



Selección e implantación de cepas de levadura del género *Saccharomyces* en la producción de vinos de la Denominación de Origen (DO) Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina

Aitor Rementería¹, José Antonio Rodríguez¹, Ester Calvo¹, Ramón Amenabar³, José Ramón Muguruza³, Ana Belén Vivanco², Javier Garaizar² y María Jesús Sevilla¹

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, ¹Facultad de Ciencia y Tecnología y ²Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU); ³Servicio Agrícola, Departamento de Agricultura, Diputación Foral de Vizcaya, España

Resumen

El Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina es un vino blanco característico del País Vasco con denominación de origen (BOPV 14/6/94). El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas de levaduras autóctonas para mejorar las condiciones de elaboración manteniendo las características propias de los vinos de esta región. Se aislaron levaduras identificadas como *Saccharomyces bayanus* durante las campañas 1996-1998 y se sometieron a un proceso selectivo en función de sus características enológicas y su comportamiento fermentativo. Tres de las cepas seleccionadas se inocularon a escala de bodega sobre mostos monovarietales de las dos variedades de uva aceptadas en esta denominación de origen, *Hondarrabi Zuri* y *Folle Blanche*. La implantación de las cepas inoculadas en las respectivas vinificaciones fue controlada mediante el análisis del polimorfismo de restricción del ADN mitocondrial (REAmT) con la enzima *AluI*, dada su especificidad, rapidez y sencillez tecnológica en comparación con otras técnicas de tipificación molecular utilizadas también en este estudio: cariotipificación cromosómica mediante electroforesis en campo pulsado, *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR) y análisis del polimorfismo de restricción originado por la enzima *SfiI* de corte infrecuente (REA infrecuente). Este estudio ha demostrado que cepas con comportamientos fenotípicos diferentes presentan los mismos patrones de restricción con REAmT, pero pueden ser diferenciadas con otras técnicas aplicadas en este estudio, como RAPD-PCR, que pese a su baja reproducibilidad puede ser una herramienta complementaria a REAmT. Nuestros resultados demuestran que, a pesar de utilizar cepas autóctonas seleccionadas, la inoculación de un caldo con una cepa no es garantía de que domine y dirija la fermentación del mosto, ya que una misma cepa puede imponerse o no dependiendo del tipo de mosto y de la campaña de que se trate. De las levaduras estudiadas, la cepa 2 fue la que mejores resultados proporcionó tanto en cata como en implantación, por lo que podría ser utilizada para la producción de Chacolí de Vizcaya con fines comerciales, sobre todo de mostos procedentes de *Folle Blanche*.

Palabras clave

Saccharomyces, Chacolí, Cepa, Implantación, Selección, Tipificación, Vino

Dirección para correspondencia:

Dr. Aitor Rementería
Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU
Barrio Sarriena s/n
48940 Leioa (Vizcaya), España
E-mail: aitor.rementeria@ehu.es

Aceptado para publicación el 25 de enero de 2006

©2006 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00

Selection and implantation of yeast strains of genus *Saccharomyces* at a winery regulated by Appellation Contrôlée “Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina”

Summary The white wine “Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina” is characteristic from The Basque Country region and regulated under Appellation Contrôlée standards (BOPV 14/6/94). The objective of this study was the identification and selection of autochthonous yeast strains, to improve the conditions used to maintain the typical characteristics of this region wines. Yeasts identified as *Saccharomyces bayanus* isolated around these fields from 1996 to 1998, were subjected to a selective procedure based on enological characteristics and fermentative behaviour. Three of the selected strains were used to inoculate, at winery scale, two grape juice varieties accepted by the Appellation Contrôlée (*Hondarrabi Zuri* and *Folle Blanche*). The inoculated strains on the respective “vinifications” was followed by restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA (REAMt) method with *AluI* enzyme, due to their specificity, short outcome, and technological simplicity compared with other molecular typing methods such as: chromosomal karyotyping analyzed by pulsed field gel electrophoresis, Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) and restriction fragment length polymorphism using the infrequently cutting enzyme *SfiI* (REA infrequent). This study demonstrated that strains with different phenotypic traits could show indistinguishable restriction patterns with REAMt, but could be discriminated using other typing methods such as RAPD-PCR, which although showing low reproducibility could be used as complementary to REAMt. Our results demonstrate that in spite of using autochthonous selected strains, the inoculation of musts with a particular strain do not guarantee its predominance and driving fermentation features. Of all yeast strains studied, strain no. 2 showed the best results in sensory testing and at the implantation process. Therefore, it could be used with commercial purposes for the production of “Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina”, especially when using musts from *Folle Blanche*.

Key words *Saccharomyces*, Chacolí, Strain, Implantation, Selection, Typing, Wine

Las técnicas de elaboración vitivinícola tradicional han dado paso a procesos de carácter más industrializado, aunque persiste una gran variabilidad en los sistemas de elaboración y técnicas utilizadas. La fermentación espontánea del mosto puede acarrear problemas derivados del exceso de ácido málico, de la poca capacidad de fermentación de las levaduras, de las paradas de fermentación, de la excesiva formación de espuma, y/o de la obtención de caldos que no reúnan las características organolépticas propias de las diferentes denominaciones de origen (DO). Aunque se han usado levaduras seleccionadas en muchos países con excelentes resultados [7], su uso puede tener el inconveniente de eliminar parte de las peculiaridades de los vinos de una región. Existe, por tanto, una necesidad de obtener cepas de *Saccharomyces* mejor adaptadas a las diferentes regiones productoras de vino, a sus variedades de uva, a sus prácticas de viticultura y a sus técnicas de elaboración del vino [24]. En la mayoría de las zonas productoras de vino del territorio español existen programas de caracterización y selección de levaduras autóctonas, siendo los avances conseguidos en esta línea muy alentadores en cuanto a la calidad y peculiaridad de los vinos obtenidos [6,8-14,26-28,30,33,37]. El Chacolí de Vizcaya es un vino característico del País Vasco que obtuvo recientemente la denominación de origen (BOPV 14/6/94). Los primeros estudios ecológicos, han demostrado la participación mayoritaria de cepas de la especie *Saccharomyces bayanus* en los caldos de esta región [34]. El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas de levadura autóctonas de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina para mejorar las condiciones de elaboración manteniendo las características propias de los vinos de esta región.

Materiales y métodos

Microorganismos, aislamiento, identificación y mantenimiento. Las levaduras utilizadas fueron aisladas de distintas bodegas de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina durante las campañas de 1995/96, 1996/97, 1997/98, 1998/99 y 1999/2000, como se recoge en Rementería et al. [34], e identificadas según Kurtzman y Fell [15]. Se estudiaron las características morfológicas (morfología celular y tipo de reproducción vegetativa, la forma, el color, la textura y el tamaño de las colonias crecidas en agar de Sabouraud, la formación de velo, película, anillo, turbidez y sedimento del cultivo, y la formación de esporas), las características fisiológicas y bioquímicas, test del DBB (Diazonium Blue B sal, Sigma-Aldrich Química SA, España) fermentación de azúcares, asimilación de carbohidratos y de compuestos nitrogenados, así como su capacidad de crecimiento en medio libre de vitaminas, las temperaturas máximas de crecimiento y su capacidad de hidrólisis de la arbutina. Se utilizaron también cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 1478, CECT 1678, CECT 1682, CECT 1891 y CECT 1890) y siete cepas comerciales que fueron proporcionadas por el Centro Experimental de Zalla, (perteneciente a la Diputación Foral de Vizcaya y que entre otros cometidos se encarga del estudio y mejora de las técnicas de cultivo de la vid y de las técnicas de elaboración de vinos para la mejora del Chacolí de Bizkaia).

Los estudios de validación de las técnicas de tipificación molecular se realizaron sobre una colección de 33 aislamientos de *Saccharomyces sensu stricto* no relacionados entre sí, 23 de los cuales fueron obtenidos de distintas

bodegas de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina durante las campañas de 1995/96, 1996/97 y 1997/98. Las cepas CECT 1478, CECT 1678 y CECT 1682, y las siete cepas comerciales proporcionadas por el Centro Experimental de Zalla completaron el grupo control para las técnicas moleculares.

Los procesos de selección se llevaron a cabo con 15 aislamientos pertenecientes a la especie *Saccharomyces bayanus*, numerados del 1 al 15, procedentes de nueve fermentaciones espontáneas de mostos monovarietales de uvas *Hondarrabi Zuri* y *Folle Blanche*, realizadas en seis bodegas de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina durante las campañas de 1996/97 y 1997/98 (Tabla 1). De entre los aislamientos de las fermentaciones mencionadas, se seleccionaron aquellos con perfiles fenotípicos diferentes obtenidos con el sistema ID32C (bioMérieux, Francia).

Todos los microorganismos utilizados en este estudio fueron mantenidos sobre medio agar de Sabouraud con resiembras periódicas.

Producción de ácido sulfhídrico. Este parámetro fue evaluado según lo descrito por Gutiérrez [8] en agar sulfito-bismuto mediante la siembra de las levaduras en estría, detectándose la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) por la presencia de un precipitado negro de sulfuro de hierro.

Sensibilidad y producción de factor killer. La determinación de fenotipo *killer* se realizó según lo descrito por Gutiérrez [8], en medio agar YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2%, pH 4,5), utilizando como controles dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, una productora del factor *killer* K2 (CECT 1891) y otra sensible a dicho factor (CECT 1890).

Microfermentaciones. El comportamiento fermentativo de los aislamientos de levaduras se estudió mediante microvinificaciones. Inicialmente se realizaron fermentaciones de 100 ml de mosto sintético (glucosa 22%, KH₂PO₄ 2%, (NH₄)₂SO₄ 0,5%, MgSO₄·7H₂O 0,4%, extracto de levadura 0,03%). Los mostos sintéticos estériles fueron inoculados con 10⁵ células/ml y mantenidos a 20 °C. Las fermentaciones finalizaron en todos los casos al cabo de 15 días. Estas fermentaciones fueron seguidas mediante medida de la turbidez (Abs₆₆₀) y de la concentración de azúcar en el medio. Los análisis químicos de los mostos sintéticos fermentados fueron realizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU, siguiendo las técnicas recogidas

en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Reglamento nº 2676/1990 [5]. Se ensayó también la resistencia y el comportamiento fermentativo de las cepas tras la adición de metabisulfito sódico (200 mg/l), o de etanol (10% concentración final) al mosto sintético.

Se observó también el comportamiento fermentativo de los aislamientos sobre mostos naturales. Se inocularon 10⁵ levaduras/ml en un volumen de 5 l de mostos monovarietales no estériles, procedentes de uvas *Hondarrabi Zuri* o *Folle Blanche*, aceptadas en la denominación de origen. En este caso se valoró también la calidad de los caldos producidos mediante cata.

Estudios en bodega. En la Bodega del Centro Experimental de Zalla, se utilizaron cada una de las cepas preseleccionadas como inóculo de dos fermentadores industriales con 100 l (campaña 1998) y 200 l (campaña 1999) de mostos monovarietales de *Hondarrabi Zuri* o *Folle Blanche*, respectivamente. En cada uno de ellos se inculó una concentración de 10⁵ levaduras/ml y se tomaron muestras de 50 ml en el momento de la inoculación (tras la adición de metabisulfito sódico 10 g/l), cuando se alcanzó la fermentación tumultuosa (densidad de 1.030-1.035 g/l) y al final de la fermentación (densidad de 990 g/l). Estas muestras se procesaron para la obtención de aislamientos de levaduras como se indica anteriormente.

Técnicas de tipificación molecular para el estudio de implantación de cepas. Se utilizaron cuatro técnicas: cariotipificación cromosómica mediante electroforesis en campo pulsado, *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR), análisis del polimorfismo de restricción de corte infrecuente (REA infrecuente) y análisis del polimorfismo de restricción del ADN mitocondrial (REAMt), técnicas descritas en Rementeria et al. [35]. En el caso de RAPD-PCR, se aisló ADN de cultivos de levaduras crecidos durante 48 h en agar Sabouraud-cloranfenicol (Pronadisa, España) siguiendo una modificación del protocolo descrito por Lehmann et al. [16]. Se utilizó el sistema comercial *Ready-To-Go* de Pharmacia-Biotech (Amersham Biosciences, España). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min y 45 ciclos de amplificación (95 °C, 1 min; 36 °C, 1 min; 72 °C, 2 min). Para realizar el REAMt se siguió el método descrito por Querol et al. [29]. Se utilizaron tres enzimas de restricción: *RsaI*, *HinfI* y *AluI*, para digerir el ADN extraído de las levaduras. Para la cariotipificación se utilizó el método descrito por Arif et al. [1]. La extracción de los cromosomas íntegros se realizó sobre

Tabla 1. Bodega, origen y año de los aislamientos utilizados en el estudio de selección e implantación.

| Aislamiento nº | Bodega de origen | Variedad de uva | Campaña |
|----------------|--------------------------------|------------------------|---------|
| 1 | C.E. Zalla ^a | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1996/97 |
| 2 | Txakolinera Aretxondo, Mungia | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 3 | C.E. Zalla | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 4 | C.E. Zalla | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1996/97 |
| 5 | Txakolinera Aretxondo, Mungia | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 6 | C.E. Zalla | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 7 | C.E. Zalla | <i>Folle Blanche</i> | 1997/98 |
| 8 | C.E. Zalla | <i>Folle Blanche</i> | 1996/97 |
| 9 | Txakolinera Torre, Lezama | <i>Folle Blanche</i> | 1997/98 |
| 10 | C.E. Zalla | <i>Folle Blanche</i> | 1997/98 |
| 11 | Txakolinera M. Aguirre, Lezama | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 12 | Txakolinera M. Aguirre, Lezama | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1997/98 |
| 13 | Bakio | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1996/97 |
| 14 | Bakio | <i>Hondarrabi Zuri</i> | 1996/97 |
| 15 | Txakolinera Itxasmendi, Muskiz | <i>Folle Blanche</i> | 1996/97 |

^aCentro Experimental de la Diputación Foral de Vizcaya. Zalla.

un cultivo de levaduras embebidas en agarosa de bajo punto de fusión, separándose los cromosomas mediante electroforesis en campo pulsado. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: pulsos a 200 V de 70 segundos durante 15 h, seguidos de pulsos a 200 V de 120 segundos durante 10 h, a una temperatura constante de 12 °C. Por último, en el REA infrecuente se utilizó el método descrito por Arif et al. [1]. En este método se utilizó la enzima de restricción de corte infrecuente *Sfi*I. La separación de los fragmentos de ADN obtenidos se realizó mediante electroforesis en campo pulsado. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: pulsos a 200 V entre 10 y 30 segundos durante 22 h, seguidos de pulsos a 200 V entre 50 y 90 segundos durante 7 h, a temperatura constante de 12 °C. Para valorar la capacidad de tipificación de las técnicas moleculares, estas fueron aplicadas a la colección de 33 aislamientos de *Saccharomyces*, incluidos los 15 aislamientos del estudio de selección de cepas. En cada caso, los fragmentos obtenidos fueron detectados en geles de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio, fotografiados y digitalizados para su análisis posterior.

Análisis de los resultados. Los resultados de tipificación, reproducibilidad y discriminación se calcularon según se indica en Struelens et al. [38]. Los análisis de los perfiles de ADN obtenidos con las distintas técnicas moleculares en el estudio de la implantación de cepas se realizaron utilizando el software informático *Biolmage Electrophoresis Analyzer 50s* sobre un equipo de trabajo SPARC IV (*SunOs* 5.5.1). Para las conclusiones de los estudios de implantación que se indican en el apartado Resultados, se calcularon las semejanzas entre perfiles con el índice de Dice y se visualizaron los resultados mediante dendrogramas con el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*).

Resultados y discusión

Estudio de las características de los aislamientos y selección. Los 15 aislamientos de levaduras autóctonas (Tabla 1) sufrieron un proceso de selección recogido en la figura 1, similar al utilizado por Gutiérrez et al. [11] para la Denominación Rioja.

El primer criterio selectivo utilizado fue la producción de ácido sulfhídrico. La presencia de H₂S en los vinos disminuye la calidad de los mismos y se ha detectado que las cepas de levadura y sus características fisiológicas

están entre los principales factores que afectan a la presencia de este alterante en los caldos fermentados [39]. Sólo en tres aislamientos, los números 13, 14 y 15, se demostró la producción de H₂S en las condiciones utilizadas, por lo que fueron descartados para los estudios posteriores de selección.

El segundo criterio selectivo aplicado fue la sensibilidad y/o producción de factor *killer*. En el caso de la fermentación de vinos, y debido al bajo pH de los mostos, el factor K2 tendría mayor relevancia que otros de los factores *killer* de *Saccharomyces* [18]. La producción de este tipo de factores por parte de levaduras durante la fermentación afectaría a las cepas sensibles eliminándolas [20]. De hecho, en la mayoría de levaduras aisladas de producto final de fermentación en otros estudios se observa un comportamiento productor o neutro para estos factores [11,12,22]. Nuestro estudio demuestra estas mismas características ya que sólo dos aislamientos fueron sensibles, los números 11 y 12, siendo descartadas para estudios posteriores.

Seguidamente, los estudios del comportamiento fermentativo de los aislamientos en microfermentaciones de mosto sintético mostraron la velocidad de la fermentación, la concentración de azúcar residual al final de la fermentación, la acidez total y volátil (que deben ser mínimos) y la producción de etanol. En cada caso, se calculó la media de estos parámetros obtenidos, asignando puntos a los aislamientos cuando la velocidad de la fermentación, la concentración de azúcar residual, y la acidez total y volátil eran inferiores a esa media, y cuando la producción de etanol era superior a la misma. Las cepas que menores puntuaciones totales recibieron fueron eliminadas del estudio de selección. También se estudió la tolerancia al etanol y la capacidad fermentativa de las cepas añadiendo etanol en el mosto sintético antes de la inoculación de las levaduras. Todas las cepas fueron capaces de comenzar la fermentación a pesar de la presencia de etanol demostrando su resistencia al mismo. El comportamiento observado durante estas fermentaciones permitió eliminar del estudio de selección las cepas numeradas como 8, 9 y 10, cuyos valores de velocidad de fermentación, acidez volátil y total, residuo de glucosa no utilizada, concentración de etanol alcanzada y resistencia al mismo fueron inferiores a los del resto.

De modo general, en la elaboración de los vinos blancos típicos de esta denominación de origen se tratan los mostos con sulfito sódico. Por ello, se ensayó también la resistencia y la capacidad fermentativa de las cepas tras

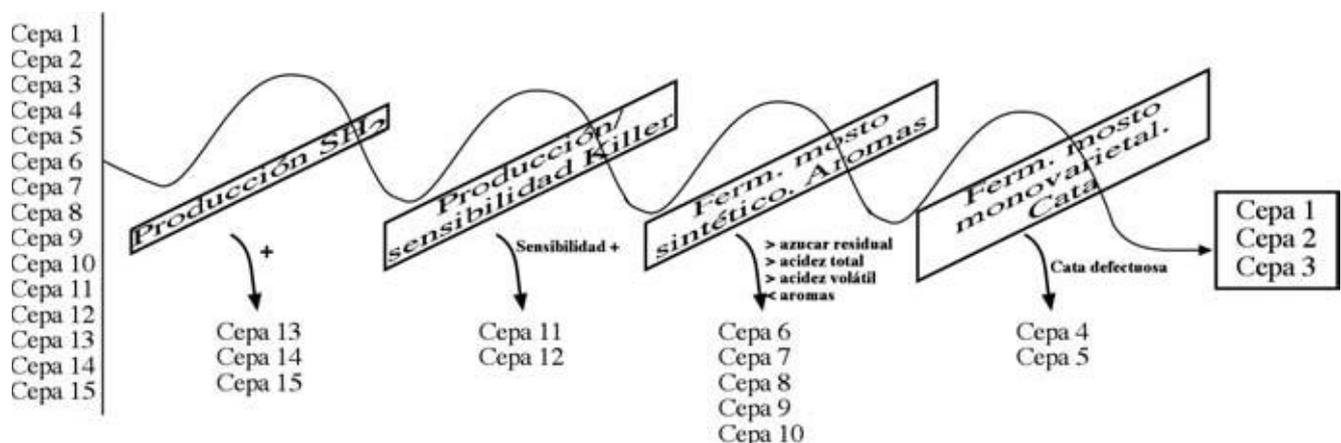


Figura 1. Pasos y procesos secuenciales utilizados en la selección final de tres cepas de *Saccharomyces bayanus* de la Denominación de Origen Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina.

la adición de metabisulfito sódico al mosto sintético. La cepa número 7 fue afectada por la presencia de este compuesto en el medio sintético, viendo alterada su capacidad fermentadora y produciendo mayores niveles de acidez total y volátil que el resto de las cepas. La producción de aromas sulfurosos fue detectada en las microfermentaciones realizadas por la cepa 6 en presencia de metabisulfito sódico. Estos dos aislamientos, números 6 y 7, fueron eliminados en este paso del proceso de selección aplicado.

Sólo cinco cepas, números 1 a 5, de las quince iniciales se consideraron apropiadas para estudiar su comportamiento fermentativo sobre mostos naturales. Se observó su comportamiento inoculándolas (10^5 levaduras/ml) en un volumen de 5 l de mostos monovarietales no estériles, procedentes de uvas *Hondarrabi Zuri* y *Folle Blanche*, aceptadas en la denominación de origen. En este paso se valoró también la calidad de los caldos producidos mediante cata. En los caldos fermentados por las cepas números 4 y 5 se detectó una producción de H₂S excesiva en ambos tipos de mostos, que afectaba a sus características organolépticas. Gutiérrez et al. [9] indican que una pequeña cantidad de este ácido puede ser producida por casi todos los aislamientos de *Saccharomyces*, y aunque estas cepas no mostraron esta característica en el agar sulfito-bismuto, las condiciones de fermentación de los mostos naturales pueden afectar a su producción. Park et al. [21] indican que modificando las condiciones de fermentación se puede disminuir, pero no evitar, que se produzca este componente de forma esporádica en la fermentación del mosto. Por ello, a pesar del buen comportamiento de las cepas 4 y 5 en los pasos anteriores del estudio también fueron descartadas. Sólo las cepas números 1, 2 y 3 consiguieron superar los criterios selectivos establecidos.

Tipificación molecular. Dado que la adición de levaduras no implica su implantación sobre mostos no estériles [10], es necesario monitorizar las fermentaciones para determinar el éxito de la inoculación. Existen recogidas en la literatura numerosas técnicas moleculares de tipificación que permiten la comparación entre aislamientos de la misma especie y que pueden aplicarse con este fin. En nuestro caso utilizamos cuatro técnicas: cariotipificación, RAPD-PCR, REA infrecuente y REAmt. Comenzamos el estudio aplicando dichas técnicas sobre la colección de 33 cepas de *Saccharomyces*, que se describen en la sección Materiales y métodos, calculando la tipabilidad, la reproducibilidad y la discriminación de cada técnica, valores que se muestran en la tabla 2. En el caso de la técnica RAPD-PCR, se utilizó el kit comercial *Ready-To-Go*, en el que se incluyen seis cebadores seleccionados por la casa

comercial. Los cebadores números 1, 3 y 5, no conseguían amplificación de fragmentos o presentaban un perfil de una única banda idéntica en todos los casos, por lo que en este estudio sólo se presentan los datos obtenidos con los cebadores 2, 4 y 6. Como se observa en la tabla 2, todas las técnicas excepto una presentaron altos niveles de discriminación y tipabilidad y una reproducibilidad elevada. La excepción fue la técnica RAPD-PCR, que solo alcanzó un 86% de reproducibilidad y que requería la combinación de los resultados obtenidos con las diferentes parejas de cebadores para obtener una elevada tipabilidad. Por ello, a pesar de su rapidez y facilidad de uso, esta técnica fue desestimada en el seguimiento de la implantación. Si bien las técnicas de cariotipificación y REA infrecuente proporcionaron muy buenos resultados, resultan técnicamente mucho más tediosas y complicadas si se comparan con la RAPD-PCR. Asimismo, las levaduras del género *Saccharomyces* pueden sufrir frecuentes reordenaciones y recombinaciones a nivel cromosómico, incluso durante la fermentación y adaptación a las condiciones industriales [23,25,32], mientras que el ADN mitocondrial se mantiene más estable. En base a estos datos, la técnica REAmt con la enzima *AluI* (índice de discriminación de 0,941), fue la elegida para el estudio de la implantación de las cepas. Otros autores [9,10,17,29,30,36] han utilizado también esta técnica para caracterizar cepas de *Saccharomyces* durante las vinificaciones, indicando su buena capacidad de discriminación. Sin embargo, cuando se estudiaron los resultados de su aplicación a los 15 aislamientos en este estudio de selección, incluidos en la colección de 33 cepas para la evaluación de las técnicas, se observó que a pesar de su comportamiento fermentativo y características fenotípicas diferentes, algunos de ellos presentaban perfiles idénticos con esta técnica (aislamientos números 1, 9, 13 y 14). Estos aislamientos pudieron ser diferenciados por RAPD-PCR mediante la combinación de los resultados obtenidos con las tres parejas de cebadores.

Implantación de las cepas en condiciones de bodega. En la Bodega del Centro Experimental de Zalla se utilizó cada una de las tres cepas seleccionadas como inóculo de dos fermentadores industriales con 100 l de mostos monovarietales de *Hondarrabi Zuri* y *Folle Blanche* respectivamente. Asimismo se realizaron fermentaciones espontáneas con ambos tipos de caldos monovarietales. En todos los casos la calidad de los caldos originados se determinó mediante cata. De las ocho fermentaciones analizadas se obtuvieron 428 aislamientos de levaduras, de los que 367 fueron identificados según lo descrito por Kurtzmann y Fell [15] como *S. bayanus*, especie típica de los

Tabla 2. Estudio de validación de las diferentes técnicas de tipificación molecular empleadas en este estudio para el estudio de implantación.

| | RAPD- PCR ^a | | | | REAMt ^b | | | Cariotipificación ^c | REA infrecuente ^d | Cariotipificación + REA infrecuente ^e |
|-----------------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------------------|--------------------|---------------|--------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| | Cebador 2 | Cebador 4 | Cebador 6 | Combinación cebadores | <i>Rsa I</i> | <i>Hinf I</i> | <i>Alu I</i> | | | |
| Tipabilidad ^f (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Reproducibilidad ^f (%) | 86 | 86 | 86 | 86 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Discriminación ^f | 0,918 | 0,689 | 0,903 | 0,996 | 0,934 | 0,934 | 0,941 | 0,974 | 0,969 | 0,982 |

Nota: Estudio realizado sobre una colección de 33 aislamientos de *Saccharomyces sensu stricto* no relacionados entre sí, 23 de los cuales fueron obtenidos de distintas Bodegas de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina, tres cepas suministradas por la CECT (CECT 1478, CECT 1678 y CECT 1682) y siete cepas comerciales proporcionadas por la Centro Experimental de Zalla, de la Diputación Foral de Vizcaya.

^aRAPD-PCR con los cebadores 2, 4 y 6 del sistema comercial Ready-To-Go de Pharmacia-Biotech (Amersham Biosciences, Barcelona, España).

^bAnálisis del polimorfismo de restricción del ADN mitocondrial (REAMt).

^cCariotipificación cromosómico mediante electroforesis en geles en campo pulsado.

^dAnálisis del polimorfismo de restricción originado por la enzima *SfiI* de corte infrecuente (REA infrecuente).

^eCombinación de los resultados obtenidos con las técnicas de cariotipificación y REA infrecuente

^fParámetros calculados según Struelens et al. [38].

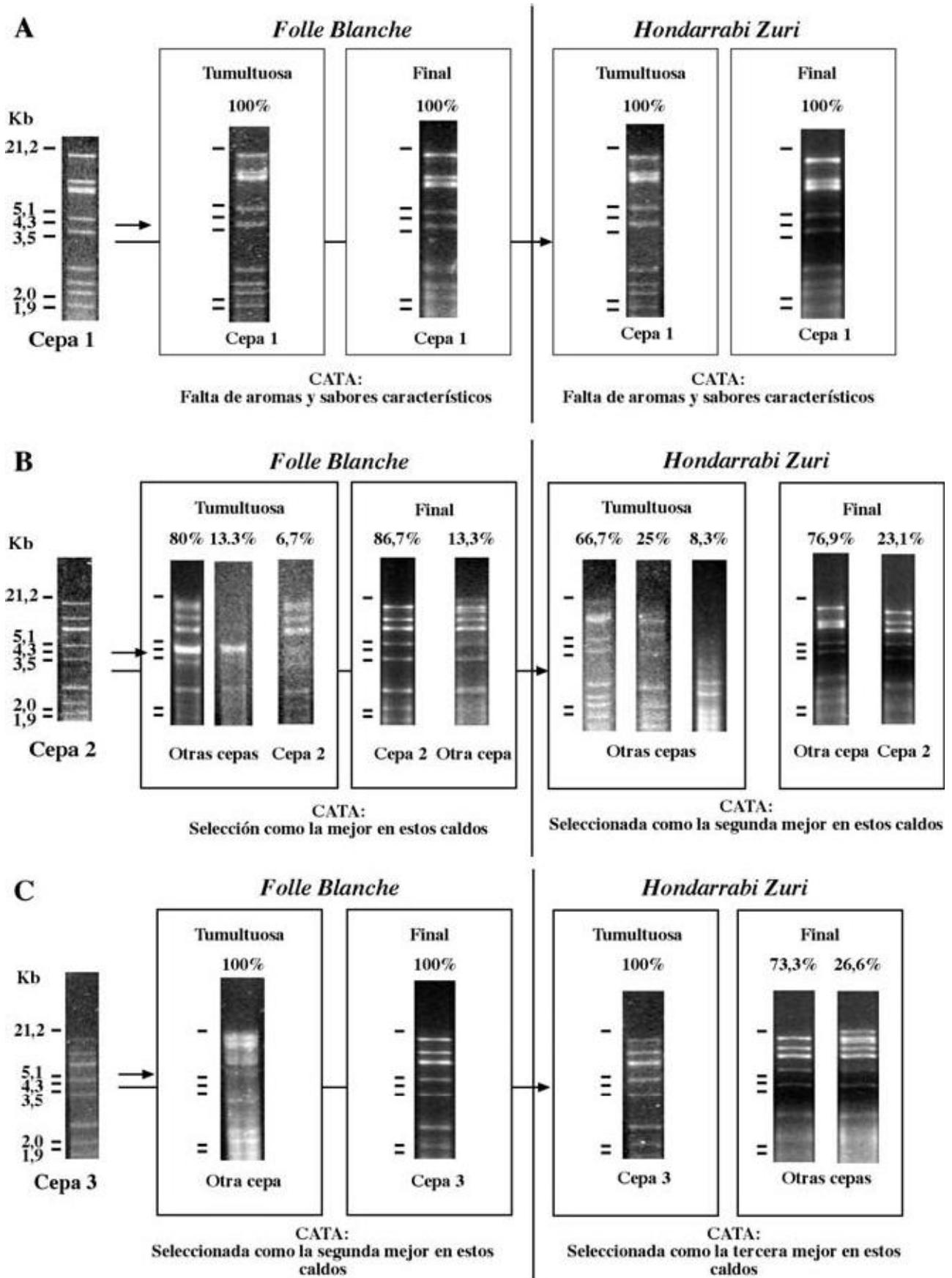


Figura 2. Perfiles genéticos obtenidos mediante la técnica de REAmt con la enzima *AluI* de los aislamientos de *Saccharomyces bayanus* en las fermentaciones de mostos monovarietales *Folle Blanche* y *Hondarrabi Zuri* inoculadas con las cepas 1 (A), 2 (B) y 3 (C), realizadas en la campaña de 1998/99. Resultados de cata y frecuencia de los perfiles en fermentación tumultuosa (densidad de 1.030-1.035 g/l) y final de la fermentación (densidad de 990 g/l). Marcador de peso molecular de ADN Fago Lambda digerido con *HindIII* y *EcoRI*.

caldos de la Denominación de Origen Chacolí [34]. Los 367 aislamientos fueron procesados mediante la técnica REAmT para estudiar la implantación de las levaduras inoculadas. A diferencia de lo observado por Gutiérrez et al. [9], en fermentaciones de caldos inoculados con la DO Rioja, en las que detectaron un único patrón de REAmT coincidente con la cepa inoculada, observamos patrones diferentes en la mayoría de las fermentaciones coincidiendo con lo descrito por otros autores [3,14,30]. Los datos del análisis de perfiles de ADN obtenidos tanto visualmente como mediante el sistema informático fueron coincidentes y mostraron que las tres cepas inoculadas se comportaron de forma diferente entre sí y según el tipo de mosto. La cepa 1 se implantó en todas las fermentaciones en las que se inoculó, siendo el suyo el único patrón de REAmT observado en esas fermentaciones inoculadas (Figura 2A). Sin embargo, el estudio de cata realizado por el panel de catadores de los vinos producidos por esta cepa consideró los caldos con poco aroma y sabor, y relativamente alejados de los caldos tradicionales de esta denominación de origen. Los estudios moleculares demostraron que la cepa 2 se implantó débilmente en la fermentación tumultuosa y mayoritariamente al final en los mostos de la variedad de uva *Folle Blanche* (Figura 2B). Sin embargo, esta cepa solo fue detectada en el final de fermentación de los mostos de *Hondarrabi Zuri* sin ser la cepa mayoritaria. Según fue establecido en cata, y comparándolos con caldos originados por fermentaciones espontáneas o incluso inoculados con cepas comerciales (no incluidas en este estudio), los caldos inoculados con esta cepa fueron considerados de la mejor calidad cuando se trataba de caldos procedentes de *Folle Blanche* y los segundos mejores cuando se fermentaban mostos de *Hondarrabi Zuri*. También los caldos producidos por la cepa 3 fueron considerados de buena calidad por el panel de catadores, pero en este caso la cepa inoculada dominó el final de la fermentación de mostos de *Folle Blanche*, presentándose únicamente en el comienzo de la fermentación de mostos procedentes de *Hondarrabi Zuri*, siendo sustituida al final de la fermentación por cepas silvestres (Figura 2C). Este fenómeno de sustitución de unas cepas por otras durante la

vinificación ya ha sido apuntado por otros autores, sugiriendo que en cada momento solo unas pocas cepas pueden dirigir la fermentación [9,30,36,37]. Excepto en el caso de la cepa 1, los caldos producidos por estas cepas autóctonas seleccionadas resultaron en el proceso de cata equivalentes en calidad tanto a los de fermentación espontánea como a los producidos inoculando cepas comerciales aceptadas en esta denominación de origen. Tanto la cepa 2 como la cepa 3 fracasaron en dirigir completamente la fermentación tras su inoculación en mostos de *Hondarrabi Zuri*, pese a proceder del producto final de la fermentación de mostos de esta variedad de uva. A pesar de ello, el análisis químico de los vinos (datos no mostrados) y la valoración del panel de catadores permitió seleccionar la cepa 2 como idónea para estudios posteriores. Esta cepa fue utilizada en la campaña de 1999 a niveles de producción en volúmenes de 200 l de mostos monovarietales en la Bodega del Centro Experimental de Zalla, repitiéndose los análisis realizados en la campaña anterior. Se aislaron 180 aislamientos de levaduras, de los que 158 pertenecían a la especie *S. bayanus*. Como en la campaña anterior, esta cepa se implantó muy bien sobre mostos procedentes de *Folle Blanche*, originando caldos de excelente calidad en este tipo de mostos. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la campaña anterior, no fue detectada en los mostos procedentes de *Hondarrabi Zuri*, ni en la fermentación tumultuosa ni en el final de la fermentación (Figura 3).

Durante esta campaña, se observaron fenómenos de parada de la fermentación en los mostos procedentes de la variedad de uva *Hondarrabi Zuri*. En muchas bodegas de esta denominación de origen se vivió una situación similar en los mostos de esta variedad de uva, tanto en fermentaciones espontáneas, como en fermentaciones inoculadas. Las causas de estas paradas de la fermentación son numerosas y difíciles de diagnosticar y han sido recogidas por Bisson [2]. Esta autora apunta diversas causas para las paradas de la fermentación, entre las que se incluyen la toxicidad del etanol, la limitación de nutrientes, la toxicidad de los ácidos grasos, la presencia de factores *killer*, etc. Parece también que la membrana plasmática de las levaduras, junto con sus sistemas de transporte, puede jugar un

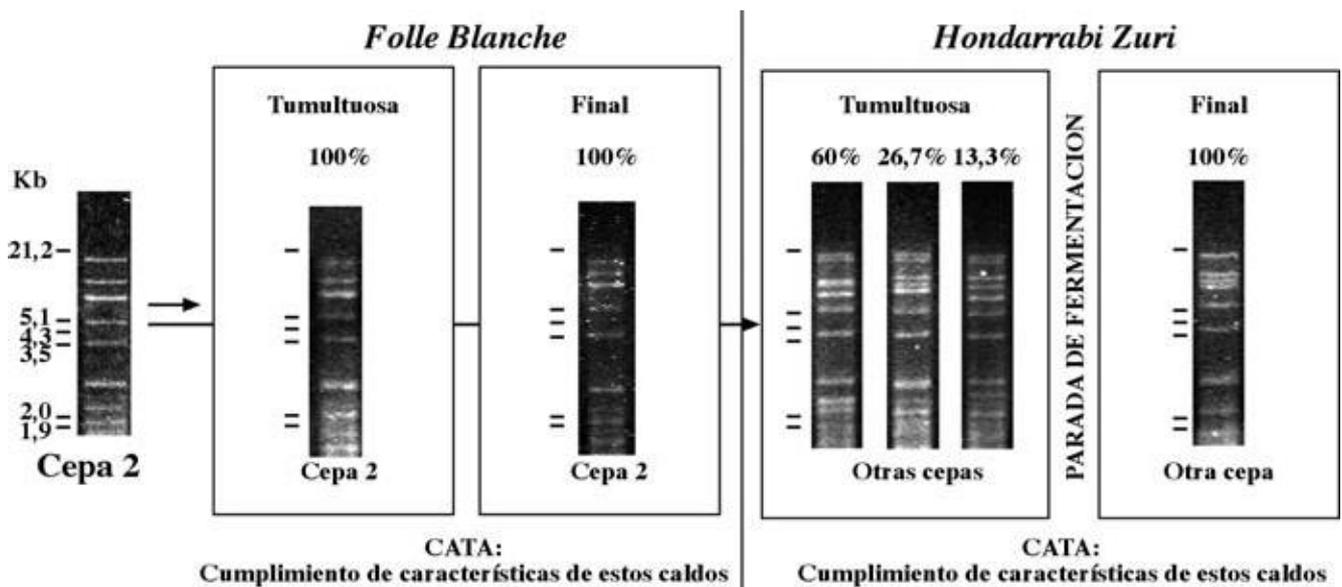


Figura 3. Perfiles genéticos obtenidos mediante la técnica de REAmT con la enzima *AluI* de los aislamientos de *Saccharomyces bayanus* en las fermentaciones de mostos monovarietales *Folle Blanche* y *Hondarrabi Zuri* inoculadas con la cepa 2, realizadas en la campaña de 1998/99. Resultados de cata y frecuencia de los perfiles en fermentación tumultuosa (densidad de 1.030-1.035 g/l) y final de la fermentación (densidad de 990 g/l). Marcador de peso molecular de ADN Fago Lambda digerido con *HindIII* y *EcoRI*.

papel importante en la resistencia al estrés originado por estos factores [40]. Por otro lado, Querol et al. [31] han indicado que las cepas de levaduras vínicas industriales presentan diferente resistencia al estrés, aunque pueden adaptarse parcialmente a diferentes condiciones de estrés ambiental encontradas durante las vinificaciones, sufriendo a veces cambios genómicos rápidos. Estos autores detectan una sucesión de cepas con diferentes resistencias al estrés adaptadas a la evolución ambiental durante el proceso de vinificación. En nuestro estudio, debido a la excelente climatología en esta campaña 1999/2000, los caldos de *Hondarrabi Zuri* alcanzaron mayores niveles alcohólicos (13°) que en la campaña anterior (11°), lo que también pudo observarse en caldos de *Folle Blanche* (11°).

Durante el proceso selectivo en mosto sintético con etanol al 10%, la levadura inoculada (número 2) toleró concentraciones de alcohol cercanas al 20%, por lo que la toxicidad del etanol, a las concentraciones alcanzadas en esta campaña 1999/2000, no parece explicar esas paradas de la fermentación. Tampoco la presencia de factores *killer* en los caldos parece ser la explicación, ya que la cepa 2 inoculada demostró ser productora y resistente al factor *killer* K2. Sin embargo, puede que el tratamiento de sulfitado y clarificación de los mostos naturales de *Hondarrabi Zuri* produjera un estrés excesivo para las cepas de *Saccharomyces* originando una escasez de nutrientes. Estas paradas de la fermentación fueron superadas en nuestras fermentaciones por la adición de un preparado comercial de cortezas de levadura (J. Laffort y Cia S.A.) a estos mostos. Las cortezas de levadura son restos de la pared celular que, además de proporcionar nutrientes, pueden adsorber ácidos grasos saturados de cadena corta, que son tóxicos para las levaduras, y les permiten reconstruir su composición de lípidos y esteroides de membrana. Mediante cultivo se confirmó que estas cortezas no aportaban levaduras viables que pudieran alterar la población de levaduras de la fermentación inoculada. Tras la adición de este nutriente, la evolución en estas fermentaciones fue más lenta de lo normal, debido seguramente a la alteración de la microbiota original durante la parada de la fermentación detectada. A pesar de esto, la cata de los caldos originados en las fermentaciones inoculadas con la cepa 2 en esta campaña demostró que eran de buena calidad, tanto los procedentes de *Folle Blanche* como los procedentes de *Hondarrabi Zuri*, donde no se había implantado esta cepa.

Finalmente, durante estas campañas los estudios no han mostrado que en la Bodega del Centro Experimental de Zalla exista alguna cepa estable en la vinería, que como apuntan algunos autores podría ser seleccionada por las condiciones de la bodega y presentarse en los vinos producidos en campañas diferentes [4,17,19,36]. Aunque en alguna campaña aparece algún patrón de REAmt en varios de los fermentadores, incluso en las fermentaciones espontáneas en la campaña 1998/99 (datos no mostrados), dicho patrón no fue detectado entre las cepas de la campaña posterior (1999/2000). Esto puede ser debido a que esta Bodega es de reciente creación y podría no tener una microbiota dominante asentada.

Podemos concluir que la técnica REAmt con la enzima *Alul* es válida, por su especificidad, rapidez y sencillez tecnológica, para el seguimiento de la implantación de levaduras inoculadas a nivel de producción en bodega. Sin embargo, este estudio ha demostrado que cepas con comportamientos fenotípicos diferentes presentan los mismos patrones de restricción con REAmt, pero pueden ser diferenciadas con algunas de las otras técnicas aplicadas en este estudio, como RAPD-PCR, que pese a su baja reproducibilidad puede ser una herramienta complementaria a REAmt. De las 15 levaduras autóctonas estudiadas, la cepa 2 podría ser utilizada con fines comerciales sobre mostos procedentes de *Folle Blanche* para la producción de Chacolí de Vizcaya. Este estudio demuestra que, a pesar de utilizar cepas autóctonas seleccionadas, su inoculación en un caldo no es garantía de que sea dominante y dirija la fermentación del mosto, ya que una misma cepa puede imponerse o no dependiendo del tipo de mosto y de la campaña de que se trate.

Los autores agradecen al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencia y Tecnología los análisis químicos realizados de los vinos obtenidos. Este estudio ha sido financiado por la Diputación Foral de Vizcaya, la Universidad del País Vasco (UPV 093.123-TA 131/97) y el Consejo Regulador de la DO Chacolí de Vizcaya/Bizkaiko Txakolina.

Bibliografía

1. Arif S, Barkham T, Power EG, Howell SA. Techniques for investigation of an apparent outbreak of infections with *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 1996; 34: 2205-2209.
2. Bisson LF. Stuck and sluggish fermentations. Am J Enol Vitic 1999; 50: 107-119.
3. Briones AI, Ubeda FJ, Grando S. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. Int J Food Microbiol 1996; 28: 369-377.
4. Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, Clementi F, Martini A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol 2004; 85: 159-164.
5. Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. Official Journal L 272, 03/10/1990; 33: 1-192.
6. Esteve-Zarzoso B, Gostínzar A, Bobet R, Uruburu F, Querol A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain). Food Microbiol 2000; 17: 553-562.
7. Fleet GH, Heard GM. Yeast-growth during fermentation. In: Fleet H (Ed.) Wine Microbiology and Biotechnology. Switzerland, Hardwood Academic Publishers, 1993: 27-57.
8. Gutiérrez AR. Selección de levaduras vinicas en la D.O.C. Rioja. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco, 1994.
9. Gutiérrez AR, Lopez R, Santamaria MP, Sevilla MJ. Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. Int J Food Microbiol 1997; 36: 241-245.
10. Gutiérrez AR, Lopez R, Santamaria MP, Sevilla MJ. Characterization of oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular fatty acid and mtDNA restriction polymorphism analysis. Sci Aliments 2000; 20: 321-330.
11. Gutiérrez-Viguera AR, Santamaria-Aquilué MP, López-Martín RM, Sevilla MJ. Selección de levaduras vinicas en la Denominación de origen calificada Rioja. Zúbia 1995; 7: 103-111.
12. Hidalgo P, Flores M. Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. Food Microbiol 1994; 11: 161-167.
13. Hidalgo P, Pueyo E, Pozo-Bayon MA, Martínez-Rodríguez AJ, Martín-Alvarez P, Polo MC. Sensory and analytical study of rosé sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. J Agric Food Chem 2004; 52: 6640-6645.
14. Izquierdo PM, Ubeda JF, Briones AI. Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepeñas in two consecutive vintages. Food Microbiol 1997; 14: 221-225.
15. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier Science BV, 1998.
16. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992; 30: 3249-3254.
17. Lopes CA, van Broock M, Querol A, Caballero AC. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J Appl Microbiol 2002; 93: 608-615.
18. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. Yeast killer systems. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 369-400.
19. Martini A. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Int Microbiol 2003; 6: 207-209.
20. Musmanno RA, Di Maggio T, Coratza G. Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. J Appl Microbiol 1999; 87: 932-938.
21. Park SK, Boulton RB, Noble AC. Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. Am J Enol Vitic 2000; 51: 91-97.
22. Perez F, Ramirez M, Regodon JA. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol 2001; 79: 393-399.
23. Perez-Ortín JE, Querol A, Puig S, Barrio E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. Genome Res 2002; 12: 1533-1539.
24. Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 2000; 16: 675-729.
25. Puig S, Querol A, Barrio E, Perez-Ortín JE. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 2057-2061.
26. Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA pattern. J Food Sci 1992; 57: 183-185.
27. Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D. Molecular Monitoring of wine fermentation conducted by dry yeast strains. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 2948-2952.
28. Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D. Utilización de técnicas moleculares para la caracterización de levaduras vinicas y el estudio del proceso de vinificación. Microbiología 1993; 9: 76-82.
29. Querol A, Barrio E, Ramon D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. System Appl Microbiol 1992; 15: 439-446.
30. Querol A, Barrio E, Ramon D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. Int J Food Microbiol 1994; 21: 315-323.
31. Querol A, Fernandez-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. Adaptive evolution of wine yeast. Int J Food Microbiol 2003; 86: 3-10.
32. Rachidi N, Barre P, Blondin B. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 1999; 261: 841-850.
33. Regodón JA, Pérez F, Valdés ME, De Miguel C, Ramírez M. A simple and effective approach for selection of wine yeast strains. Food Microbiol 1997; 14: 247-254.
34. Rementería A, Rodríguez JA, Cadaval A, Amenabar R, Muguruza JR, Hernando FL, Sevilla MJ. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). Int J Food Microbiol 2003; 86: 201-207.
35. Rementería A, Vivanco AB, Cadaval A, Ruesga MT, Brena S, Pontón J, Quindós G, Garaizar J. Typing fungal isolates: molecular methods and computerized analysis. In: Spencer JFT and Ragout de Spencer AL (Eds.) Methods in Molecular Biology. Totowa, Humana Press Inc, 2004: 117-125.
36. Sabate J, Cano J, Querol A, Guillamon JM. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. Lett Appl Microbiol 1998; 26: 452-455.
37. Santamaria P, Garijo P, Lopez R, Tenorio C, Gutiérrez AR. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. Int J Food Microbiol 2005; 103: 49-56.
38. Struelens, MJ, and the members of ESGEM. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 1996; 2: 2-11.
39. Tamayo C, Ubeda J, Briones AI. Relationship between H₂S-producing strains of wine yeast and different fermentation conditions. Can J Microbiol 1999; 45: 343-346.
40. Torija MJ, Beltrán G, Novo M, Poblet M, Guillamon JM, Mas A, Rozes N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int J Food Microbiol 2003; 85: 127-136.
41. Ubeda-Iranzo JF, Briones-Pérez AI, Izquierdo-Cañas PM. Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. Food Microbiol 1998; 15: 399-406.