

ANÁLISIS DE LEVADURAS DE VINOS DE CRIANZA BIOLÓGICA ANDALUCES CON MARCADORES MOLECULARES DE COMPETITIVIDAD



Parejo Cubillana, Alejandro(1); Quintero Blanco, Juan; Garzón Villar, Andrés (1); Jiménez Martínez, Juan(1)



(1) Dpto de Genética. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide, Ctra. Utrera, km. 1, 41013 Sevilla, España

Los vinos de crianza biológica de Jerez (llamados vinos finos y manzanilla) envejecen mediante un proceso aeróbico que depende de la actividad oxidativa de cepas de flor de *Saccharomyces cerevisiae*. Ante una bajada de la fuente de carbono o nitrógeno fermentables estas levaduras se agregan, creando un biofilm flotante en la superficie del vino, el cual es conocido como velo de flor. Las bodegas que producen este tipo de vino están muy interesadas en preservar un aroma y un sabor distintivo de sus propios vinos. Elegir la cepa de flor adecuada para colonizar sus botas podría dar como resultado un mejor control de las propiedades del vino.

En nuestro estudio estamos analizando la población microbiológica de cepas de flor presentes en cinco tipos de vinos diferentes de una bodega de vinos de crianza biológica de Jerez. Nuestros objetivos principales serán identificar las cepas que doten al vino de características específicas y establecer una metodología de intervención biotecnológica para la implantación de una cepa de levadura deseada en el menor periodo de tiempo posible, ya sea para que cada vez que el vino se saca o se añade a la bota este no se oxide, porque su velo sea deficiente o porque se desea realizar la crianza con una cepa diferente a la ya implantada. De esta forma queremos crear un ambiente microbiológico controlado para obtener un vino con unas propiedades deseadas de forma consistente. Los resultados presentados a continuación son resultados intermedios del proyecto que aún sigue realizándose.

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Para estudiar la diversidad de levaduras presentes en las botas estudiadas se analizó el polimorfismo de las mismas mediante PCR respecto a los loci nucleares SCYOR267C, SCPTS7, ScAAT3, SC8132X y C5 a partir de 10 colonias de levaduras aisladas de cada una. Todas ellas presentaron el mismo patrón de marcadores de microsatélites, lo cual parece indicar que todas las colonias encontradas en estas botas se tratan de la misma cepa. Con el objetivo de corroborarlo, se analizará también el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit).

CORRELACIÓN ENTRE CANTIDAD DE LEVADUR INOCULADA Y EFICIENCIA FORMACIÓN DE LA FLOR

Para analizar la rapidez con la que se forma la flor, uno de los principales parámetros a tener en cuenta es la cantidad de cultivo formador de flor que se inocula en el vino. Por ello es de gran interés establecer si existe una correlación entre la cantidad de levadura inoculada y la rapidez con la que se forma el velo. Se observa que cuanto mayor es la cantidad de cultivo que inoculamos en un medio óptimo para la formación de la flor, más rápidamente se forma dicha capa (Figura 1). Esto nos lleva a pensar que dicha correlación existe.

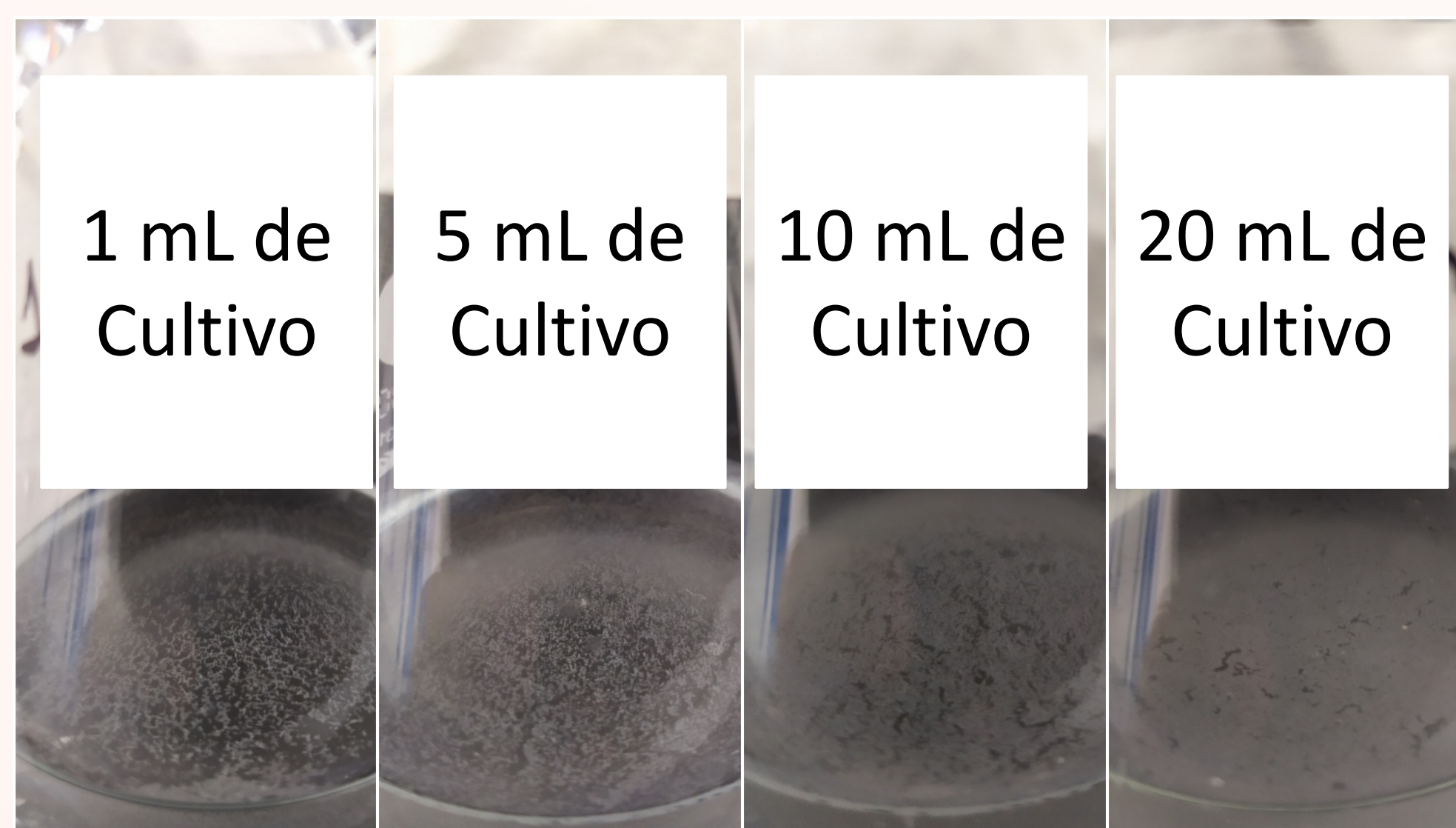


Figura 1. Diferentes concentraciones de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* formadora de flor inoculadas en 40 mL de medio óptimo para la formación del velo de flor (YN 6% alcohol) después de dos semanas tras la inoculación.

PREADAPTACIÓN A DIFERENTES PH

Una de las estrategias estudiadas para que el biofilm se pueda formar sobre el vino de forma más rápida a como se produce actualmente con métodos convencionales es analizar la mejor forma de preadaptar o condicionar dichas cepas. Diversos estudios (Bayly, 2005; Barrales et al., 2007) han demostrado que el gen flo11, codificante de la adhesina de mismo nombre responsable de la formación de la flor en este tipo de vinos, es activado cuando la levadura crece a pHs alcalinos. Por ello se llevó a cabo un experimento para comparar la rapidez de la formación del velo de flor entre cultivos que habían crecido a diferentes niveles de pH. Los resultados mostraron que en la práctica la flor se forma más rápidamente en cultivos que han crecido a pH 3 o 3.5, al cual suele crecer de forma natural las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* formadora de flor de forma óptima (Figura 2). Aunque los resultados que se observan fueron tomados tras 5 días, 14 días más tarde todos los cultivos habían desarrollado la capa de flor.

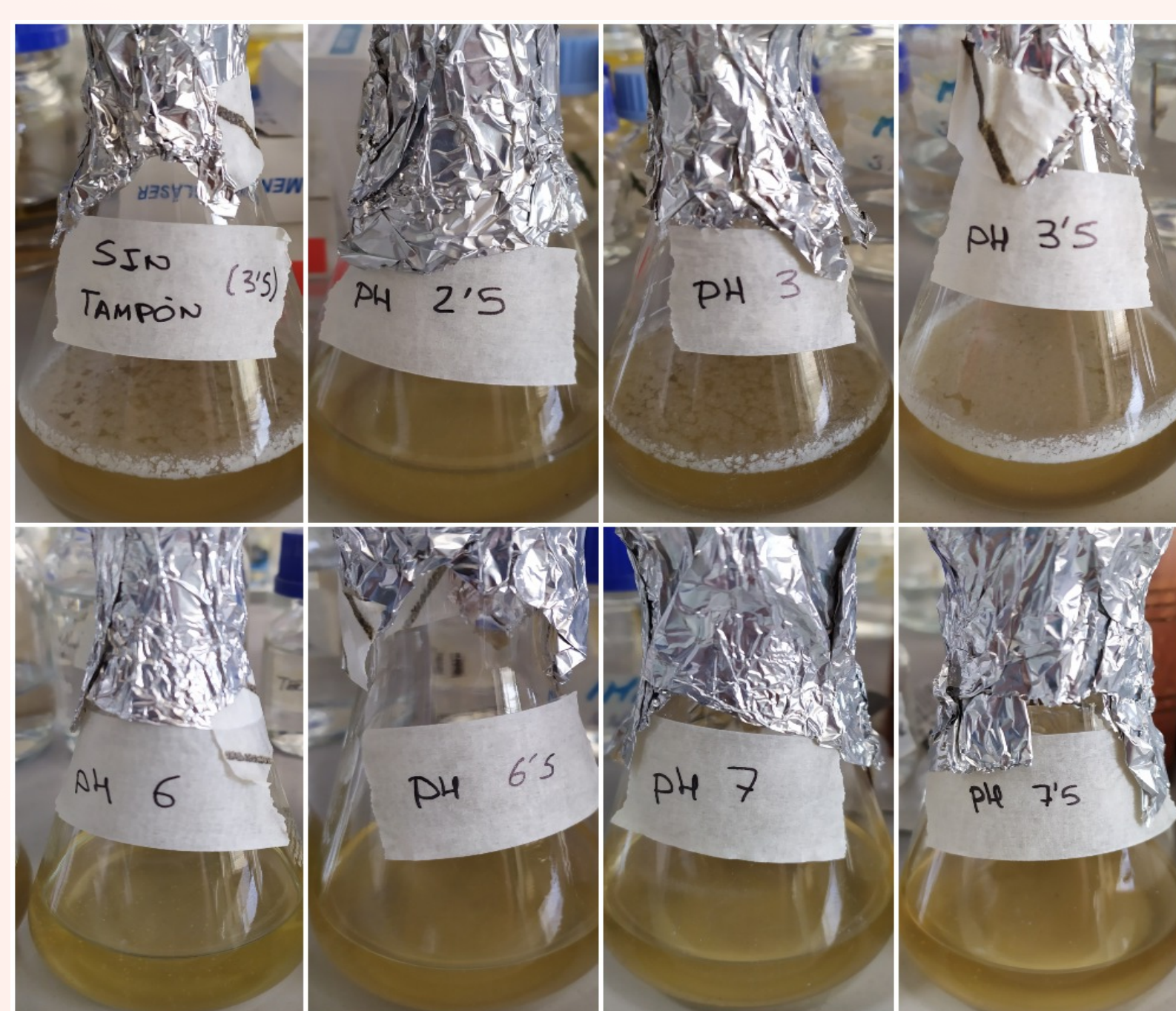


Figura 2. Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* formadora de flor crecidos a diferentes pH durante una noche (utilizando tampones citrato y fosfato) 5 días después de haber sido inoculados en vino.

FACTOR KILLER

Las levaduras Killer son aquellas que pueden segregar unas toxinas de carácter proteico con capacidad de matar a cepas sensibles de la misma especie. Algunos estudios (Cantoral y Rodríguez, 2010) han demostrado que durante la fermentación del mosto las levaduras Killer pueden desplazar a otras cepas sensibles, por lo que introducir este fenotipo a una cepa que queramos instaurar en una bota podría suponer una ventaja competitiva frente a otras que ya estuvieran instauradas. Una cepa Killer y formadora de flor fue tratada con ciclohexamida para que perdiera el factor killer, y se comprobó que dicha cepa se hacía sensible a la toxina al perder esta capacidad (Figura 3).

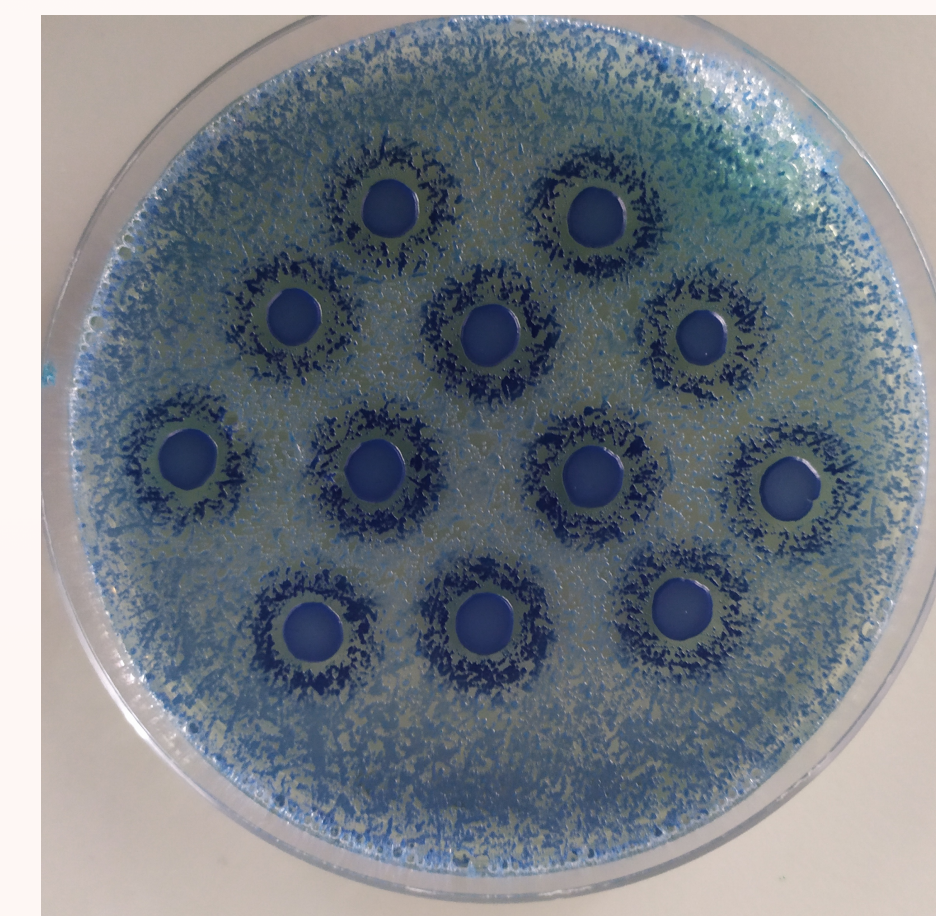


Figura 3. Ensayo killer con cepas productoras de la toxina y formadoras de flor sobre un fondo sensible de la misma cepa sin dicho factor. Medio YPD-MB pH 4.5 para teñir células muertas.

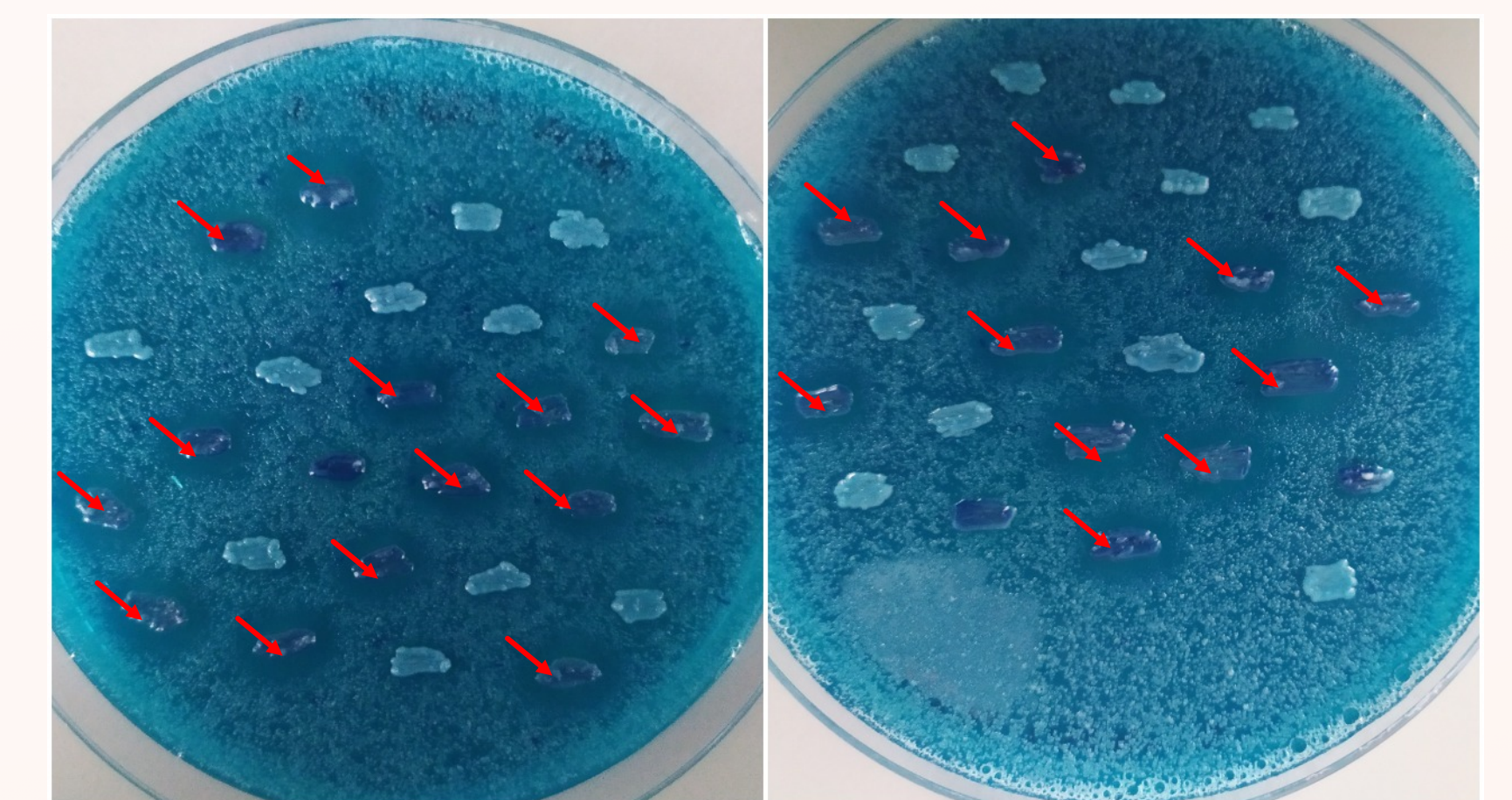


Figura 4. Ensayo killer con 50 colonias al azar del ensayo de competencia entre cepas Killer y no Killer sobre un fondo de la cepa MMY2 sensible a la toxina. Las flechas indican las colonias que tienen fenotipo killer. Medio YPD-MB pH 4.5 para teñir células muertas y que la toxina sea estable.

Para determinar si la presencia de este factor suponía una ventaja, una desventaja o no afectaba a la competencia entre cepas se pusieron ambas (con y sin el factor killer) a competir en medio de formación de flor en la misma proporción. Una semana más tarde se observó que la proporción de ambas cepas seguía siendo aproximadamente del 50%, por lo que no se puede determinar que haya habido desplazamiento (Figura 4). Sin embargo, aún es necesario volver a realizar el ensayo de nuevo tras varias semanas para ver si este factor tiene algún efecto sobre la capacidad competitiva de la levadura.

CONCLUSIONES

Tras los experimentos realizados hemos observado una aparente homogeneidad en las levaduras encargadas de la formación de la flor en las botas estudiadas. Posteriormente hemos establecido que el velo se forma más rápido cuanto mayor sea el inóculo de levadura que utilizamos. Queda determinar que concentración de levadura es idónea utilizar de forma que sea conveniente para la bodega, según motivos logísticos y económicos. Por otra parte, parece que hacer crecer la levadura a un pH determinado no es necesario antes de la inoculación, pues de forma natural el velo se produce de la manera más óptima. Finalmente, aunque parece que las cepas killer no desplazan en el entorno estudiado a otras cepas sensibles a la toxina, es necesario continuar su estudio en el tiempo para observar si estos resultados previos son consistentes.

REFERENCIAS

- Barrales, R.R., Jiménez, J., Ibeas, J.I. (2008) Identification of Novel Activation Mechanisms for FLO11 Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 178, 145-156.
- Bayly, J.C., et al. (2005) Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 5, 1151-1156.
- Berlanga, T. M., Peinado, R., Millán, C., Mauricio, J. C., and Ortega, J. M. (2004). Influence of blending on the content of different compounds in the biological aging of sherry dry wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9), 2577-2581.
- Cantoral, J. y Rodríguez, J. (2010). «El singular mundo de las levaduras enológicas». *Actualidad SEM*: 33-38.
- Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdígones, F., and Jimenez, J. (1997). Dynamics of flor yeast populations during the biological aging of sherry wines. *American journal of enology and viticulture*, 48(1), 75-79.
- Legras, J. L., Moreno-García, J., Zara, S., Zara, G., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., and Moreno, J. (2016). Flor yeast: new perspectives beyond wine aging. *Frontiers in microbiology*, 7, 503.