



## Aislamiento e identificación de levaduras vínicas de viñedos ecológicos

Olga Lucio <sup>1</sup>, Lucía Polo <sup>1</sup>, Isabel Pardo <sup>1</sup>, Sergi Ferrer <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia, e-mail: olucos@alumni.uv.es

### Resumen

El concepto "cultivo ecológico" se ha puesto de moda. Sin embargo, hay diferentes aspectos a tener en cuenta para determinar si una producción agraria puede englobarse bajo la etiqueta "cultivo ecológico". El "cultivo ecológico" se basa en un tratamiento del suelo para obtener productos de acuerdo con ciertas condiciones en las que se supone que no se han utilizado fertilizantes o productos químicos comerciales.

Los objetivos de nuestro trabajo han sido la obtención de cultivos puros de levaduras aisladas de viñedos ecológicos de la Denominación de Origen Utiel-Requena y una selección y caracterización taxonómica de cepas para una posterior utilización y aplicación a nivel industrial.

Se han aislado numerosas cepas desde el viñedo de cultivo ecológico que cultivaba las variedades de Tempranillo, Bobal y Cabernet-Sauvignon. También se han hecho aislamientos de uva y al inicio, mitad y final de la fermentación alcohólica en una bodega de cultivo ecológico. Estas cepas fueron identificadas y tipificadas por las técnicas del ITS y DNA mitocondrial con digestión enzimática.

**Palabras clave:** cultivo ecológico, levaduras vínicas, ITS, DNA mitocondrial, selección.

### 1. Introducción

La agricultura ecológica es un sistema agrario cuyo objeto es la obtención de alimentos de máxima calidad, respetando el medio ambiente y conservando la fertilidad de la tierra mediante la utilización óptima de los recursos naturales. Para ello emplea métodos de cultivo biológicos y mecánicos y evita los productos químicos de síntesis. La agricultura ecológica se diferencia de otros sistemas de producción agrícola en varios aspectos. Uno de ellos es que la fertilidad y actividad biológica del suelo se mantiene mediante el cultivo de leguminosas, el abonado en verde y las plantas de enraizamiento profundo, siguiendo un programa de rotación de cultivos anual. Esta medida puede complementarse incorporando a la tierra estiércol procedente de explotaciones ganaderas y materias orgánicas transformadas en compost o sin transformar. Se pueden incorporar fertilizantes orgánicos o minerales naturales poco solubles que no se obtienen mediante síntesis química. La protección de las plantas contra los parásitos, las enfermedades y las malas hierbas debe realizarse evitando al máximo la utilización de productos fitosanitarios y herbicidas [1]. El estudio a lo largo de los años de la dinámica, cuantificación y composición de la microbiota responsable de las fermentaciones espontáneas en la vinificación ha mostrado diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en las levaduras aisladas en una misma zona vitivinícola, e incluso dentro de los depósitos de una misma bodega. Las causas de esta variabilidad pueden ser: cambios en las técnicas de vinificación, diferencias en las vendimias, cambios en las condiciones climáticas, en el tipo de viticultura, etc. Por tanto, la necesidad de asegurar la fermentación alcohólica, así como la tipicidad y reproducibilidad de los vinos, requiere cada vez más el uso de cultivos iniciadores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es el aislamiento y selección de levaduras autóctonas de la comarca Utiel-Requena y procedentes de viñedos de cultivo ecológico para poder utilizarlas como cultivos iniciadores en la producción de vino.

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Toma de muestras.

Por un lado se tomaron muestras de uvas de viñedos de tres variedades diferentes: Bobal, Tempranillo y Cabernet Sauvignon, destinados a la vinificación en la bodega "Fuenteseca" de Camporrobles (Valencia). El muestreo de las uvas se realizó recogiendo 4 racimos de 4 puntos equidistantes del viñedo, manteniendo así la aleatoriedad de la muestra. Los racimos se recogieron en bolsas de plástico estériles y cerradas. Con las uvas realizamos en el laboratorio microvinificaciones para aislar las levaduras en diferentes fases de la fermentación alcohólica espontánea sin contacto con el material de bodega. Por otro lado también se tomaron muestras en bodega en diferentes fases de la vinificación de las uvas de las parcelas arriba descritas. Estas muestras se recogieron en tubos troncocónicos estériles y se transportaron al laboratorio en frío para evitar fermentaciones espontáneas.

### 2.2. Microvinificaciones.

Se realizaron 5 microvinificaciones con las uvas de las muestras de 3 variedades diferentes, se estrujaron los racimos dentro de las bolsas estériles en un triturador de paletas (Stomacher) y se extrajo el mosto. El mosto se introdujo en una botella estéril de cristal de 2 litros junto con el 20 % de hollejos. Además se añadió metabisulfito potásico en una dosis de 14 g/hL. La botella se cerró con un tapón donde se colocó un filtro de aire estéril para favorecer la salida de los gases de la fermentación. Se tomaron muestras para el aislamiento de levaduras en el mosto recién estrujado, en fermentación tumultuosa, y al final de la fermentación alcohólica.

### 2.3. Aislamiento de levaduras.

Se aislaron levaduras tanto de las muestras provenientes de la microvinificaciones en laboratorio como de las muestras tomadas en bodega. Para ello se sembraron las diluciones adecuadas de las muestras sobre dos tipos de medios de cultivo selectivos para levaduras del género *Saccharomyces* [2]: medio YPD suplementado con antibióticos: glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, peptona micológica 10 g/l, eritromicina 70 µg/l, cloramfenicol 50 µg/l, agar 20 g/l, agua 1 l y medio YPD suplementado con metabisulfito potásico y etanol: glucosa 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, peptona micológica 10 g/l, metabisulfito potásico esterilizado por filtración 150 mg/l, etanol 120 ml/l, agar 20 g/l, agua 1 l; se ajustó el pH a 5,5 y se esterilizó a 115° C durante 30 minutos.

### 2.4. Selección de levaduras.

Las diferentes morfologías que aparecieron en los medios anteriores fueron aisladas tomando 4 colonias de cada una de ellas y se sembraron en placas de medio YPD.

**Observación microscópica.** Los diferentes aislados se observaron al microscopio para eliminar los aislados con una morfología que no correspondiese con levadura ovalada, típica de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Amplificación de la región ITS.** De las levaduras seleccionadas se realizaron amplificaciones por PCR de la región ITS del DNaR. ( ver Fig. 1) Los 50 µl de la reacción de PCR contenían: 16,5 µl de agua mili U, 1 µl de cada cebador, 1 µl de mezcla de NTPs, 2 µl de Mg<sup>++</sup>, 5 µl de tampón RB, 25 µl de suspensión de levaduras en agua mili U y 0,5 µl de Taq polimerasa "Eurotaq". Los cebadores utilizados fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'). Los parámetros de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto, ensamblaje a 52° C durante 2 minutos, y extensión a 72° C durante 2 minutos, con una extensión final a 72° C durante 10 minutos [3].

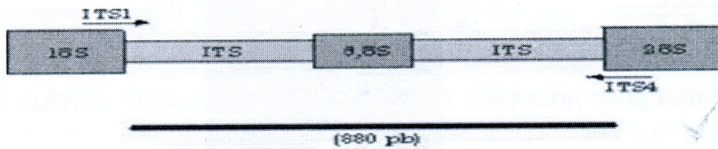


Figura 1. Esquema de la estructura de las subunidades repetidas de los genes de los rRNA en la levadura. Se indican las posiciones de dos secuencias internas transcritas (ITS) y la posición relativa de los cebadores más corrientemente usados (ITS1 y 4). Las medidas de los amplificadores que se obtienen en una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* se muestran en la parte inferior de la figura; varían según la especie de levadura que se ensaye.

**Análisis de restricción del DNA mitocondrial (RFLP).** Con las levaduras seleccionadas en el proceso anterior se realizaron patrones de restricción del DNA mitocondrial. Para extraer el DNA purificado de las levaduras se crecieron en un tubo con 5 ml de YPD durante toda la noche y con las células se realizó un protocolo simplificado para la purificación del DNA total. [4] El DNA se digirió con el enzima *HinfI* (Roche) durante toda la noche a 37°C. El patrón de restricción se observa tras una electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % a 20 Voltios durante 16 horas y tras una tinción de una hora en bromuro de etidio.

### 3. Resultados y Conclusiones

En las muestras sembradas en los medios YPD suplementado con antibióticos e YPD suplementado con metabisulfito potásico y etanol se aislaron 132 morfologías coloniales diferentes. Tras la observación microscópica se descartaron 42 aislados, de los cuales 25 eran levaduras de morfología apiculada, 15 eran bacterias y 2 eran hongos. De esta manera se seleccionaron 90 aislados que coincidían con la morfología microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* (ver figura 2).

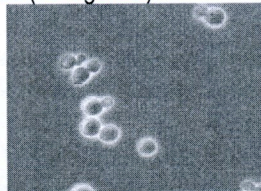


Figura 2. Morfología ovalada típica de *Saccharomyces cerevisiae*.

A estos 90 aislados se les aplicó la técnica de amplificación por PCR de la región ITS del DNA. Con esta técnica se diferencian las levaduras a nivel de género, de tal manera que en el género *Saccharomyces* se produce una amplificación de 880 pb [3]. Por este método se seleccionaron 64 aislados de este género (ver figura 3).

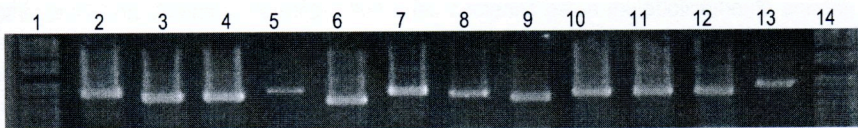


Figura 3. Amplificación de la región ITS. Carreras 1 y 12: cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae* Enolab 2056 (control positivo de 880 pb), de la 2 a la 11 pertenecen a levaduras aisladas y las carreras exteriores pertenecen al patrón 1 Kb Plus (Invitrogen).

Estos 64 aislados se tipificaron por análisis de los patrones de restricción del DNA mitocondrial (RFLPs), descartándose de esta manera las cepas con el mismo perfil y seleccionando un aislado de cada perfil diferente ya que mismos perfiles pertenecen a la misma cepa de levadura (ver figura 4). Paralelamente se realizó la misma técnica identificativa a las 5 cepas comerciales inoculadas en la bodega, descartando así las cepas aisladas con el mismo perfil que las comerciales, seleccionando únicamente las cepas autóctonas.

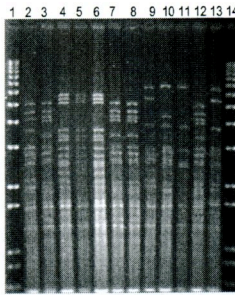


Figura 4: Patrones de restricción del DNA mitocondrial. Las 12 carreras centrales pertenecen a 10 µl de DNA purificado digerido con HinfI de levaduras aisladas en microvinificaciones. Las 2 carreras laterales pertenecen a 5 µl de patrón 1 Kb Plus (Invitrogen)

De esta forma, hemos aislado varias cepas de *S. cerevisiae* procedentes de viñedo de cultivo ecológico, y que en este momento nos encontramos en proceso de selección, basado en varios criterios (ver tabla 1) para escoger levaduras autóctonas de cultivo ecológico que se adapten bien al proceso de vinificación y que den como resultado vinos de calidad [5].

Tabla 1. Algunas de las características deseables y no deseables para la producción de vinos de calidad.

CARACTERÍSTICAS DESEABLES	CARACTERÍSTICAS NO DESEABLES
Alta tolerancia al etanol	Producción de SO <sub>2</sub>
Total degradación de los azúcares fermentables	Producción de H <sub>2</sub> S
Resistencia al SO <sub>2</sub>	Producción de acidez volátil
Capacidad fermentativa a bajas temperaturas	Producción de acetaldehído y piruvato
Máxima reducción de la fase de latencia	Producción de espuma
Degradación del ácido málico	Formación de precursores de carbamato de etilo
Capacidad fermentativa a bajas presiones	Producción de polifenol oxidasas
Producción de glicerol	
Producción de β- glucosidasa	
Fenotipo killer	

#### 4. Bibliografía

- [1] Anónimo <http://www.larioja.org/npRioja/default/defaultpage.jsp?idtab=438920>
- [2] Kish, S., Sharf, R. & Margalith, P. 1983. **A note on a selective medium for wine yeasts.** *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 177-179.
- [3] Guillamón, J.M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; & Querol, A. 1998. **Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region.** *Arch. Microbiol.* **169**, 387-392.
- [4] Querol, A.; Barrio, E.; & Ramon, D. 1992. **A comparative study of different methods of yeast strain characterization.** *System. Appl. Microbiol.* **15**, 439-446.
- [5] Degree, R. 1993. **Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria.** In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. 421-447.

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CENIT-2008 1002 y Ecovitis S.A.