicamente el **2-feniletanol** y el **ácido octanoico** (notas de fruta ácida y a rancio) se registraron en cantidades perceptibles (Figura 38A y F).

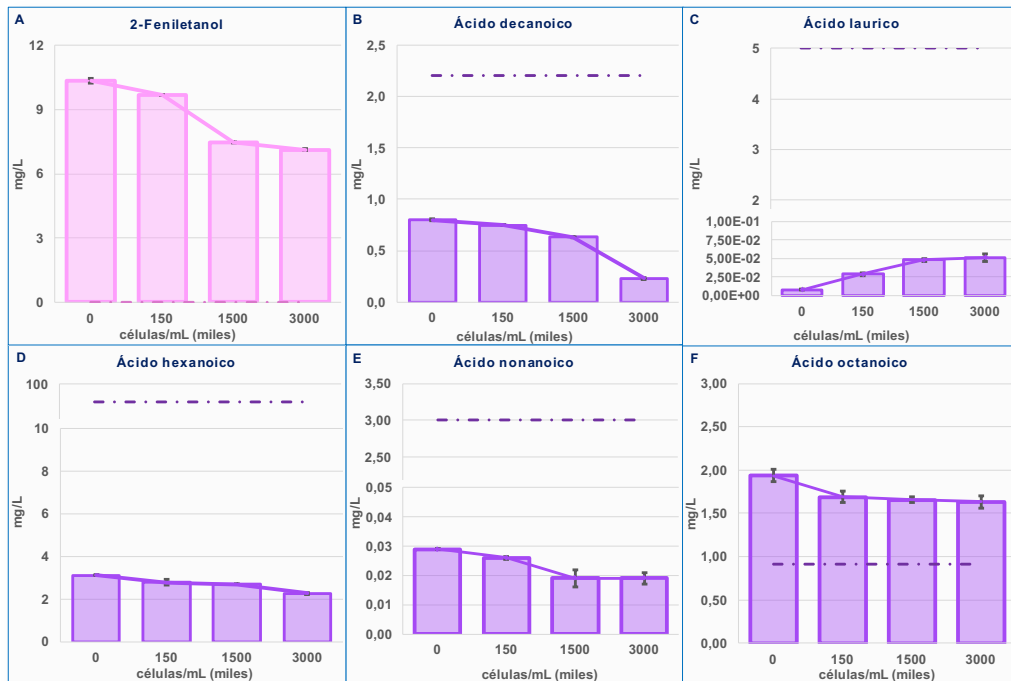
El descenso de la concentración de **2-feniletanol** a lo largo de las cuatro fermentaciones es proporcional al incremento en la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>, siendo las diferencias obtenidas estadísticamente significativas en los cuatro casos. Sin embargo, la simple presencia de la levadura Hu<sub>1</sub> provoca

un descenso estadísticamente significativo en la concentración de **octanoato de etilo**, independientemente del número de células inoculadas de dicha cepa (FCH1, 2 y 3), como se puede observar en la Tabla 25.

**Tabla 25. Datos obtenidos tras la cuantificación y comparación estadística de la concentración de 2-feniletanol de los ácidos estudiados en las fermentaciones FCH0, FCH1, FCMH2 y FCH3.**

|                        | Fermentaciones                             |  |  |  |
|------------------------|--|--|--|--|
|                        | FCH0<br>(Hu <sub>1</sub> 0 células/mL)     | FCH1<br>(Hu <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCH2<br>(Hu <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>6</sup> células/mL) | FCH3<br>(Hu <sub>1</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL) |
| <b>2-Feniletanol</b>   | 10,356 <sup>a</sup> ± 1,2x10 <sup>-1</sup> | 9,695 <sup>b</sup> ± 1,4x10 <sup>-2</sup>                | 7,473 <sup>c</sup> ± 1,4x10 <sup>-2</sup>                | 7,130 <sup>d</sup> ± 3,1x10 <sup>-2</sup>              |
| <b>Ácido decanoico</b> | 0,799 <sup>a</sup> ± 1,1x10 <sup>-2</sup>  | 0,750 <sup>b</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                | 0,633 <sup>c</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                | 0,231 <sup>d</sup> ± 1,0x10 <sup>-2</sup>              |
| <b>Ácido laurico</b>   | 0,008 <sup>c</sup> ± 0,2x10 <sup>-4</sup>  | 0,029 <sup>b</sup> ± 0,6x10 <sup>-2</sup>                | 0,048 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                | 0,051 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>              |
| <b>Ácido hexanoico</b> | 3,117 <sup>a</sup> ± 0,7x10 <sup>-2</sup>  | 2,780 <sup>ab</sup> ± 1,3x10 <sup>-1</sup>               | 2,679 <sup>b</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                | 2,273 <sup>c</sup> ± 4,4x10 <sup>-2</sup>              |
| <b>Ácido nonanoico</b> | 0,029 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>  | 0,026 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-4</sup>                | 0,019 <sup>b</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                | 0,019 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>              |
| <b>Ácido octanoico</b> | 1,936 <sup>a</sup> ± 7,1x10 <sup>-2</sup>  | 1,688 <sup>b</sup> ± 6,5x10 <sup>-2</sup>                | 1,657 <sup>b</sup> ± 3,5x10 <sup>-2</sup>                | 1,634 <sup>b</sup> ± 7,2x10 <sup>-2</sup>              |

<sup>a,b,c,d</sup>. La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.



**Figura 38. Representación gráfica de la concentración (mg/L) de 2-feniletanol y ácidos en los mostos fermentados en función de la concentración inicial de Hu<sub>1</sub>. Los umbrales mínimos de percepción de estos compuestos se indican con líneas discontinuas.**

Los resultados expuestos permitieron concluir que la inclusión de Hu<sub>1</sub> en el inóculo de levaduras iniciadoras de la fermentación, induce una mayor producción de **acetato de hexilo**, **butirato de etilo**, **decanoato de etilo** y **hexanoato de etilo** en el mosto fermentado. Por ello, se puede afirmar que el empleo de Hu<sub>1</sub> en la fermentación del mosto de uva garantiza la obtención de un vino rico en notas frutales de cereza, piña y uva. No obstante, debe tenerse en cuenta que la concentración de **acetato de hexilo** (aroma a cereza), únicamente alcanza su umbral mínimo de percepción cuando el número de células inoculadas de Hu<sub>1</sub> es de al menos  $3 \times 10^6$  células/mL. Asimismo, cuanto mayor es el número de células de Hu<sub>1</sub> en el mosto, mayor es la producción de **acetato de etilo**. Si bien, la concentración del compuesto en todos los casos es bastante inferior a los 150 mg/L, y por lo tanto su presencia sirve para aumentar la percepción frutal en el vino y no para aportar el aroma a barniz característico de este compuesto. La inclusión de Hu<sub>1</sub> en el mosto de partida también supone un descenso estadísticamente significativo de la producción de **octanoato de etilo**, **acetato de isoamilo**, **acetato de isobutilo** y **alcohol de feniletilo**. Aunque en este caso la concentración de estos cuatro compuestos siempre estaba por encima de su umbral mínimo de percepción, se puede afirmar que el empleo de elevadas concentraciones de Hu<sub>1</sub> provocaría una disminución de las notas aromáticas a flores, melocotón y fruta dulce en el vino. Sin embargo, se garantizaría una menor acidez en el vino, al reducir de manera significativa la concentración del ácido octanoico.

Tras el análisis de los tres grupos de fermentaciones presentados, se pudo observar que independientemente de la levadura estudiada (Mp<sub>3</sub>, Hu<sub>1</sub>, Lt<sub>1</sub>), el aumento en el número de células inoculadas siempre suponía un descenso de la concentración de cuatro de los compuestos estudiados (acetato de isobutio, acetato de isoamilo, 2-feniletanol y ácido octanoico) y un aumento de la concentración de otros tres (butirato de etilo, decanoato de etilo y hexanoato de etilo). Por este motivo, para poder establecer una relación más estrecha entre la producción de cada compuesto y la levadura

---

---

empleada, se llevó a cabo el análisis estadístico que se describe a continuación.

#### **IV.6.4. Análisis estadístico del efecto de las levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub> en la producción de siete compuestos volátiles interesantes para el aroma del vino.**

Para determinar si las diferencias detectadas en las concentraciones de los compuestos: acetato de isobutio, acetato de isoamilo, butirato de etilo, decanoato de etilo, hexanoato de etilo, 2-feniletanol y ácido octanoico, eran estadísticamente significativas y dependientes de las cepas de levadura en estudio (Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub>), se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA de los valores obtenidos en los diferentes ensayos (Apartado III.6.4, Sección Materiales y Métodos). En este análisis se compararon las fermentaciones homólogas en cuanto a la cantidad inoculada de cada una de las tres cepas en estudio. Por un lado se analizaron las fermentaciones en las que una de las cepas en estudio no estaba presente (FCL0, FCM0 y FCH0), en un segundo bloque las fermentaciones en las que la levadura en estudio estaba menos concentrada (FCL1, FCM1 y FCH1) y un último bloque en el que la concentración inoculada de la levadura en estudio era mayor a las otras dos (FCL3, FCM3 y FCH3).

Tras la comparación estadística se determinó que únicamente la concentración de **ácido octanoico**, caracterizado por su aroma a rancio y su influencia en la acidez del vino, era independiente de la levadura estudiada (Tablas 26A, B y C). Sin embargo, la producción de los otros seis compuestos resultó ser dependiente de la cepa de levadura utilizada, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre las fermentaciones.

La ausencia de la cepa Lt<sub>1</sub> (FCL0) en el mosto de partida, supone una menor concentración de **acetato de isoamilo** (aromas a pera) y **decanoato de etilo** (aroma a uva), mientras que la ausencia de Mp<sub>3</sub> (FCM0) provoca menores cantidades de **butirato de etilo** (aroma a piña) y **hexanoato de etilo** (aroma a plátano y piña). La eliminación de Hu<sub>1</sub> (FCH0), únicamente afecta al

**acetato de isobutilo** (aromas a plátano y fruta dulce), provocando también una disminución significativa en su concentración en el mosto fermentado. El único compuesto que no presentó diferencias relevantes asociadas a la ausencia de alguna de estas levaduras fue el **2-feniletanol** (aroma a rosa y melocotón).

**Tabla 26. Análisis de varianza ANOVA de las concentraciones (mg/L) registradas de los compuestos volátiles seleccionados en función de la actividad de las levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub>. A:** comparación de los resultados en ausencia de una de las levaduras; **B:** comparación de los resultados cuando la concentración inicial de una de las levaduras es inferior a la de las demás; **C:** comparación de los resultados cuando la concentración inicial de una de las levaduras es superior a la de las demás.

| A                    | Fermentaciones   |  |  |
|----------------------|--|--|--|
|                      | FCL0<br>( <u>Lt</u> <sub>1</sub> 0 células/mL)                   | FCM0<br>( <u>Mp</u> <sub>3</sub> 0 células/mL)                   | FCH0<br>( <u>Hu</u> <sub>1</sub> 0 células/mL)                   |
| Acetato de isoamilo  | 0,086 <sup>b</sup> ± 3,3x10 <sup>-3</sup>                        | 0,112 <sup>a</sup> ± 1,3x10 <sup>-3</sup>                        | 0,109 <sup>a</sup> ± 2,2x10 <sup>-3</sup>                        |
| Acetato de isobutilo | 1,060 <sup>a</sup> ± 8,7x10 <sup>-2</sup>                        | 1,052 <sup>a</sup> ± 0,6x10 <sup>-2</sup>                        | 1,028 <sup>b</sup> ± 1,7x10 <sup>-2</sup>                        |
| Butanoato de etilo   | 0,191 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        | 0,163 <sup>b</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>                        | 0,207 <sup>a</sup> ± 3,5x10 <sup>-4</sup>                        |
| Decanoato de etilo   | 0,072 <sup>a</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                        | 0,051 <sup>b</sup> ± 0,6x10 <sup>-2</sup>                        | 0,064 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        |
| Hexanoato de etilo   | 0,374 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,257 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,322 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        |
| 2-Feniletanol        | 10,131 <sup>a</sup> ± 8,4x10 <sup>-1</sup>                       | 9,186 <sup>a</sup> ± 2,1x10 <sup>-1</sup>                        | 10,356 <sup>a</sup> ± 1,2x10 <sup>-1</sup>                       |
| Ácido octanoico      | 1,911 <sup>a</sup> ± 6,6x10 <sup>-2</sup>                        | 2,177 <sup>a</sup> ± 0,5x10 <sup>-2</sup>                        | 1,936 <sup>a</sup> ± 7,1x10 <sup>-2</sup>                        |
| B                    | Fermentaciones   |  |  |
|                      | FCL1<br>( <u>Lt</u> <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCM1<br>( <u>Mp</u> <sub>3</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) | FCH1<br>( <u>Hu</u> <sub>1</sub> 1,5x10 <sup>5</sup> células/mL) |
| Acetato de isoamilo  | 0,084 <sup>b</sup> ± 6,1x10 <sup>-3</sup>                        | 0,099 <sup>ab</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>                       | 0,103 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-3</sup>                        |
| Acetato de isobutilo | 0,903 <sup>ab</sup> ± 3,8x10 <sup>-2</sup>                       | 0,846 <sup>b</sup> ± 4,8x10 <sup>-2</sup>                        | 0,983 <sup>a</sup> ± 0,7x10 <sup>-2</sup>                        |
| Butanoato de etilo   | 0,224 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,196 <sup>a</sup> ± 1,2x10 <sup>-4</sup>                        | 0,222 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        |
| Decanoato de etilo   | 0,137 <sup>a</sup> ± 0,3x10 <sup>-2</sup>                        | 0,129 <sup>a</sup> ± 0,7x10 <sup>-4</sup>                        | 0,132 <sup>a</sup> ± 0,8x10 <sup>-2</sup>                        |
| Hexanoato de etilo   | 0,411 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,374 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,392 <sup>a</sup> ± 0,8x10 <sup>-2</sup>                        |
| 2-Feniletanol        | 10,124 <sup>a</sup> ± 1,5x10 <sup>-1</sup>                       | 8,469 <sup>a</sup> ± 1,4x10 <sup>-1</sup>                        | 9,695 <sup>a</sup> ± 1,4x10 <sup>-2</sup>                        |
| Ácido octanoico      | 1,784 <sup>a</sup> ± 6,4x10 <sup>-2</sup>                        | 1,711 <sup>a</sup> ± 1,1x10 <sup>-2</sup>                        | 1,688 <sup>a</sup> ± 6,5x10 <sup>-2</sup>                        |
| C                    | Fermentaciones   |  |  |
|                      | FCL3<br>( <u>Lt</u> <sub>1</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL)   | FCM3<br>( <u>Mp</u> <sub>3</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL)   | FCH3<br>( <u>Hu</u> <sub>1</sub> 3x10 <sup>6</sup> células/mL)   |
| Acetato de isoamilo  | 0,077 <sup>b</sup> ± 1,0x10 <sup>-4</sup>                        | 0,093 <sup>a</sup> ± 1,2x10 <sup>-3</sup>                        | 0,079 <sup>b</sup> ± 1,1x10 <sup>-3</sup>                        |
| Acetato de isobutilo | 0,846 <sup>a</sup> ± 4,8x10 <sup>-2</sup>                        | 0,819 <sup>a</sup> ± 2,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,866 <sup>a</sup> ± 3,4x10 <sup>-2</sup>                        |
| Butanoato de etilo   | 0,265 <sup>a</sup> ± 0,4x10 <sup>-2</sup>                        | 0,271 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        | 0,275 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        |
| Decanoato de etilo   | 0,164 <sup>b</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        | 0,166 <sup>b</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        | 0,194 <sup>a</sup> ± 0,2x10 <sup>-2</sup>                        |
| Hexanoato de etilo   | 0,464 <sup>a</sup> ± 0,1x10 <sup>-2</sup>                        | 0,409 <sup>b</sup> ± 0,4x10 <sup>-2</sup>                        | 0,459 <sup>a</sup> ± 0,7x10 <sup>-2</sup>                        |
| 2-Feniletanol        | 7,545 <sup>b</sup> ± 5,6x10 <sup>-2</sup>                        | 8,106 <sup>a</sup> ± 9,2x10 <sup>-2</sup>                        | 7,130 <sup>b</sup> ± 3,1x10 <sup>-2</sup>                        |
| Ácido octanoico      | 1,467 <sup>a</sup> ± 6,4x10 <sup>-2</sup>                        | 1,558 <sup>a</sup> ± 4,4x10 <sup>-2</sup>                        | 1,634 <sup>a</sup> ± 7,2x10 <sup>-2</sup>                        |

<sup>a,b</sup>: La misma letra en la misma línea implica ausencia de diferencias significativas.

---

---

La comparación de las fermentaciones FCL1, FCM1 y FCH1, permitió detectar que los únicos compuestos que presentaron variaciones estadísticamente significativas entre ellas fueron el **acetato de isobutilo** y el **acetato de isoamilo**, registrándose la mayor concentración en FCH1 (Tabla 26B).

En las fermentaciones con mayor número de células inoculadas, la concentración más elevada de **acetato de isoamilo** y **2-feniletanol** se registró en FCM3. La diferencia frente a las obtenidas en FCL3 y FCH3 resultó significativa en ambos casos (Tabla 26C). En cambio, en FCM3 se registró la menor concentración de **hexanoato de etilo**. El otro compuesto que mostró diferencias considerables en su concentración fue el **decanoato de etilo**, siendo el valor registrado en FCH3 el más elevado (Tabla 26C).

Estos resultados permitieron concluir que la producción de **acetato de isobutilo** está vinculada de manera más significativa con la cepa Hu<sub>1</sub>. Al aumentar la concentración inicial de Hu<sub>1</sub> en el mosto de partida disminuye de manera proporcional la concentración final del compuesto, lo que repercute negativamente en el vino al disminuir la percepción aromática a bayas y flores. También se ha podido comprobar que la cepa Mp<sub>3</sub> está muy vinculada a la producción de **butirato de etilo**, **hexanoato de etilo** y **alcohol de feniletilo**, lo que favorecería la obtención de vinos con aromas frutales a piña, plátano y melocotón. Además, se puede afirmar que no se ha detectado ninguna vinculación destacable entre las levaduras analizadas y la producción de **acetato de isoamilo** (aroma a fruta dulce, plátano y pera), **decanoato de etilo** (notas frutales, uva) o **ácido octanoico** (aromas a fruta ácida y rancio). Asimismo, tampoco se ha podido establecer una relación estadísticamente significativa entre la producción de estos siete compuestos y la cepa Lt<sub>1</sub>.

El análisis de los datos obtenidos en los diferentes grupos de fermentaciones (individuales, dobles y complejas), permite concluir que para la producción de vinos de calidad y/o de autor, no es necesario inocular un gran número de levaduras, sino que es preferible hacer previamente una buena selección de

las cepas indígenas a utilizar. El estudio desarrollado, ha permitido comprobar que la concentración en el mosto de las cepas analizadas de *L. thermotolerans* (Lt<sub>1</sub>), *M. pulcherrima* (Mp<sub>3</sub>) y *H. uvarum* (Hu<sub>1</sub>) influye de modo significativo en la producción de compuestos volátiles directamente relacionados con la calidad de los vinos de la variedad *Tempranillo* como el hexanoato de etilo (piña, plátano), el octanoato de etilo (flores, melocotón) y el acetato de isobutilo (plátano, fruta dulce), entre otros.









V

# Discusión



---

---

A lo largo de más de 8.000 años poco ha variado el proceso biotecnológico de la fermentación del mosto de uva para la obtención de vino, si bien las circunstancias y los intereses de los consumidores a lo largo de la historia han promovido el desarrollo de pequeñas adaptaciones del proceso fermentativo. En la actualidad, la industria vitivinícola está volviendo a métodos de producción tradicionales con el objetivo de poner en el mercado más vinos ecológicos y naturales (Laureati and Pagliarini, 2016). Esta certificación se otorga en la Unión Europea a los vinos que son elaborados dentro del marco normativo “EU No 203/2012 del 8 de Marzo de 2012”, en el que se regula el tratamiento y recogida de la uva. Además, se hace mención a la inoculación de levaduras derivadas de materias primas ecológicas, como las levaduras indígenas, cuyo uso resulta muy interesante para diferenciar unos vinos de otros por el “*terroir*” que solo la microbiota levaduriforme puede otorgar en zonas caracterizadas por un mismo clima, suelo o variedad de uva (Rolandi and Saba, 2015). Este hecho ha promovido el desarrollo de estudios que permitan diferenciar eficazmente especies y cepas de levaduras, facilitando de esta manera que se pueda establecer una correlación entre su presencia durante la fermentación alcohólica y la obtención de vinos con propiedades organolépticas particulares, entre las que destacan el aroma y sabor (Cocolin y col., 2000; Romano y col., 2003). Este ha sido el gran objetivo del presente estudio, diseñar un procedimiento que permita identificar y diferenciar especies y cepas de levaduras indígenas para después estudiar de manera individual su influencia en el aroma de los vinos. Estos estudios aportan información muy relevante para los enólogos de las bodegas y quien sabe si en un futuro no muy lejano les llevará a prescindir de las bien asentadas cepas comerciales en pro de las levaduras indígenas de la bodega (Renault y col., 2009; Tofalo y col., 2014).

### **V.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS**

Hay varias técnicas moleculares que han sido ampliamente empleadas en las últimas décadas para la identificación y caracterización de levaduras

---

---

vínicas. Las levaduras indígenas están presentes en el hollejo de la uva, en el mosto en fermentación y en las instalaciones de las bodegas, y su variabilidad depende de muchos factores, entre los que se encuentran las condiciones climáticas, la variedad de la uva, el tipo de terreno o el uso de fungicidas (Guzzon y col., 2014). Mientras que en el hollejo de la uva son más habituales las levaduras de especies no-*Saccharomyces*, en las instalaciones de la bodega y en el mosto en fermentación predominan las especies del género *Saccharomyces*. Estas últimas han sido estudiadas en profundidad en numerosos trabajos (Nikolaou y col., 2006; Ribéreau-Gayon y col., 2006; Valero y col., 2005), mientras que las de los géneros no-*Saccharomyces*, menospreciadas en un principio, han despertado un creciente interés en los últimos 10-15 años por su vinculación con la producción de compuestos de interés en el vino (Cordero-Bueso y col., 2013; Domizio y col., 2009; Romano y col., 2003). No obstante, no son las especies como *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* o *Metschnikowia pulcherrima* las que presentan propiedades únicas, sino que son cepas concretas de éstas y otras especies las que aportan, o no, características diferenciales al aroma y al sabor del vino, en función de las propiedades del mosto y las condiciones del proceso fermentativo. Poder diferenciar estas cepas para estudiar su comportamiento a lo largo de la fermentación es lo que justifica el desarrollo de nuevos métodos de caracterización molecular..

La diferenciación de levaduras vínicas a nivel interespecífico se ha realizado habitualmente mediante la secuenciación y/o el análisis de restricción de regiones del ADN ribosómico amplificadas por PCR (Cocolin y col., 2000; Kurtzman and Robnett, 2003; Zott y col., 2008). Sin embargo, para llevar a cabo una diferenciación intraespecífica de las levaduras se requiere de otras técnicas como la restricción del ADN mitocondrial, la secuenciación de fragmentos de ADN amplificadas y separados mediante PCR-DGGE o la obtención de marcadores RAPD (Howell y col., 2004; Lopandic y col., 2008; Lopez y col., 2003). Todas estas técnicas han sido empleadas ampliamente para la diferenciación de cepas de *S. cerevisiae*, pero no en la caracterización de cepas de especies no-*Saccharomyces*, posiblemente debido a que se

requiere un conocimiento previo del genoma o a que presentan una baja reproducibilidad.

Otro tipo de marcadores moleculares utilizados en la caracterización de cepas de levaduras vínicas son los AFLP (de Barros Lopes y col., 1999; Flores Berrios y col., 2005). Estos marcadores presentan la ventaja de que no es necesario un conocimiento previo del genoma para su aplicación y es una técnica que rastrea el genoma completo y no una región concreta como la correspondiente a la subunidad 18S o 26S del ADN ribosómico. Además, es una técnica con una buena reproducibilidad, pese a que requiere de un entrenamiento y habilidades bien desarrolladas para la obtención de resultados precisos (Esteve-Zarzoso y col., 2010).

En este trabajo se ha realizado una caracterización de levaduras indígenas utilizando marcadores AFLP, con el fin de diferenciar cepas, preferentemente de géneros no-*Saccharomyces*, y estudiar después su potencial enológico. El estudio se ha hecho a partir de 1.200 colonias de levadura aisladas de muestras procedentes de 17 pagos diferentes y recogidas durante las vendimias de 2010, 2011 y 2012 de las bodegas *Áster* y *Díaz Bayo*. Estas levaduras fueron seleccionadas en base a criterios clásicos (morfología y color de colonia, morfología celular, etc.) y caracterizadas a nivel de especie usando las técnicas moleculares más habituales para ello: análisis ITS-RFLP y secuenciación de la región D1/D2 del ARN ribosómico. De este modo se identificaron levaduras de las especies: *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia anomala*, *Pichia carsonii*, *Candida maltosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*. La variabilidad de especies obtenida en este estudio está acorde con resultados obtenidos en trabajos similares realizados en España con mostos de las variedades *Syrah*, *Cabernet Sauvignon* y *Tempranillo*, si bien esta última variedad es la que presentó una mayor diversidad de levaduras. (Fernández-González and Briones, 2013; Ortiz y col., 2013).

---

---

La caracterización molecular mediante marcadores AFLP se hizo con 43 levaduras aisladas de los mostos que originaron los vinos mejor valorados por los enólogos de las bodegas colaboradoras. La selección de las levaduras estudiadas de cada especie, se hizo en base a su abundancia relativa respecto al total de aislados analizados. Se trabajó con once aislados de *M. pulcherrima*, seis de *L. thermotolerans*, cuatro de *H. uvarum*, tres de *T. delbrueckii*, cuatro de *P. anomala*, seis de *S. uvarum* y nueve de *S. cerevisiae*. De todas ellas se obtuvieron los marcadores AFLP amplificados con 7 pares de oligonucleótidos diferentes, marcados con los fluoróforos HEX (Q, J, M y N) o FAM (H, G y S). El análisis de los electroferogramas permitió seleccionar los pares de oligonucleótidos denominados S (GACTGCGTACCAATTCAC / GATGAGTCCTGAGTAAT) y J (GACTGCGTACCAATTCTA / GATGAG-TCCTGAGTAACT) por ser los que permitían una mejor diferenciación debido a que generaban mayor complejidad y variabilidad de alelos AFLP. La utilidad del par de oligonucleótidos J en la caracterización de cepas de levadura había sido demostrada previamente en el trabajo de Spadaro y col. (2008), en el que se determinaron las diferencias en los perfiles AFLP de 26 cepas de levadura aisladas de muestras de manzana, uva y mosto en diferentes regiones de Italia y España.

Utilizando estos dos pares de oligonucleótidos, se obtuvieron más de trescientos electroferogramas que se compararon entre sí. La comparación de los perfiles obtenidos con diferentes levaduras de una misma especie permitieron identificar alelos AFLP comunes entre todas ellas y que en principio constituirían la huella molecular AFLP específica de una especie. Resultados similares se obtuvieron en el análisis de levaduras vínicas comerciales e indígenas de diferente procedencia, utilizando el par de oligonucleótidos AGACTGCGTACCAATTCC / GATGAGTCCTGAGTAAAC (de Barros Lopes y col. de 1999), La comparación de la huella molecular específica de las siete especies incluidas en este estudio, permitió eliminar aquellos alelos compartidos por diferentes especies y de este modo se

---

podieron detectar los alelos AFLP específicos de cada especie asociados a los cebadores S y J.

Una vez establecidos los perfiles específicos de especie, la comparación de los electroferogramas obtenidos de diferentes levaduras de una misma especie permitió identificar alelos que aparecían en algunas de ellas y no en otras. El análisis detallado de todos los electroferogramas permitió identificar alelos específicos de cepa que sirvieron para diferenciar cepas a partir de las levaduras indígenas estudiadas. En concreto, se detectaron dos cepas de *L. thermotolerans*, dos de *H. uvarum*, una de *P. anomala*, dos de *T. delbrueckii*, cuatro de *M. pulcherrima*, dos de *S. cerevisiae* y dos de *S. uvarum*. Estudios similares realizados con otros pares de oligonucleótidos sirvieron para diferenciar cepas de levaduras vínicas procedentes de uva *Garnacha* del Noroeste de España (Esteve-Zaroso y col. (2010). En este trabajo se describe una mayor variabilidad de cepas que la detectada en nuestro estudio, algo que puede deberse a factores como el clima, la variedad de uva o la región de recolección.

La comparación de todos los electroferogramas obtenidos en el estudio, han permitido definir la huella molecular de alelos AFLP específica para 7 especies y 22 cepas de levaduras vínicas (15 indígenas, 2 comerciales y 5 levaduras de la CECT), empleando los pares de oligonucleótidos S y J. Además, con estos marcadores se ha generado una base de datos que incluye un total de 44 perfiles de alelos AFLP con la que se pueden diferenciar estas 22 cepas de levaduras pertenecientes a las especies *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *H. uvarum*, *P. anomala*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* y *S. uvarum*. Esta base de datos es complementaria a otras que se emplean con la misma finalidad, como la base de datos *yeast-id* (ITS-RFLP) y las bases de secuencias génicas como el *GeneBank*, donde se pueden comparar secuencias de regiones ribosómicas. La fiabilidad y eficacia de la herramienta se ha verificado analizando levaduras tipo procedentes de la CECT y otras levaduras aisladas en este trabajo y caracterizadas mediante ITS-RFLP y secuenciación de la región D1/D2. La ventaja de esta herramienta es que

---

---

permite la identificación no sólo de especies, sino también de cepas, si bien para esto es necesario que sus perfiles AFLP hayan sido previamente caracterizados e incluidos en la base de datos. De ahí la necesidad de seguir ampliando esta base de datos con levaduras vínicas de otras bodegas y regiones de España y del mundo.

En la actualidad son numerosos los trabajos dirigidos a la caracterización y estudio de las levaduras vínicas pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces*, con el objetivo de demostrar la influencia positiva de muchas de ellas en la fermentación y desmentir la concepción que se tenía de ellas como perjudiciales (Ciani y Comitini, 2011; Cordero-Bueso y col., 2013; Garofalo y col., 2016). El haber desarrollado un método que posibilita la identificación y caracterización de levaduras vínicas indígenas, principalmente de géneros no-*Saccharomyces*, y que permite una discriminación a nivel de cepa sin la necesidad de conocer el genoma de la levadura supone una ventaja, ya que a día de hoy la información genética disponible para la identificación de cepas de levadura pertenecientes a estos géneros es escasa. Ésta es la primera base de datos de marcadores AFLP que se ha generado para la identificación de especies y cepas de levaduras vínicas, incluyendo cepas no-*Saccharomyces* y también algunas *Saccharomyces*. Esta herramienta es complementaria a otras técnicas descritas para la identificación de cepas de levadura, como el análisis de regiones microsatélites o el uso de la RT-PCR, muy empleadas en la identificación de levaduras vínicas del género *Saccharomyces* (Ma y col., 2015; Martiniuk y col., 2016; Sakihama y col., 2015). Si bien, la RT-PCR también ha sido utilizada para la identificación de algunas especies no-*Saccharomyces* como *H. uvarum* (Zott y col., 2010).

## **V.2. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN MUESTRAS COMPLEJAS**

Existen varios estudios que muestran que tanto la concentración, como las especies de levadura presentes en el mosto al inicio de la fermentación,

---

son factores que influyen en el correcto desarrollo del proceso fermentativo (Carrau y col., 2015; Ivanova-Petropulos y col., 2015). Este hecho llevó a estudiar la posibilidad de usar la base de datos AFLP, previamente descrita, para la identificación de levaduras vínicas presentes en muestras complejas, como el mosto de uva durante el proceso fermentativo. Para ello, fue necesario establecer el límite de detección del método y poner a punto un procedimiento de purificación de ADN de todas las levaduras presentes en el mosto de uva.

Utilizando muestras con mezclas de levaduras de diferentes especies o de ADN purificado de las mismas, se pudo determinar que la concentración mínima de levaduras necesaria para una identificación eficiente mediante el procedimiento AFLP descrito es de  $10^4$  células/mL para el género *Saccharomyces* y de  $10^5$  células/mL para levaduras de géneros no-*Saccharomyces*. Esta diferencia de un orden de magnitud en el número de células necesarias para la identificación puede ser debido a una menor eficiencia del método de purificación de ADN para las levaduras de los géneros no-*Saccharomyces*. Los métodos de purificación de ADN de levadura se ponen a punto generalmente para *S. cerevisiae* y un paso crítico es la rotura eficiente de su pared celular. Por ello, es posible que el procedimiento utilizado no sea igual de efectivo con levaduras silvestres de géneros no *Saccharomyces*, de las que desconocemos la composición exacta de su pared celular. No obstante, el límite establecido no es muy diferente al de otras técnicas como por ejemplo la PCR-DGGE ( $10^4$  células/mL), ampliamente utilizada para la identificación de cepas de levadura (Andorrá y col., 2008; Cocolin y col., 2000; Mills y col., 2002).

La técnica de RT-PCR es la más eficiente, con un límite de detección que oscila entre 1 y 100 células/mL dependiendo de la especie de levadura. El problema de este método es que de momento sólo se puede aplicar a la identificación de algunas especies como *S. cerevisiae* (Wang y col., 2015) o *H. uvarum* (Zott y col., 2010), empleando cebadores específicos de las regiones ITS. Además, la técnica RT-PCR no permite la discriminación entre

---

---

cepas (Zott y col., 2010), algo que si que es posible utilizando marcadores AFLP (Baselga et col., 2016; Esteve-Zaroso y col., 2010). Sin embargo, la RT-PCR genera resultados cuantitativos, cosa que no ocurre con los AFLP y por lo tanto no sirven para el estudio de dinámicas de poblaciones. No obstante, un estudio más detallado de los alelos AFLP específicos de cepa y especie, podría ser de gran utilidad para el diseño de cebadores específicos que permitan la identificación y cuantificación de levaduras mediante RT-PCR. Durante el desarrollo de este trabajo, el análisis de 28 alelos AFLP obtenidos con los pares de oligonucleótidos J y S ha permitido diseñar un par de oligonucleótidos específicos para la especie *L. thermotolerans* y otro par específico para la cepa de *M. pulcherrima* Mp<sub>3</sub> (datos no mostrados). Actualmente, se están realizando pruebas con estos cebadores para determinar su aplicabilidad en análisis de RT-PCR. Estos datos abren la puerta a un estudio más ambicioso que permita el diseño de cebadores específicos para las levaduras más interesantes desde el punto de vista enológico, pudiendo así realizar estudios de dinámica de poblaciones durante el proceso fermentativo, un objetivo muy perseguido pero difícil de abordar por la escasez de herramientas específicas para las levaduras no-*Saccharomyces*. Estudios de este tipo ya se han realizado en la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* y *S. uvarum* aisladas en diferentes regiones de Estados Unidos, Nueva Zelanda o Australia en base a la amplificación de regiones microsatélites (Howell y col., 2004; Zhang, H. y col., 2016).

Determinado el límite de detección, fue necesario poner a punto un procedimiento que garantizase la integridad del ADN aislado de las levaduras presentes en una muestra de mosto sin la necesidad de cultivos microbiológicos. Basándose en métodos previamente descritos (Andorrá y col., 2008; Cocolin y col., 2000), se ha puesto a punto un procedimiento que incluye un pre-tratamiento químico-enzimático (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y proteinasa-K) de las muestras de mosto, que sirve para eliminar compuestos que interfieren negativamente en la purificación del ADN y el tratamiento posterior para la obtención de los AFLP (reacciones de

---

---

restricción/ligación). Con este procedimiento se purificó el ADN total de 24 muestras de mosto y se obtuvieron sus perfiles AFLP. Los electroferogramas obtenidos eran bastante más complejos que los generados a partir de un cultivo puro de una levadura concreta, pero el algoritmo de comparación de la base de datos permitió la identificación de las levaduras que habían sido caracterizadas previamente en cada mosto mediante aislamiento de colonias y la obtención de cultivos puros. Como era de esperar, la complejidad de los electroferogramas obtenidos de las muestras de mosto variaba en función del origen de la muestra y el estadio de fermentación del mosto, pero la herramienta generada permitió una eficiente detección de las levaduras presentes en todas las muestras analizadas. Además, se han detectado alelos AFLP que no se amplifican en ninguna de las cepas de levadura analizadas, lo que sugiere que en algunas muestras de mosto hay levaduras que o bien no fueron elegidas durante la selección aleatoria de las colonias o no crecieron en los medios y las condiciones de cultivo empleados en este trabajo.

Estos datos, permiten concluir que la herramienta desarrollada en base a marcadores AFLP es altamente eficiente y permite detectar alelos de todas las levaduras presentes en el mosto siempre que su concentración esté por encima de  $10^4$  o  $10^5$  células/ml dependiendo de si son del género *Saccharomyces* o no.

Por ello, el método desarrollado constituye una herramienta de gran interés para los productores de vino, ya que permite conocer las poblaciones de levaduras presentes en las muestras de mosto independientemente del estadio de fermentación. Además, es posible que en un futuro, a partir de alelos AFLP, se pueda disponer de cebadores específicos de cepa que permitan la cuantificación de estas levaduras a lo largo de la fermentación, pudiendo así estudiar las dinámicas poblacionales a lo largo del proceso fermentativo en función de las condiciones fijadas. Esto permitiría controlar mejor las fermentaciones realizadas con las levaduras indígenas de la bodega, garantizando la producción de vinos de alta calidad que conserven

---

---

el “*terroir*” característico (Dashko y col., 2015; Garofalo y col., 2015). En conclusión, se puede afirmar que la técnica de AFLP permite una caracterización eficiente de las levaduras indígenas presentes en las viñas e instalaciones de la bodega, pero para poder incrementar su utilidad es necesario expandir la base de datos generada añadiendo nuevos perfiles AFLP de levaduras pertenecientes a otras regiones y/o diferentes variedades de uva. Además, esta diferenciación debe de ir acompañada de un estudio posterior de las diferentes cepas en cuanto a su potencial fermentativo y las características organolépticas que aportan a los vinos.

### V.3. ESTUDIO DEL POTENCIAL ENOLÓGICO DE TRES CEPAS DE LEVADURAS INDÍGENAS: Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> Y Hu<sub>1</sub>.

El aroma secundario de los vinos, o aroma fermentativo, es el que se vincula a las levaduras que llevan a cabo la fermentación del mosto (Antalick, Tempere, y col., 2015; Schreier and Jennings, 1979). Cuando estas son las levaduras indígenas de una bodega, el aroma fermentativo que se obtiene constituye el “*terroir*” de la bodega. Poder establecer un vínculo entre la caracterización de las levaduras indígenas de una bodega, el perfil aromático de un vino y el “*terroir*” de la bodega es el objetivo perseguido por todos aquellos que pretenden innovar en enología y hacer vinos de autor de alta gama. Éste era también el objetivo global de este trabajo y por ello se estudió la influencia de las levaduras indígenas no-*Saccharomyces* previamente identificadas de las bodegas *Áster* y *Díaz Bayo*, en el perfil aromático del mosto fermentado.

Existen numerosas bodegas en diferentes regiones vitivinícolas con gran interés en estudios de este tipo, es por ello que en trabajos recientes se muestra como ciertas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones mixtas o secuenciales junto a *S. cerevisiae*, influyen positivamente en la producción de compuestos volátiles deseables en los vinos de calidad (Liu y col., 2016; Benito y col., 2015; Andorrà y col., 2010). Algunas de estas levaduras son *M. pulcherrima* 75, Concerto™ (L.

---

---

thermotolerans) y HuB10 (*H. uvarum*), las cuales al inocularse junto a *S. cerevisiae* (EC1118) en mostos de uva de diferentes variedades (*Cabernet Sauvignon*, *Riesling* y *Macabeo*), se han vinculado con la producción de acetato de isobutilo (aroma a grosella y jacinto rosa), 2-feniletanol (aroma a melocotón y rosa) y ácido octanoico (aroma a fruta ácida y rancio) respectivamente,.

De todas las cepas de levaduras indígenas no-*Saccharomyces* aisladas y caracterizadas en este trabajo, se seleccionaron ocho para estudiar en más detalle su comportamiento fermentativo analizando sus aportaciones al aroma del mosto fermentado. De las ocho cepas analizadas (Mp<sub>1</sub>, Mp<sub>2</sub>, Mp<sub>3</sub>, Mp<sub>4</sub>, Hu<sub>1</sub>, Hu<sub>2</sub>, Lt<sub>1</sub> y Lt<sub>2</sub>), las cepas Mp<sub>3</sub>, Hu<sub>1</sub>, y Lt<sub>1</sub> fueron las mejor valoradas por el panel de cata en las fermentaciones individuales, con puntuaciones que oscilaron entre 7 y 8,4 sobre 9, destacando como buenas productoras de hexanoato de etilo, acetato de isobutilo y octanoato de etilo, lo que supondría una mayor percepción frutal a plátano, piña y melocotón en los vinos.

La mayor producción de hexanoato de etilo se registró en la fermentación realizada con Mp<sub>3</sub> y la cepa comercial de *S. cerevisiae* ES42 (Sc<sub>0</sub>), siendo al menos un 22% superior a la obtenida en las demás fermentaciones. Por ello, se puede afirmar que el empleo de la cepa comercial ES42 (Sc<sub>0</sub>) en combinación con la cepa indígena Mp<sub>3</sub>, aseguraría la percepción a plátano en el aroma del vino, un efecto que no ha sido descrito con anterioridad para *M. pulcherrima*. Sin embargo, en fermentaciones realizadas por Mp<sub>3</sub> con la cepa indígena de *S. cerevisiae* Sc<sub>1</sub>, la producción de hexanoato de etilo era menor a la de las demás fermentaciones. Resultados similares a este se han obtenido en estudios en los que se emplearon diferentes cepas de *M. pulcherrima* (Flavia® y seis cepas de la colección SAIFET) en co-cultivos con la cepa EC1118 (*S. cerevisiae*) en mostos de diferentes variedades (Benito y col., 2015; Comitini y col., 2011). En estos trabajos, la presencia de *M. pulcherrima* hacía que la concentración de hexanoato de etilo en el vino fuera menor, dando lugar a una menor percepción a plátano en el aroma del vino.

---

---

En lo referente a la producción de acetato de isobutilo (aromas a grosella y jacinto rosa), destacó la cepa indígena de *L. thermotolerans* Lt<sub>1</sub>. La inoculación secuencial de esta cepa con Sc<sub>1</sub> (FD7) o Sc<sub>0</sub> (FD15), generó una concentración de acetato de isobutilo al menos un 29% superior a la obtenida en presencia de las demás cepas no-*Saccharomyces*. Estudios similares realizados con otras cepas de *L. thermotolerans* (Concerto<sup>TM</sup> o CLI1219) junto a *S. cerevisiae* (EC1118) en fermentaciones secuenciales no han supuesto una mayor producción de acetato de isobutilo en vinos de la variedad *Malvar* (*Bañuelos y col., 2016*) y *Tempranillo* (*Cordero-Bueso y col., 2013*). No obstante, el efecto registrado en nuestro estudio con la cepa Lt<sub>1</sub> es destacable, confirmando la gran importancia de las cepas empleadas en la fermentación para obtener vinos con unos u otros matices aromáticos (*Garofalo y col., 2016*).

La producción de octanoato de etilo se ha relacionado con la presencia de la cepa indígena de *H. uvarum* Hu<sub>1</sub> en el mosto. En fermentaciones individuales realizadas con 5x10<sup>7</sup> células/mL de Hu<sub>1</sub>, se detectó una concentración de octanoato de etilo al menos un 17% mayor a la obtenida en las demás fermentaciones. Este compuesto no fue analizado en las fermentaciones dobles de este trabajo, pero en un estudio reciente se han vinculado diferentes cepas de *H. uvarum* (ITEM8795, ITEM8797 y ITEM8799) inoculadas simultáneamente con *S. cerevisiae* (ITEM6920), con la producción de octanoato de etilo en vinos de la variedad *Negroamaro* (*Tristezza y col., 2016*). En este trabajo se demuestra como la presencia de estas cepas de *H. uvarum* promueven incrementos del 50% en la concentración de octanoato de etilo frente a fermentaciones realizadas únicamente por *S. cerevisiae*. Sin embargo, en otros estudios realizados en mostos tintos de las variedades *Macabeo* o *Cabernet Sauvignon*, la inoculación simultánea de cepas de *H. uvarum* (HuB10 o *H. uvarum*15) y *S. cerevisiae* (QA23 o BDX) no generó una mayor concentración de octanoato de etilo en relación a la obtenida con cepas de *Candida stella* o *Metschnikowia pulcherrima* (*Andorrà y col., 2010*; *Liu y col., 2016*). Estos datos, junto con los obtenidos en este y otros estudios, sostienen que sólo

---

---

algunas cepas de *H. uvarum* influyen positivamente en la percepción a melocotón y flores en el vino. Asimismo, debe de tenerse en cuenta que la cuantificación de octanoato de etilo en el presente estudio no se realizó en presencia de *S. cerevisiae* (fermentaciones dobles), mientras que en los trabajos referenciados si, lo que asegura una fermentación completa, por lo tanto no puede establecerse una relación exacta entre los diferentes resultados.

Seleccionadas las tres cepas por su aporte a las propiedades organolépticas del vino a través de la producción de hexanoato de etilo, acetato de isobutilo y octanoato de etilo, con el fin de desarrollar en el laboratorio fermentaciones fieles a las que tienen lugar en las bodegas de manera natural y poder estudiar en mayor detalle el aporte aromático de Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub>, estas fueron utilizadas en combinación con Td<sub>1</sub>, Sc<sub>1</sub> y Su<sub>1</sub>.

### V.3.1. Fermentaciones complejas: aromas frutales y florales

El carácter afrutado de los vinos se debe en gran medida a la combinación de ésteres y acetatos producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Los resultados obtenidos muestran que la presencia en el mosto de partida de las levaduras en estudio Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub> en combinación con Td<sub>1</sub>, Sc<sub>1</sub> y Su<sub>1</sub>, provocaba un descenso estadísticamente significativo en la concentración final de acetato de isobutilo y acetato de isoamilo. En estudios similares en los que se ha inoculado una cepa de *L. thermotolerans* (Concerto<sup>TM</sup>), *M. pulcherrima* (Flavia®) o *H. uvarum* (n.d.) secuencialmente junto a una cepa de *S. cerevisiae* (EC1118 o 7VA) en mosto de la variedad *Tempranillo*, también se ha registrado una menor producción de ambos acetatos en comparación a los valores obtenidos al emplear otras levaduras no-*Saccharomyces* como *T. delbrueckii* (cepa 291) o al inocular *S. cerevisiae* en solitario (Bañuelos y col., 2016; Herraiz y col.,1990). Asimismo, en el trabajo de Benito y col. (2015), se demostró que en mostos

---

---

blancos de la variedad *Riesling* la inoculación secuencial de las cepas Concerto™ y EC1118 resultó en una mayor producción de acetato de isoamilo en comparación al valor registrado en la fermentación llevada a cabo por Flavia® y EC1118 en las mismas condiciones. Se pudo así concluir que la presencia en el mosto de partida de las cepas Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub>, como sucede con las empleadas en otros estudios, supone una menor percepción a aromas frutales (grosella, plátano y pera) y florales (jacinto rosa) en el vino. Estos datos refuerzan nuestra afirmación de que la selección de las cepas y su combinación al inicio de la fermentación resulta decisiva para la producción de algunos de los compuestos volátiles que aportan carácter al vino.

La producción de acetato de hexilo ha resultado significativamente dependiente de la concentración en el mosto de partida de Lt<sub>1</sub> o Hu<sub>1</sub>. Únicamente en las fermentaciones FCL3 y FCH3, el compuesto fue cuantificado por encima de su umbral mínimo de percepción ( $2 \cdot 10^3$  mg/L), alcanzando valores de  $2,3 \cdot 10^3$  mg/L y  $2,4 \cdot 10^3$  mg/L en FCL3 y FCH3 respectivamente. En base a estos resultados, se pudo afirmar que para hacer perceptibles en el aroma del vino las notas frutales y florales del acetato de hexilo, las cepas Lt<sub>1</sub> o Hu<sub>1</sub> deben estar presentes a concentraciones iguales o superiores a  $3 \cdot 10^6$  células/mL. La influencia del género *Hanseniaspora* en la producción de acetato de hexilo fue descrita con anterioridad para la fermentación de mosto de la variedad portuguesa *Douro* (Moreira y col., 2008). En el trabajo de Moreira y col., la cepa PYCC4193T de *H. uvarum* y/o la cepa NCYC2380 de *H. guillermondi*, se inocularon simultáneamente con *S. cerevisiae* (PYCC3507T) a una concentración de  $10^5$ - $10^6$  células/mL cada una, resultando ser ambas cepas no-*Saccharomyces* fundamentales para la producción del compuesto. Si bien, en ninguna de las fermentaciones descritas en este trabajo se alcanzó una concentración perceptible de acetato de hexilo, hecho que puede deberse a las cepas empleadas en cada estudio, a la complejidad microbiológica durante la fermentación o a la variedad de mosto. En referencia al papel de la especie *L. thermotolerans* en la producción de

acetato de hexilo, en varios trabajos se describe como no significativo. En trabajos previos realizados con mosto *Malvar* inoculado individualmente con la cepa de *L. thermotolerans* CL11219 (Cordero-Bueso y col., 2013) o con mosto *Riesling* inoculado con la cepa *L. Thermotolerans* Concerto™ junto a *S. cerevisiae* EC1118 (Benito y col., 2015), la cantidad de acetato de hexilo detectada en ambos casos fue menor a la obtenida en presencia de otras levaduras. El mismo resultado se ha descrito al inocular mosto tinto de la variedad *Syrah* (Trentino, Italia) con  $10^6$  células/mL de la cepa comercial Concerto™ (Whitener y col., 2015). Hay que tener en cuenta, que en dos de estos estudios las cepas de *L. thermotolerans* fueron inoculadas de manera individual, mientras que en el presente trabajo Lt<sub>1</sub> fue inoculada en conjunto con otras levaduras. Este dato es importante, ya que la interacción entre las poblaciones de levaduras presentes en el mosto, a lo largo del proceso fermentativo, es fundamental en la producción de numerosos compuestos esenciales para el aroma del vino, y es esto lo que hace posible la percepción aromática de matices frutales a cereza, pera, manzana y/o flores. Además, la influencia de *L. thermotolerans* en la producción de ciertos compuestos volátiles se asocia no sólo a su presencia, sino al modo de inoculación y a la temperatura del proceso (19-20 °C en todos los casos), siendo mayor su persistencia e influencia en inoculaciones secuenciales y a bajas temperaturas (Gobbi y col., 2013). Estos datos sirven para reforzar nuestra afirmación de que la presencia de las cepas Lt<sub>1</sub> y Hu<sub>1</sub> en el mosto bajo las condiciones empleadas en nuestro estudio, favorecen la percepción de aromas frutales en los vinos de la variedad *Tempranillo* debido al incremento en la concentración final de acetato de hexilo.

Los datos obtenidos sobre el análisis de ésteres, mostraban que cuanto mayor era el número inicial de células de Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub>, mayor era la concentración final de hexanoato de etilo (piña/plátano), butirato de etilo (piña) y decanoato de etilo (uva/brandy). Resultados similares se han obtenido con otras cepas de estas mismas especies. En el trabajo de Sadoudi y col. (2012), la cepa MCR-24 (*M. pulcherrima*) se inoculó secuencialmente junto a PB2023 (*S. cerevisiae*) en mosto de la variedad

---

---

*Sauvignon Blanc*, registrándose una mayor concentración en el mosto fermentado de hexanoato de etilo, butirato de etilo y decanoato de etilo en comparación a la obtenida al emplear las cepas BB-MV:3FA5 (*T. delbrueckii*) o MCR-9 (*C. zemplinina*). Lo mismo se ha descrito en el estudio de Andorrà y col. (2010) para la cepa HuB10 de *H. uvarum*, inoculada junto a QA23 (*S. cerevisiae*) en mosto *Macabeo*, en comparación a la inoculación de *C. zemplinina* (Csz4) junto a *S. cerevisiae* (QA23). La inoculación individual de la cepa CLI1219 de *L. thermotolerans* en mosto *Malvar*, también ha resultado en una producción significativamente mayor de estos ésteres en comparación a otras especies especies como *C. stella* (CLI920) y *L. fermentati* (CLI1220) (Cordero-Bueso y col., 2013). Todos estos datos periten por tanto afirmar que independientemente de la cepa, la presencia de *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima* o *H. uvarum* durante la fermentación alcohólica, favorece la producción de esterres importantes para la percepción frutal a piña, plátano y uva en el vino.

En cuanto al octanoato de etilo (aromas florales y melocotón), a mayor concentración inicial de  $Lt_1$  y  $Mp_3$  mayor concentración del compuesto en el mosto fermentado (21,5 y 53,1% respectivamente). Por el contrario, el incremento en el número de células inoculadas de  $Hu_1$  supone en un descenso en la concentración de octanoato de etilo en el producto final. El efecto descrito en la producción de este compuesto en función de la presencia de *M. pulcherrima* y *H. uvarum*, está de acuerdo con resultados previos obtenidos con inoculaciones mixtas de las cepas MCR-24/PB203 (*M. pulcherrima/S. cerevisiae*) y HuB10/QA23 (*H. uvarum/S. cerevisiae*) (Sadoudi y col., 2012); Andorrà y col., 2010). Sin embargo, en lo que se refiere a la especie *L. thermotolerans*, en el estudio publicado por Comitini y col. (2011) se describe el efecto opuesto. Diferentes cepas de *L. thermotolerans* (SAIFET93, 101, 103, 105 y 107) en combinación con *S. cerevisiae* (EC1118), producen una cantidad de octanoato de etilo inferior a la de otras levaduras. Como ya se ha mencionado anteriormente, en lo que respecta a la eficiencia de las cepas de *L. thermotolerans* en la producción de compuestos volátiles, dependen de manera destacada las condiciones

en las que tiene lugar el proceso, habiéndose desarrollado la fermentación en el presente estudio a 19°C y en el de Comitini a 25 °C. Estas variaciones pueden justificar las diferencias en los resultados, si bien las cepas empleadas en cada estudio pueden presentar propiedades únicas, como se defiende en este trabajo.

Respecto al valerato de etilo, la cepa Mp<sub>3</sub> ha sido la única que ha demostrado una influencia estadísticamente significativa en su producción, siendo la máxima concentración registrada de este compuesto la que se obtuvo en FCM3 (inoculo de  $3 \cdot 10^6$  células/mL de Mp<sub>3</sub>). Por ello, se asoció la presencia de Mp<sub>3</sub> durante la fermentación con la producción de vinos con una mayor percepción aromática a manzana.

A parte de los acetatos y ésteres, otro de los compuestos volátiles analizados muy apreciado por sus descriptores aromáticos a rosa y melocotón, es el alcohol de feniletilo. En este trabajo se ha demostrado que el aumento en el número de células inoculadas de las cepas Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> y Hu<sub>1</sub> produce un descenso estadísticamente significativo en la concentración de este compuesto, aunque nunca por debajo de su umbral mínimo de percepción (0,015 mg/L). No se han localizado datos sobre este compuesto vinculados a otras cepas de *L. thermotolerans* o *M. pulcherrima*, sin embargo se ha descrito que en presencia de *H. uvarum* (PYCC4193T) en fermentaciones simultáneas con *H. guillermondi* (NCYC2380) y/o *S. cerevisiae* (PYCC3507) en mosto de la variedad *Tinta Roriz*, se registra una menor concentración de 2-feniletanolque en su ausencia (Moreira y col., 2005).

### V.3.2. Fermentaciones complejas: aromas no deseados

El acetato de etilo es uno de los acetatos más habituales en los vinos y suele hallarse en concentraciones comprendidas entre los 50 y los 100 mg/L, potenciando en los vinos las codiciadas notas frutales. No obstante, en concentraciones superiores a los 150 mg/L aparecen en el aroma notas

---

---

a barniz, características de vinos de mala calidad, por lo que el empleo de cepas de levaduras que permitan controlar la concentración de este compuesto resulta muy interesante (Barth y col., 1994). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de Lt<sub>1</sub> y Mp<sub>3</sub> al inicio de la fermentación alcohólica provocan una disminución en la concentración de acetato de etilo (descenso comprendido entre un 17 y un 26%). Cabe destacar que no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la producción de acetato de etilo dependientes de la concentración inicial de Lt<sub>1</sub>, mientras que si que las hay en función del número de células inoculadas de Mp<sub>3</sub>. Los estudios con Hu<sub>1</sub> indican que al incrementar la concentración inicial de Hu<sub>1</sub> en el mosto, se produce un aumento en la concentración final de acetato de etilo (un 36% mas). Las levaduras apiculadas *H. uvarum* y *H. apiculata* se han descrito previamente como productoras de acetato de etilo (Ciani y Maccarelli (1997). No obstante, las concentraciones registradas en dicho estudio con mosto blanco de la variedad *Trebbiano Toscano*, alcanzaron valores diez veces más elevados a los obtenidos en este trabajo, debido, indudablemente, a la presencia única de estas levaduras durante la fermentación. Asimismo, debe caerse en la cuenta de que en esta tesis la máxima concentración registrada de acetato de etilo osciló entre 36 y 44 mg/L, dependiendo de la línea experimental, pero siempre en presencia de Hu<sub>1</sub>, no habiéndose alcanzado en ninguna de las fermentaciones los 50 mg/L necesarios para hacer notorio el aporte del compuesto al aroma frutal del vino (Barth y col., 1994).

Otros compuestos volátiles altamente vinculados con aromas desagradables en los vinos son los ácidos (Escudero y col., 2004), aunque también se ha demostrado su influencia en la percepción de matices afrutados (Ferreira y San Juan, 2011). Se puede decir que un incremento en el número de células inoculadas de Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub>, produce un descenso estadísticamente significativo de la concentración de ácido octanoico (piel de manzana, rancio) en el mosto fermentado, que oscila entre 15,6 y 28,4%. Hay datos previos que avalan este resultado, en concreto trabajos

realizados con mostos de uva tinta de las variedades *Tempranillo*, *Bobal* y *Syrah* inoculados con cepas de *M. pulcherrima* (Flavia®), *H. uvarum* (CECT11106 entre otras) y *L. thermotolerans* (Concerto™) (Bañuelos y col., 2016;; Viana y col., 2008; Whitener y col., 2015).

La información recogida y descrita a lo largo del presente estudio, se utilizó para la producción de vinos en la bodega *Díaz Bayo*. Se utilizaron las levaduras indígenas Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub>, Hu<sub>1</sub>, Td<sub>1</sub>, Sc<sub>1</sub> y Su<sub>1</sub> crecidas en el laboratorio de la Universidad Francisco de Vitoria y se prescindió de la levadura comercial ES42 (*S. cerevisiae*). Los mostos fermentados con estas levaduras durante las vendimias de 2012 y 2013 fueron utilizados para la producción de un vino joven (*Dardanelos*) y un vino reserva (*Nuestro 12 años*), conservando de este modo el “*terroir*” de la bodega. Este hecho da un valor añadido al trabajo presentado, reforzando la utilidad y eficiencia del método AFLP para la selección de levaduras indígenas y remarcando la importancia de conocer el comportamiento de las levaduras durante la fermentación y los metabolitos que produce y que modulan el perfil aromático del vino.









VI

Conclusiones



- 1ª. El análisis mediante técnicas moleculares clásicas de 1.200 aislados de levaduras procedentes de 17 pagos de la Ribera del Duero, ha permitido diferenciar nueve especies de levaduras vínicas indígenas.
- 2ª. La caracterización mediante marcadores moleculares AFLP de 43 levaduras indígenas, 2 cepas comerciales y 5 levaduras tipo, pertenecientes a 7 especies diferentes, ha permitido diferenciar 22 cepas de levaduras vínicas: 5 de *Metschnikowia pulcherrima*, 2 de *Pichia anomala*, 3 de *Lachancea thermotolerans*, 3 de *Hanseniaspora uvarum*, 3 de *Torulaspora delbrueckii*, 3 de *Saccharomyces uvarum* y 3 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3ª. Se ha generado una base de datos de marcadores AFLP que permite la identificación de levaduras vínicas a nivel de especie y/o cepa, en base a los 44 perfiles AFLP obtenidos a partir de muestras de ADN.
- 4ª. Se ha diseñado un procedimiento para la identificación de las levaduras presentes en el mosto sin necesidad de aislamiento de colonias y cultivo microbiológico, mediante la comparación del perfil AFLP obtenido del ADN purificado del mosto con la base de datos generada. El límite de detección de la técnica es de  $10^5$  células/mL para levaduras no-*Saccharomyces* y  $10^4$  células/mL para *Saccharomyces*.
- 5ª. La concentración de los ésteres hexanoato de etilo, butirato de etilo, decanoato de etilo y octanoato de etilo (aromas a piña, plátano, uva y melocotón) en vinos de la variedad *Tempranillo* elaborados bajo las condiciones descritas en este trabajo, es proporcional a la cantidad de levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub> presentes en el mosto de partida.
- 6ª. La presencia de las levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub> durante la fermentación alcohólica, provocan una disminución en la concentración de ácido

---

---

octanoico en el mosto fermentado, lo que provoca una reducción de la acidez total del vino.

- 7<sup>a</sup>. La inoculación de las levaduras Lt<sub>1</sub>, Mp<sub>3</sub> o Hu<sub>1</sub> en el mosto, a concentraciones superiores a  $1,5 \times 10^6$  células/mL, reducen la cantidad de los acetatos de isobutilo e isoamilo, lo que provoca una menor percepción a ciertas frutas (plátano, pera), bayas (grosella) y flores (jacinto rosa) en el aroma del vino.
- 8<sup>a</sup>. La presencia en el mosto de las levaduras indígenas *L. thermotolerans* Lt<sub>1</sub> o *H. uvarum* Hu<sub>1</sub> a concentración igual o superior a  $3 \times 10^6$  células/mL, favorece la producción de acetato de hexilo en concentración superior a su umbral mínimo de percepción, lo que permite percibir el aroma a cereza en los vinos de la variedad *Tempranillo*.
- 9<sup>a</sup>. La cantidad de valerato de etilo (aroma a manzana) en el mosto fermentado en las condiciones descritas en este trabajo, es directamente proporcional a la concentración inicial de la levadura *M. pulcherrima* Mp<sub>3</sub>.
- 10<sup>a</sup>. A mayor concentración inicial de *H. uvarum* Hu<sub>1</sub> en el mosto, mayor producción de acetato de etilo, lo que puede suponer un desagradable aroma a barniz en el vino si se alcanzan concentraciones superiores a los 150 mg/L.







VII

# Bibliografía



- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-3402.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamon, J.M., 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *Lwt-Food Science and Technology* 49, 8-13.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology* 231, 215-224.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food microbiology* 25, 849-856.
- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 1-8.
- Antalick, G., Suklje, K., Blackman, J.W., Meeks, C., Deloire, A., Schmidtke, L.M., 2015. Influence of Grape Composition on Red Wine Ester Profile: Comparison between Cabernet Sauvignon and Shiraz Cultivars from Australian Warm Climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 4664-4672.
- Antalick, G., Tempere, S., Suklje, K., Blackman, J.W., Deloire, A., de Revel, G., Schmidtke, L.M., 2015. Investigation and Sensory Characterization of 1, 4-Cineole: A Potential Aromatic Marker of Australian Cabernet Sauvignon Wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 9103-9111.
- Arrhenius, S., McCloskey, L., Sylvan, M., 1996. Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1085-1090.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Langlois, D., Nicklaus, S., Chabanet, C., Etiévant, P., 2005. Perception of wine fruity and woody notes: influence of peri-threshold odorants. *Food quality and preference* 16, 504-510.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Langlois, D., Nicklaus, S., Etiévant, P., 2004. Perceptual interactions between fruity and woody notes of wine. *Flavour and fragrance journal* 19, 476-482.
- Aznar, M., López, R., Cacho, J.F., Ferreira, V., 2001. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-

---

---

olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 2924-2929.

Azumi, M., Goto-Yamamoto, N., 2001. AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* 18, 1145-1154.

Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 31, 277-293.

Bagheri, B., Bauer, F., Setati, M., 2015. The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture* 36, 243-251.

Bañuelos, M.A., Loira, I., Escott, C., Del Fresno, J.M., Morata, A., Sanz, P.D., Otero, L., Suárez-Lepe, J.A., 2016. Grape Processing by High Hydrostatic Pressure: Effect on Use of Non-*Saccharomyces* in Must Fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1-10.

Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D., 1990. *Yeast: Characterization*. Cambridge University Press, Cambridge.

Barth, H.G., Jackson, C., Boyes, B.E., 1994. Size exclusion chromatography. *Analytical chemistry* 66, 595R-620R.

Baselga, I., Zafra, O., Lago, E.P., Francisco-Álvarez, R., Rodríguez-Tarduchy, G., Santos, C., 2017. An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *International Journal of Food Microbiology* 241, 89-97.

Bauer, F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21, 27-51.

Bayonove, C., Cordonni, R., 1971. Researches on Aroma of Muscat. 3. Study of Terpenic Fraction, *Annales de Technologie Agricole*. Inst Natl Recherche Agronomique 147 Rue de L Universite, 75338 Paris Cedex 07, France pp. 347-&.

Belloch, C., Querol, A., Garcia, M., Barrio, E., 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 405-416.

- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International journal of food microbiology* 122, 312-320.
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology* 241, 707-717.
- Bertrand, A., Miele, A., 1984. Influence de la clarification du mout de raisin sur sa teneur en acides gras. *Connaissance de la Vigne et du Vin*.
- Bisson, L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 107-119.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E139-E148.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R., 1995. Microbial spoilage of wine and its control. *Principles and practices of winemaking*, 364-365.
- Burdock, G.A., 2016. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. CRC press.
- Cabello, F., de la Fuente, J., Muñoz, G., 1993. Caracterización de la variedad de vid 'Tempranillo' y sus posibles sinonimias españolas. II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas (Zaragoza). *SECH* 2, 848-857.
- Cabras, P., Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 967-973.
- Cantarelli, C., 1989. Phenolics and yeast: Remarks concerning fermented beverages. *Yeast* 5, 53-59.
- Cañas, P.I., Romero, E.G., Alonso, S.G., Herreros, M.P., 2008. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of food composition and analysis* 21, 724-730.
- Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., Tedesco, I., 2004. Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technology and Biotechnology* 42, 37-40.

- 
- 
- Carrau, F., Gaggero, C., Aguilar, P.S., 2015. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends in biotechnology* 33, 148-154.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lepingle, A., Brignon, P., Gendre, F., Gaillardin, C., 1998. A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. *Yeast* 14, 551-564.
- Cervera, M.-T., Ruiz-Garcia, L., Martinez-Zapater, J., 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics* 268, 543-552.
- Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Gomez, C., Zapater, J.M., 2001. Análisis de la variabilidad intravarietal de la vid mediante el empleo de marcadores de alta eficacia. *ACE Revista de Enología*. Editorial Rubes.
- Chen, S., Xu, Y., Qian, M.C., 2013. Aroma characterization of Chinese rice wine by gas chromatography–olfactometry, chemical quantitative analysis, and aroma reconstitution. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 11295-11302.
- Ciani, M., Comitini, F., 2011. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of microbiology* 61, 25-32.
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1997. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199-203.
- Clarke, O., Rand, M., 2001. *Oz Clarke's Encyclopedia of Grapes*. Harcourt.
- Clemente-Jimenez, J.M.a., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21, 149-155.
- Cocolin, L., Bisson, L., Mills, D., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189, 81-87.
- Combina, M., Elia, 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.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled

- multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* Food microbiology 28, 873-882.
- Cooper, T.G., 1982. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Monograph Archive 11, 399-461.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., Arroyo, T., 2013. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). European Food Research and Technology 236, 193-207.
- Cottrell, M., Viljoen, B.C., Kock, J.L., Lategan, P.M., 1986. The long-chain fatty acid compositions of species representing the genera *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* and *Lipomyces*. Journal of general microbiology 132, 2401-2403.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P., Lopes, M.A.d.B., 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. Fems Yeast Research 7, 471-481.
- Dashko, S., Liu, P., Volk, H., Butinar, L., Piskur, J., Fay, J.C., 2015. Changes in the relative abundance of two *Saccharomyces* species from oak forests to wine fermentations. bioRxiv, 034157.
- de Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A., Langridge, P., 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. International journal of systematic bacteriology 49, 915-924.
- de Lerma, N.L., Peinado, R., 2011. Use of two osmoethanol tolerant yeast strain to ferment must from Tempranillo dried grapes: Effect on wine composition. International journal of food microbiology 145, 342-348.
- Domizio, P., Lencioni, L., Romani, C., Ciani, M., Comitini, F., Landolfo, S., Mannazzu, I.M., 2009. Improvement of wine quality by using non-*Saccharomyces* yeasts in mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. Annals of Microbiology 59, 55-55.
- Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I., Leão, C., 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49, 1907-1913.
- Duero, C.R.d.I.D.O.R.d., 2013. La D.O. Ribera del Duero.
- Ecológica, S.G.d.C.D.y.A., 2015. Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas de vinos (DOPs). Campaña 2013/2014.

- 
- 
- Escudero, A., Gogorza, B., Melus, M., Ortin, N., Cacho, J., Ferreira, V., 2004. Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3516-3524.
- Esteruelas, M., González-Royo, E., Kontoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2014. Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava). *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Hierro, N., Mas, A., Guillamon, J.M., 2010. A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing. *Lwt-Food Science and Technology* 43, 1480-1484.
- Etievant, P., 1991. Wine. Volatile compounds in foods and beverages 1.
- Fan, W., Qian, M.C., 2005. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7931-7938.
- Fan, W., Tsai, I.-M., Qian, M.C., 2007. Analysis of 2-aminoacetophenone by direct-immersion solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and its sensory impact in Chardonnay and Pinot gris wines. *Food chemistry* 105, 1144-1150.
- Fang, Y., Qian, M.C., 2006. Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot noir wines from different grape maturities. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 8567-8573.
- Fernández, M.T.C., 2004. Estudio analítico de compuestos volátiles en vino: caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Universidad de La Rioja.
- Fernández-Espinar, M., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International journal of food microbiology* 70, 1-10.
- Fernández-González, M., Briones, A.I., 2013. Study of yeast populations and their enological properties in Guijoso Appellation of Origin (Spain). *Annals of microbiology* 63, 371-379.

- Ferreira, V., Culleré, L., López, R., Cacho, J., 2004. Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography–mass spectrometry of their O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl) oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge used for selective isolation. *Journal of Chromatography A* 1028, 339-345.
- Ferreira, V., López, R., Cacho, J.F., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1659-1667.
- Ferreira, V., San Juan, F., 2011. Flavor of wine. *Food Flavors*, 269-300.
- Fleet, G., Heard, G., 1993a. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed. GM Fleet, Harwood, Chur, Switzerland 27.
- Fleet, G., Heard, G., 1993b. Yeasts: growth during fermentation in Fleet. GH (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*.
- Fleet, G.H., 1993. *Wine microbiology and biotechnology*. CRC Press.
- Fleet, G.H., 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 170-175.
- Fleet, G.H., Doyle, M., Beuchat, L., 2007. Wine. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 863-890.
- Flores Berrios, E., Alba González, J., Arrizon Gavino, J., Romano, P., Capece, A., Gschaedler Mathis, A., 2005. The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in applied microbiology* 41, 147-152.
- Fugelsang, K.C., 1997. Yeasts and molds, *Wine microbiology*. Springer, pp. 68-116.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. *Wine microbiology: practical applications and procedures*. Springer Science & Business Media.
- Gachot, G.g., Ribière, P., Mathiron, D., Grugeon, S., Armand, M., Leriche, J.-B., Pilard, S., Laruelle, S.p., 2010. Gas chromatography/mass spectrometry as a suitable tool for the Li-ion battery electrolyte degradation mechanisms study. *Analytical chemistry* 83, 478-485.
- Gallego, F., Perez, M., Martinez, I., Hidalgo, P., 1998. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 350-351.

- 
- 
- Gao, C., Fleet, G., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 405-409.
- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., Capozzi, V., 2015. Non-*Saccharomyces* biodiversity in wine and the 'microbial terroir': a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of Microbiology*, 1-8.
- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., Capozzi, V., 2016. Non-*Saccharomyces* biodiversity in wine and the 'microbial terroir': a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of Microbiology* 66, 143-150.
- Gassiot, M., Comellas, L., Rabada, J., 1983. Caracterizacion de vinos. Calculo de parametros tipicos a partir de la fraccion volatil. *Afinidad* 40, 213-216.
- Gayevskiy, V., Goddard, M.R., 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *Isme Journal* 6, 1281-1290.
- Genoves, S., Gil, J., Manzanares, P., Aleixandre, J., Valles, S., 2003. *Candida molischiana*  $\beta$ -Glucosidase Production by *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Winemaking. *Journal of food science* 68, 2096-2100.
- Gerbaux, V., Vincent, B., Bertrand, A., 2002. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *American journal of enology and viticulture* 53, 131-137.
- Gil, J., Mateo, J., Jiménez, M., Pastor, A., Huerta, T., 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *Journal of Food Science* 61, 1247-1250.
- Gil, J.V., Vallés, S., 2001. Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: exogenous addition or expression by transgenic wine yeasts. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 5515-5523.
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T., Prodanov, M., 2006. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin "Vinos de Madrid"(Spain). *Analytica Chimica Acta* 563, 145-153.
- Gilbert, J.A., van der Lelie, D., Zorraonaindia, I., 2014. Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 5-6.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to

- enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33, 271-281.
- Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., Jun, C., 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology* 12, 63-73.
- Guillamon, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A., 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International journal of systematic bacteriology* 44, 708-714.
- Guillaumie, S., Ilg, A., Réty, S., Brette, M., Trossat-Magnin, C., Decroocq, S., Léon, C., Keime, C., Ye, T., Baltenweck-Guyot, R., 2013. Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant physiology* 162, 604-615.
- Guzzon, R., Nicolini, G., Nardin, T., Malacarne, M., Larcher, R., 2014. Survey about the microbiological features, the oenological performance and the influence on the character of wine of active dry yeast employed as starters of wine fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 49, 2142-2148.
- Heaven, M.W., Nash, D., 2012. Recent analyses using solid phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control* 27, 214-227.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martín-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313-318.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS yeast research* 7, 1340-1349.
- Howell, K., Bartowsky, E., Fleet, G., Henschke, P., 2004. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Letters in applied microbiology* 38, 315-320.
- Ingladew, W., Kunkee, R.E., 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 65-76.
- Ivanova-Petropulos, V., Balabanova, B., Mitrev, S., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Gulaboski, R., 2015. Optimization and Validation of a Microwave

---

---

Digestion Method for Multi-element Characterization of Vranec Wines. Food Analytical Methods, 1-13.

Jackson, R., 1994. Wine sciences. New York: Academic.

James, S., Collins, M., Roberts, I., 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. International journal of systematic bacteriology 46, 189-194.

Jeleń, H.H., Szczurek, A., 2010. Solid phase microextraction for profiling volatile compounds in liquered white wines. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment 9, 23-32.

Johnson, H., Diéguez, R.D., 2005. Historia del vino. Blume.

Juega, M., Carrascosa, A.V., Martinez-Rodriguez, A.J., 2015. Effect of Short Ageing on Lees on the Mannoprotein Content, Aromatic Profile, and Sensorial Character of White Wines. Journal of food science 80, M384-M388.

Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. Journal of chromatography A 880, 35-62.

Keogh, R.S., Seoighe, C., Wolfe, K.H., 1998. Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. Yeast 14, 443-457.

Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., Goddard, M.R., 2015. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. Scientific Reports 5.

Kotseridis, Y., Baumes, R., 2000. Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 400-406.

Kotseridis, Y., Razungles, A., Bertrand, A., Baumes, R., 2000. Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. Journal of agricultural and food chemistry 48, 5383-5388.

Kreger-venrij, W., 1984. The yeast-a taxonomic syudy. Amsterdam: Elsevier Science Publisher.

- 
- 
- Kudo, M., Vagnoli, P., Bisson, L.F., 1998. Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations. *American journal of enology and viticulture* 49, 295-301.
- Kunkee, R.E., 1967. Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *American Journal of Enology and Viticulture* 18, 71-77.
- Kurtzman, C., Phaff, H., 1987. Molecular taxonomy of yeasts. *Biotechnology*.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS yeast research* 3, 417-432.
- Lafon-Lafourcade, S., 1983. Wine and brandy.
- Lagunas, R., 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2, 221-228.
- Lambrechts, M., Pretorius, I., 2000. Yeast and its importance to wine aroma.
- Laureati, M., Pagliarini, E., 2016. Sustainability and Organic Wine Production, Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health. Springer, pp. 183-199.
- Lavalliée, F., Salvas, Y., Lamy, S., Thomas, D., Degré, R., Dulau, L., 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 86-91.
- Likens, S., Nickerson, G., 1964. Pages 5–13 in *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, St. Paul, MN.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., Yan, G.-L., 2016. The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT-Food Science and Technology* 71, 356-363.
- Liu, W., Xu, Y., Zhao, J., Guan, Y., 2004. The application of In-tube SPME and SBSE to the analysis of trace contaminants in water [J]. *Life Science Instruments* 5, 003.

- 
- 
- Longo, E., Velazquez, J., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P., Villa, T., 1992. Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, NW Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 539-541.
- Lopandic, K., Tiefenbrunner, W., Gangl, H., Mandl, K., Berger, S., Leitner, G., Abd-Ellah, G.A., Querol, A., Gardner, R.C., Sterflinger, K., 2008. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. *FEMS yeast research* 8, 1063-1075.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A., Caballero, A.C., 2007. Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 34, 539-546.
- López, R., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A.R., Tenorio, C., Garijo, P., González-Arenzana, L., Santamaría, P., 2011. Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *International Journal of Food Science & Technology* 46, 2373-2381.
- Lopez, V., Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., Ramón, D., Querol, A., 2003. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International journal of food microbiology* 81, 63-71.
- Lord, H., Pawliszyn, J., 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* 885, 153-193.
- Lucena, R., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M., 2005. Autoanalyzer for continuous fractionation and quantitation of the polyphenols content in wines. *Journal of Chromatography A* 1081, 127-131.
- Lytra, G., Tempere, S., de Revel, G., Barbe, J.-C., 2014. Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 2-Methylbutanoate Enantiomers in Wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 5005-5010.
- Ma, C., Wei, X., Sun, C., Zhang, F., Xu, J., Zhao, X., Bai, F., 2015. Improvement of acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* using a zinc-finger-based artificial transcription factor and identification of novel genes involved in acetic acid tolerance. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 2441-2449.
- MAGRAMA, 2016. DATOS DE LAS DENOMINACIONES DE ORIGEN PROTEGIDAS DE VINOS (DOPs) Campaña 2014/2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Marrufo-Curtido, A., Cejudo-Bastante, M., Durán-Guerrero, E., Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Chinnici, F., García-Barroso, C., 2012.

- Characterization and differentiation of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS). *LWT-Food science and technology* 47, 332-341.
- Martínez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R., Rodríguez, J., 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 244-253.
- Martini, A., Martini, A.V., 1990. Grape must fermentation: past and present.
- Martiniuk, J.T., Pacheco, B., Russell, G., Tong, S., Backstrom, I., Measday, V., 2016. Impact of Commercial Strain Use on *Saccharomyces cerevisiae* Population Structure and Dynamics in Pinot Noir Vineyards and Spontaneous Fermentations of a Canadian Winery. *PloS one* 11, e0160259.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdiou, D., 2010. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International journal of food microbiology* 139, 79-86.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G., 2002. *Bioquímica*. Pearson Education.
- Mendes, B., Gonçalves, J., Câmara, J.S., 2012. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent-and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—A comparative study. *Talanta* 88, 79-94.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4884-4893.
- Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F., Rodríguez-Vico, F., 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 297-304.
- Moio, L., Chambellant, E., Lesschaeve, I., Issanchou, S., Schlich, P., Etievant, P., 1995. Production of representative wine extracts for chemical and olfactory analysis. *Italian Journal of Food Science* 7, 265-278.
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 675-687.

- 
- 
- Molnar, O., Messner, R., Prillinger, H., Stahl, U., Slavikova, E., 1995. Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Systematic and applied microbiology* 18, 136-145.
- Monerawela, C., James, T.C., Wolfe, K.H., Bond, U., 2015. Loss of lager specific genes and subtelomeric regions define two different *Saccharomyces cerevisiae* lineages for *Saccharomyces pastorianus* Group I and II strains. *FEMS yeast research* 15, fou008.
- Monteiro, F.F., Bisson, L.F., 1991. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *American journal of enology and viticulture* 42, 47-57.
- Monteiro, F.F., Bisson, L.F., 1992. Utilization of adenine by yeast during grape juice fermentation and investigation of the possible role of adenine as a precursor of urea. *American journal of enology and viticulture* 43, 18-22.
- Moreira, N., Mendes, F., De Pinho, P.G., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International journal of food microbiology* 124, 231-238.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International journal of food microbiology* 103, 285-294.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 265-286.
- Muñoz-Organero, G., Rodríguez-Torres, I., Cabello, F., 2001. Importancia de la selección clonal de variedades de vid. *Acenología*.(12).
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59, 695-700.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology* 23, 205-211.

- 
- 
- Nishino, H., Miyazaki, S., Tohjo, K., 1985. Effect of Osmotic Pressure on the Growth Rate and Fermentation Activity of Wine Yeasts. *American journal of enology and viticulture* 36, 170-174.
- Noble, A., 1982. Effect of Skin Contact on the Composition of Wine: Nonvolatiles and Volatiles. *Grape and Wine Centennial Symposium*, University of California, Davis.
- Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., 2009. Quantitative determination and characterisation of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chemistry* 117, 473-484.
- Norbeck, J., Blomberg, A., 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272, 5544-5554.
- OIV, 2016. *World Viticulture Situation*.
- Oliva, J., Cayuela, M., Paya, P., Martínez-Cacha, A., Cámara, M., Barba, A., 2006. Influence of fungicides on grape yeast content and its evolution in the fermentation. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 72, 181-189.
- Ortiz, M.J., Barrajón, N., Baffi, M.A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., 2013. Spontaneous must fermentation: identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT-Food Science and Technology* 50, 371-377.
- Ough, C., 1992. *Fermentation and wine composition. Winemaking Basics*.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1988. *Methods for analysis of musts and wines*. J. Wiley.
- Palomo, E.S., Díaz-Maroto, M., Viñas, M.G., Soriano-Pérez, A., Pérez-Coello, M., 2007. Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control* 18, 398-403.
- Pampulha, M., Loureiro-Dias, M., 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, 547-550.
- Pavez, C., Steinhaus, M., Casaubon, G., Schieberle, P., Agosin, E., 2015. Identification, quantitation and sensory evaluation of methyl 2- and methyl 3-methylbutanoate in varietal red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21, 189-193.

- 
- 
- Pawliszyn, J.B., Musteata, F.M., Musteata, M.L., Shirey, R.E., Sidisky, L.M., Chen, Y., 2012. Methods of Preparation and Manufacture of Biocompatible Solid-Phase Microextraction Coatings and Coated Devices. Google Patents.
- Peñín, J., 2011. Historia del vino. Grupo Planeta Spain.
- Pérez-Martín, F., Izquierdo-Cañas, P.M., Seseña, S., García-Romero, E., Palop, M.L., 2015. Aromatic compounds released from natural precursors by selected *Oenococcus oeni* strains during malolactic fermentation. *European Food Research and Technology* 240, 609-618.
- Perez-Prieto, L., Lopez-Roca, J., Gómez-Plaza, E., 2003. Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 697-705.
- Perez-Torrado, R., Susana Gonzalez, S., Combina, M., Barrio, E., Querol, A., 2015. Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *International Journal of Food Microbiology* 204, 101-110.
- Peterson, S.W., Kurtzman, C.P., 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and applied microbiology* 14, 124-129.
- Petka, J., Ferreira, V., González-Viñas, M.A., Cacho, J., 2006. Sensory and chemical characterization of the aroma of a white wine made with Devin grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 909-915.
- Philippson, P., Stotz, A., Scherf, C., 1991. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* 194, 169.
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D., 2007. Which impact for  $\beta$ -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4103-4108.
- Pineau, B.n.d., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D., 2009. Examples of perceptive interactions involved in specific "red-" and "black-berry" aromas in red wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 3702-3708.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J., Ortega, J., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217-224.
- Pozo-Bayón, M.A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J., Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C., 2003. Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging

- time on volatile compounds of sparkling wines. *American journal of enology and viticulture* 54, 273-278.
- Pramateftaki, P., Lanaridis, P., Typas, M., 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of applied microbiology* 89, 236-248.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Price, C., Fuson, G.B., Phaff, H., 1978. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiological reviews* 42, 161.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948-2953.
- Ramos, M., Jones, G., Yuste, J., 2015. Phenology and grape ripening characteristics of cv Tempranillo within the Ribera del Duero designation of origin (Spain): Influence of soil and plot characteristics. *European Journal of Agronomy* 70, 57-70.
- Rapp, A., 1998. Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Food/Nahrung* 42, 351-363.
- Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., 2015. Effects of sugar concentration processes in grapes and wine aging on aroma compounds of sweet wines—a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 55, 1053-1073.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.C., Bely, M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T-delbrueckii/S-cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology* 207, 40-48.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International journal of food microbiology* 134, 201-210.

- 
- 
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 149-164.
- Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G., Ryan, J.-M.a., 2001. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A* 915, 53-60.
- Riberau, G., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000. *Handbook of Enology, The Chemistry of wine Stabilization and Treatments*. John Wiley and Sons Ltd. Baffins lane, Chichester, West Sussex, England.
- Riberau-Gayon, P., Glories, Y., 1971. Determination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. *Acad Sci Paris CR Ser D*.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, Volume 1, 2nd Edition*, 1-51.
- Robinson, J., Robinson, J., 2006. Vine varieties. *The Oxford Companion to Wine*, 746.
- Rojas, V., Gil, J.V., Manzanares, P., Gavara, R., Piñaga, F., Flors, A., 2002. Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 224-230.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283-289.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86, 181-188.
- Rolandi, S., Saba, A., 2015. Voluntary certification systems in the EU wine sector: How to recognise quality and be safe from confusion, *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences, p. 03013.
- Romancino, D., Di Maio, S., Muriella, R., Oliva, D., 2008. Analysis of non-Saccharomyces yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of applied microbiology* 105, 2248-2254.

- 
- Romano, A., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., Sicard, G., de Revel, G., 2009. Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chemistry* 114, 15-19.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169-180.
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of fermentation and bioengineering* 82, 377-381.
- Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O., 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 197-206.
- Sadineni, V., Kondapalli, N., Obulam, V.S.R., 2012. Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Annals of microbiology* 62, 1353-1360.
- Sadoudi, M., Tourdot-Marechal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacon, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guerin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology* 32, 243-253.
- Sagratini, G., Maggi, F., Caprioli, G., Cristalli, G., Ricciutelli, M., Torregiani, E., Vittori, S., 2012. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marches and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME-GC-MS and HPLC-MS. *Food Chemistry* 132, 1592-1599.
- Sakihama, Y., Hasunuma, T., Kondo, A., 2015. Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering* 119, 297-302.
- Sambrook, J., Russell, D.W., Russell, D.W., 2006. *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Santiago, A.V.C., Muñoz, R., Garcia, R.G., 2011. *Molecular wine microbiology*. Academic Press.

- 
- 
- Scheda, R., Yarrow, D., 1966. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. *Archives of Microbiology* 55, 209-225.
- Scheda, R., Yarrow, D., 1968. Variation in the fermentative pattern of some *Saccharomyces* species. *Archiv für Mikrobiologie* 61, 310-316.
- Schreier, P., Jennings, W.G., 1979. Flavor composition of wines: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 12, 59-111.
- Schuller, D., Casal, M., 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied microbiology and biotechnology* 68, 292-304.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M., 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS microbiology letters* 231, 19-26.
- Schütz, M., Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 551-558.
- Segurel, M.A., Razungles, A.J., Riou, C., Salles, M., Baumes, R.L., 2004. Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 7084-7093.
- Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H., Nurgel, C., Lepoutre, J., Gunata, Z., 2004. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karası grown in central Anatolia. *Food Chemistry* 85, 207-213.
- Serna, V.d.l., 2010. El Debate del "vino natural" en España. ¿Verdad, mentira, camino al progreso? *El Mundo*.
- Siebert, T.E., Smyth, H.E., Capone, D.L., Neuwöhner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M.J., Sefton, M.A., Pollnitz, A.P., 2005. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 381, 937-947.
- Silva, M.M.d., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Aubyn, A.S., 1994. Long-chain fatty acid composition as a criterion for yeast distinction in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing* 100, 17-22.
- Standage, T., 2006. La Historia del mundo en seis tragos: de la cerveza de los faraones a la Coca-Cola. *Debate*.

- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food microbiology* 26, 415-420.
- Suarez-Lepe, J.A., Morata, A., 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 23, 39-50.
- Sudraud, P., Chauvet, S., 1985. Activite antilevure de l'anhydride sulfureux moleculaire [sulfitage]. *Connaissance de la Vigne et du Vin*.
- Sun, S.Y., Gong, H.S., Jiang, X.M., Zhao, Y.P., 2014. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food microbiology* 44, 15-23.
- Sun, Y., Liu, Y., 2014. Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology* 38, 201-207.
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A., Suzzi, G., 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International journal of food microbiology* 130, 179-187.
- 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.
- Tredoux, A., de Villiers, A., Májek, P., Lynen, F., Crouch, A., Sandra, P., 2008. Stir bar sorptive extraction combined with GC-MS analysis and chemometric methods for the classification of South African wines according to the volatile composition. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 4286-4296.
- Tredoux, H., Kock, J., Lategan, P., Muller, H., 1987. A rapid identification technique to differentiate between *Saccharomyces cerevisiae* strains and other yeast species in the wine industry. *American journal of enology and viticulture* 38, 161-164.
- Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F., 2016. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Frontiers in microbiology* 7.

- 
- 
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., Dequin, S., 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS yeast research* 5, 959-969.
- Van Vuuren, H., Van Der Meer, L., 1987. Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis. *American journal of enology and viticulture* 38, 49-53.
- Vancanneyt, M., Pot, B., Hennebert, G., Kersters, K., 1991. Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Systematic and applied microbiology* 14, 23-32.
- Versari, A., Patrizi, C., Parpinello, G.P., Mattioli, A.U., Pasini, L., Meglioli, M., Longhini, G., 2015. Effect of co-inoculation with yeast and bacteria on chemical and sensory characteristics of commercial Cabernet Franc red wine from Switzerland. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Vetsch, U., Lüthi, H., 1964. Decolorisation of red wines during biological decomposition of acids. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg* 55, 93-98.
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25, 778-785.
- Viana, F., Gil, J.V., Vallés, S., Manzanares, P., 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology* 135, 68-74.
- Vilanova, M., Martínez, C., 2007. First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castanal grown in Galicia (NW Spain). *European Food Research and Technology* 224, 431-436.
- Villanúa, L., Torrija, E., 2003. Tratamientos industriales y culinarios como causa de sustancias tóxicas alimentarias. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandeleer, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP - A New Technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Cocolin, L., Mas, A., Rantsiou, K., 2015. Viable and culturable populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) during Barbera must fermentation. *Food Research International* 78, 195-200.

- Waterhouse, A.L., 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 21-36.
- Watson, K., 1987. Temperature relations. *The yeasts* 2, 41-72.
- Weldegergis, B.T., de Villiers, A., McNeish, C., Seethapathy, S., Mostafa, A., Górecki, T., Crouch, A.M., 2011. Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC× GC–TOFMS). *Food Chemistry* 129, 188-199.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322
- Whitener, M.E.B., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., Du Toit, M., Vrhovsek, U., 2015. Early fermentation volatile metabolite profile of non-Saccharomyces yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT-Food Science and Technology* 64, 412-422.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 4, 1120-1128.
- Wu, Q., Zhu, W., Wang, W., Xu, Y., 2015. Effect of yeast species on the terpenoids profile of Chinese light-style liquor. *Food chemistry* 168, 390-395.
- Xu, Y., Fan, W., Qian, M.C., 2007. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 3051-3057.
- Yuan, F., Qian, M.C., 2015. Aroma Potential in Early and Late Maturity Pinot noir Grape Evaluated by Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Zhang, H., Richards, K.D., Wilson, S., Lee, S.A., Sheehan, H., Roncoroni, M., Gardner, R.C., 2015. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries. *Food microbiology* 46, 92-99.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food microbiology* 27, 559-567.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the

---

---

early stages in winemaking. International journal of food microbiology  
125, 197-203.







VIII

Abreviaturas



a.C.: antes de Cristo

AcNa: acetato de sodio

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

AFLP: amplified fragment length polymorphism

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

B.O.C. y L.: Boletín Oficial de Castilla y León

B.O.E.: Boletín Oficial del Estado

CECT: colección española de cultivos tipo

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis

dNTPs: 2'-deoxinucleosidos 5'-trifosfato

D.O.: Denominación de Origen

ETS: external transcriber spacer

FID: flame ionization detector

GC: gas chromatography

GC-FID: gas chromatography - flame ionization detector

GC-MS: gas chromatography - mass spectrometry

HS-SPME: head space - solid phase microextraction

HS-SPME-GC-MS: head space - solid phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry

---

---

Hu: *Hanseniaspora uvarum*

ITS: internal transcriber spacer

ITS-RFLP: internal transcriber spacer - restriction fragment lenght polymorphism

Q-PCR: quantitative - polymerase chain reaction

Lt: *Lachancea thermotolerans*

M: molar

M: metros

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

mM: milimolar

Mp: *Metschnikowia pulcherrima*

Nº CAS: number of chemical registry number

NAD<sup>+</sup>: nicotin adenin dinucleótido oxidado

NADH: nicotin adenin dinucleótido reducido

NADPH: nicotidamida adenina dinucleótido fosfato

Na<sub>2</sub>EDTA: ácido etilendiaminaotetraacético

NCBI: National Center for Biotechnology Information

n.d.: no detectado

OIV: Organización Internacional del Vino

Pa: *Picchia anomala*

Pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis

psi: per square inch

rpm: revoluciones por minuto

s.: siglo

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

Su: *Saccharomyces uvarum*

TE: Tris-EDTA

TBE: Tris-Borate-EDTA

Td: *Torulaspota delbrueckii*

U: unidades enzimáticas

var.: variedad

ufc/mL: unidades formadoras de colonias/mililitro

YPD: yeast peptone dextrose medium









IX

Anexos



### IX.1. ANEXO 1: COMPARACIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS

A continuación se muestra la comparación de los electroferogramas obtenidos con diferentes pares de oligonucleótidos y las levaduras indígenas estudiadas en este trabajo. En todos los casos, las flechas verdes identifican los alelos AFLP comunes entre todas las muestras comparadas y las rojas marcan los que son comunes únicamente entre algunas de ellas.

En la Figura Al.1 se muestran los electroferogramas obtenidos empleando los pares de oligonucleótidos Q y J (HEX) de cuatro aislados de *H. uvarum* (MpA a MpK). Esta comparación permitió diferenciar dos cepas de *H. uvarum*.

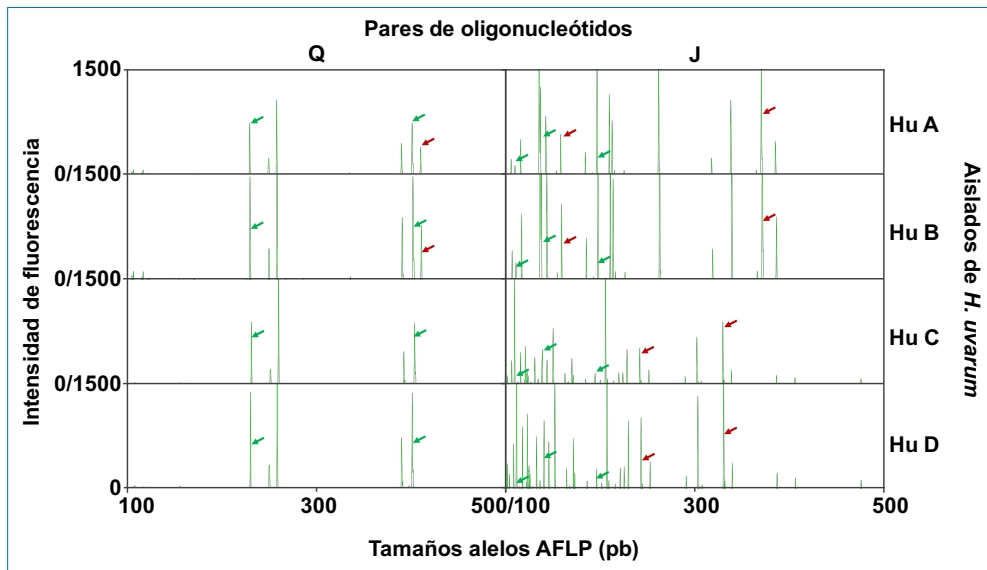


Figura Al.1. Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *H. uvarum* empleando los pares de cebadores Q y J.

En la Figura Al.2 se recogen los electroferogramas de once aislados de *M. pulcherrima* (MpA a MpK) obtenidos empleando los pares de cebadores H y S (FAM). El resultado de esta comparación permitió identificar tres cepas diferentes de *M. pulcherrima*.

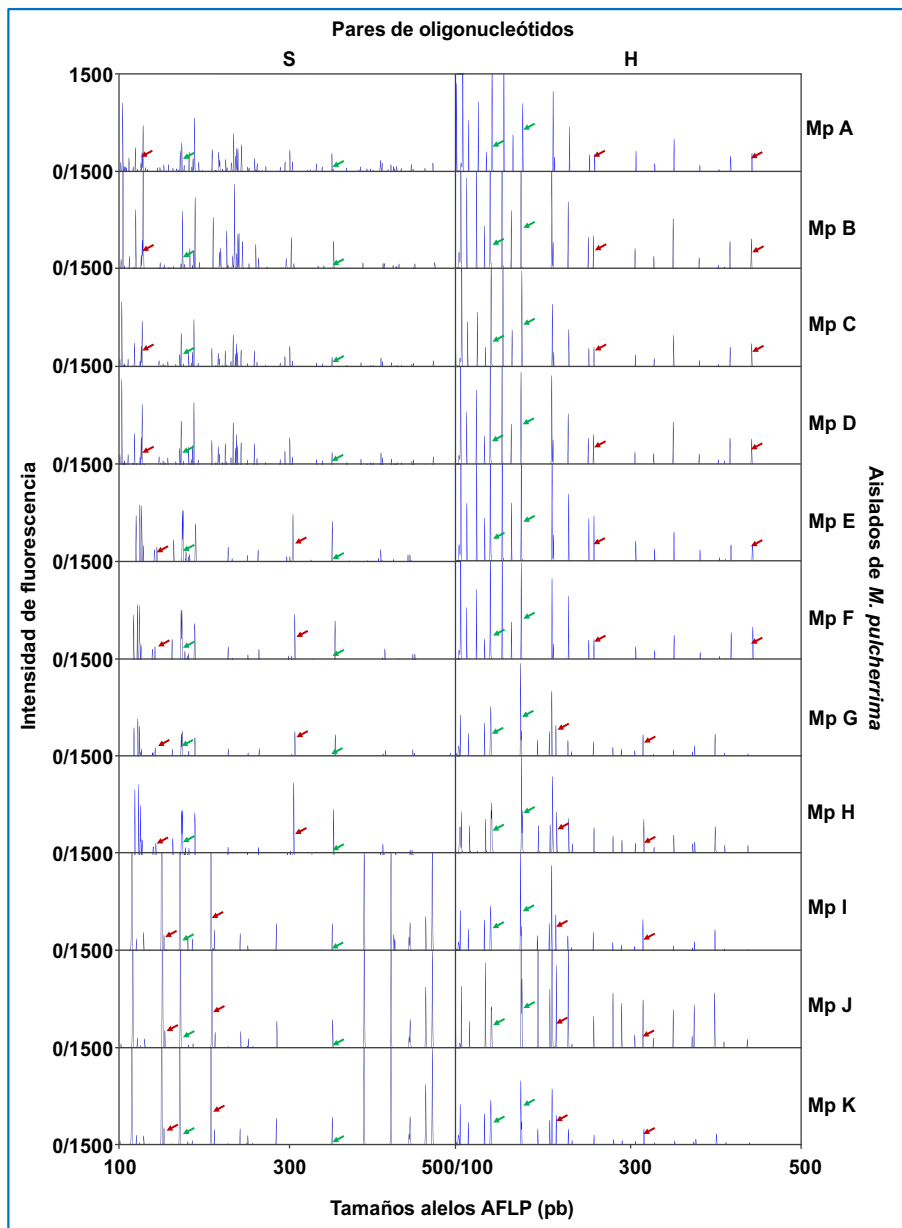


Figura A1.2. Análisis comparativo de electroferogramas para identificar los alelos AFLP específicos de especie y cepa de *M. pulcherrima* empleando los pares de cebadores H y S.

## IX.2. ANEXO 2: PERFILES AFLP ESPECÍFICOS DE ESPECIE Y CEPA

En las Figuras A2.1 a A2.6 se muestra la comparación de los electroferogramas obtenidos empleando los pares de oligonucleótidos S y J de algunas de las cepas indígenas identificadas y las cepas control empleadas en este estudio de *T. delbrueckii*, *P. anomala*, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *S. uvarum* y *S. cerevisiae*. En las figuras se indican los alelos AFLP específicos de especie obtenidos con el cebador S (●), los alelos AFLP específicos de especie obtenidos con el cebador J (●) y los alelos AFLP específicos de cepa obtenidos con ambos cebadores (◆).

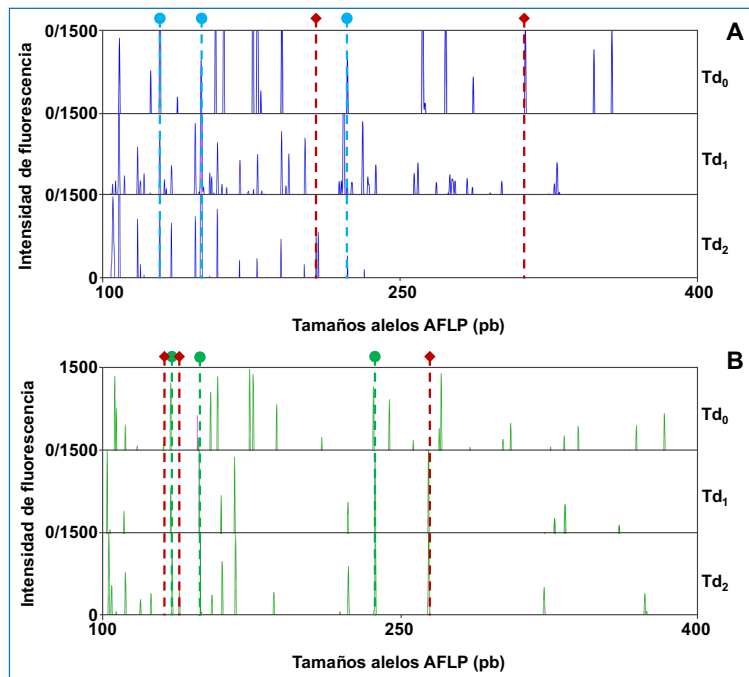


Figura AII.1. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *T. delbrueckii*. Cepas: una control (Td<sub>0</sub>) y dos indígenas (Td<sub>1</sub> y Td<sub>2</sub>)

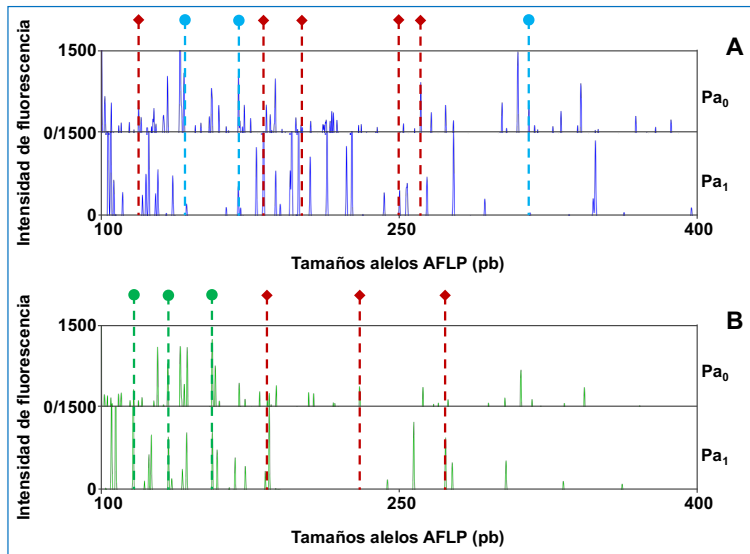


Figura AII.2. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *P. anomala*. Cepas: una control ( $Pa_0$ ) y dos indígenas ( $Pa_1$  y  $Pa_2$ )

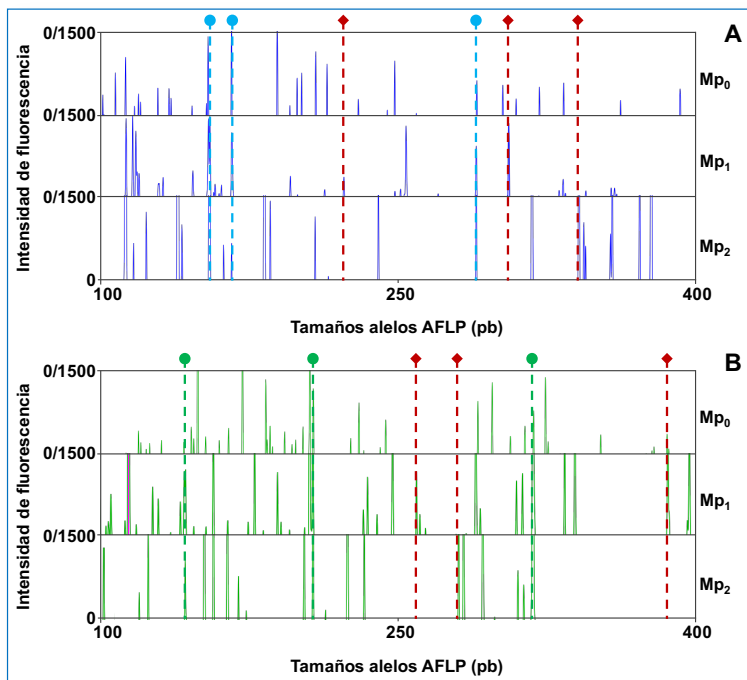


Figura AII.3. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *M. pulcherrima*. Cepas: una control ( $Mp_0$ ) y dos indígenas ( $Mp_1$  y  $Mp_2$ )

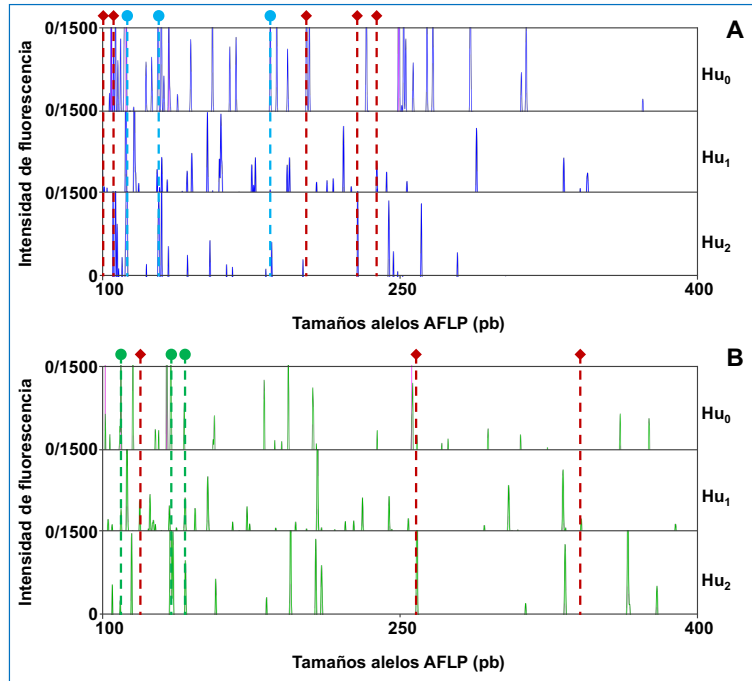


Figura AII.4. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *H. uvarum*. Cepas: una control ( $Hu_0$ ) y dos indígenas ( $Hu_1$  y  $Hu_2$ )

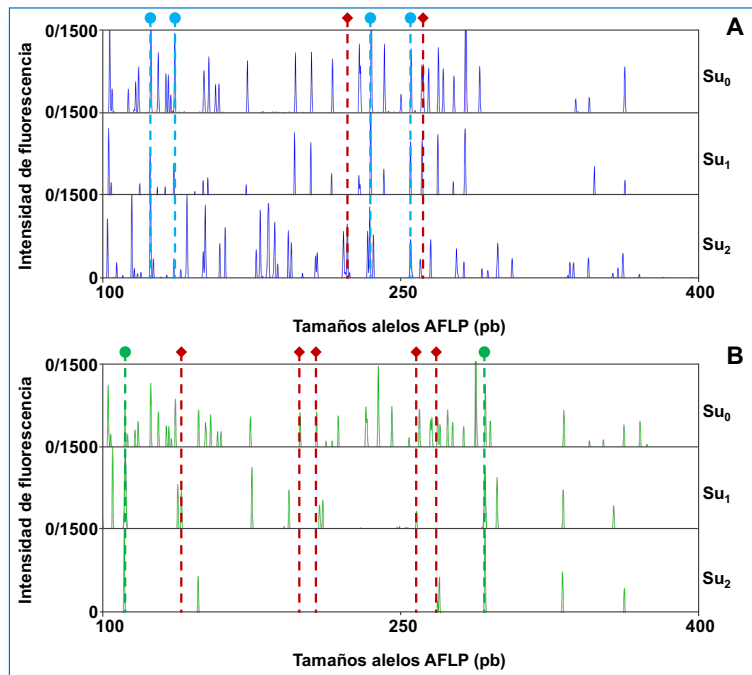


Figura AII.5. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *S. uvarum*. Cepas: una control ( $Su_0$ ) y dos indígenas ( $Su_1$  y  $Su_2$ )

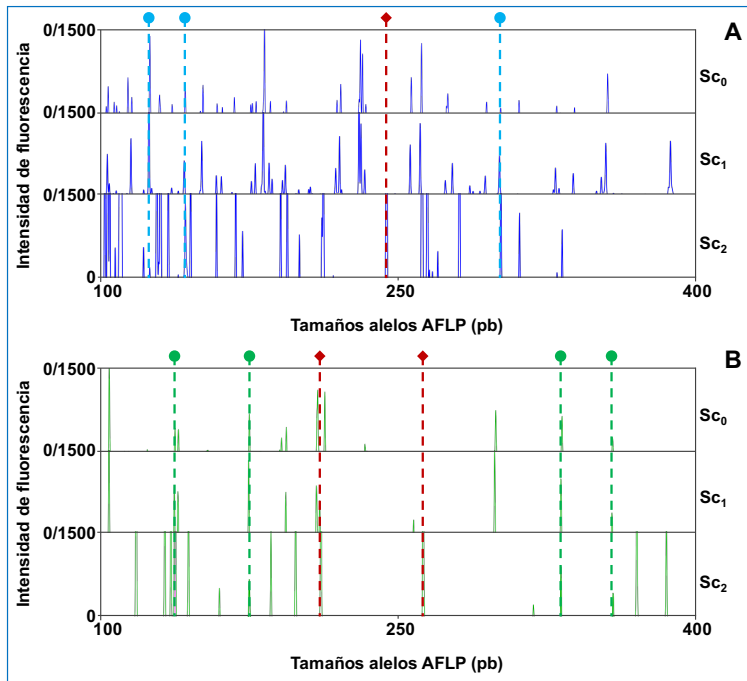


Figura AII.6. Comparación de los electroferogramas obtenidos con los cebadores S y J de tres cepas de *T. delbrueckii*. Cepas: una control (Sc<sub>0</sub>) y dos indígenas (Sc<sub>1</sub> y Sc<sub>2</sub>)

