

Del 2 al 5 de mayo de 2023

**CENTRO UNIVERSITARIO
SANTA ANA
ALMENDRALEJO**



Joaquín Sorolla Bastida. Comiendo uvas, 1898. Acualera sobre papel. Museo Sorolla, n° inv. 00427

**XLV JORNADAS
DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO
DE EXTREMADURA**

XLV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
V CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

Joaquín Sorolla Bastida. "Comiendo uvas". 1898. Acuarela sobre papel.
Museo Sorolla. n: inv. 00427. © Fundación Museo Sorolla

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: María Sabater

ISBN: 84-7930-113-9

D.L.: BA-000169-2024

Imprime: Impresal

Análisis biológico de mostos fermentados en lagares de la denominación de origen Montilla-Moriles

ALCALÁ-JIMÉNEZ, M.T.

GARCÍA-GARCÍA, J.C.

PEINADO, R.

MAURICIO, J.C.

MORENO, J.

GARCÍA-MARTINEZ, T.

Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología.
Universidad de Córdoba.

RESUMEN

Recientemente, los consumidores exigen el consumo de vinos de calidad superior. Cada vez más, se valora la autenticidad del vino como carácter diferenciador del resto de pagos de la zona vitivinícola. Los vinos de calidad se caracterizan por poseer un perfil biológico y organoléptico complejo y singular. Las investigaciones realizadas en los últimos años han puesto en manifiesto la contribución de las fermentaciones espontáneas, llevadas a cabo por los diferentes géneros de levaduras. Dentro de las levaduras enológicas, se distinguen dos grupos: *Saccharomyces*, principales responsables de la fermentación, y no-*Saccharomyces*, del desarrollo de características sensoriales y enriquecimiento del vino. El objetivo de este trabajo es

identificar levaduras no-*Saccharomyces* de la Denominación de Origen Protegida Montilla-Moriles a partir de mostos de diferentes lagares y, evaluar su potencial enológico mediante caracterización bioquímica y microbiológica. Tras los resultados obtenidos se podría concluir que se han seleccionado cepas con potencial con interés vínico para futuras aplicaciones en Enología.

Palabras Claves: Levaduras, no-*Saccharomyces*, fermentación, lagares

SUMMARY

Biological analysis of fermented musts in presses of the Montilla-Moriles designation of origin

Recently, consumers demand the consumption of superior quality wines. The authenticity of the wine is valued as a differentiating character from the rest of the winery in the wine-growing area. Quality wines are characterized by having a complex and unique biological and organoleptic profile. The investigations carried out in recent years have revealed the contribution of spontaneous fermentations by the different types of yeast. There are two group oenological yeasts: *Saccharomyces*, mainly responsible for fermentation, and non-*Saccharomyces*, for the development of sensory characteristics and enrichment of the wine. The objective of this work is to identify non-*Saccharomyces* yeasts of the Montilla-Moriles Protected Designation of Origin from musts from different wineries and to evaluate their oenological potential through biochemical and microbiological characterization. After the results obtained, it could be concluded that strains with potential wine interest have been selected for future applications in Oenology.

Keywords: Yeasts, non-*Saccharomyces*, fermentation, winery.

INTRODUCCIÓN

La transformación del mosto de uva en vino es el resultado de una compleja interacción entre factores abióticos como el clima, el suelo, la humedad, la temperatura y factores bióticos como la uva y microorganismos, entre los que destaca el papel de las levaduras. A nivel industrial, las levaduras poseen un gran potencial e interés biotecnológico para su aplicación en múltiples sectores como la agroalimentación, la salud y el

medioambiente. Estos microorganismos pueden diferenciarse y clasificarse en base a diferentes criterios como son la forma, el tamaño, el color o el mecanismo de reproducción. Las levaduras vínicas implicadas en la elaboración del vino pueden clasificarse en dos grupos, *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* o no convencionales, dentro de este segundo grupo se encuentran los géneros: *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Pichia*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*. (Carpena *et al.*, 2020) Las levaduras *no-Saccharomyces* son las responsables de iniciar la fermentación alcohólica, puesto que son el grupo que predomina en la uva, de modo que son las responsables de aportar aromas varietales o primarios. Se caracterizan por participar en las fermentaciones espontáneas y su capacidad para influir en el perfil aromático. Destacan por intervenir en co-fermentaciones controladas con cepas de *Saccharomyces* seleccionadas.

Para algunos enólogos las levaduras no convencionales pueden ser el origen del deterioro del vino porque no están controladas y tienen cinéticas de fermentaciones desconocidas. Sin embargo, se ha demostrado que las levaduras *no-Saccharomyces* aportan más variedad de metabolitos volátiles durante el proceso de fermentación que las *Saccharomyces*. Además, se ha comprobado que las poblaciones de las levaduras varían según la región y *le terroir*, por lo que producen unos aromas únicos en el vino dependiendo del territorio y de la uva. Cada tipo de levadura durante la fermentación alcohólica produce diferentes metabolitos como compuestos azufrados, ésteres, ácidos orgánicos, carbonilos, alcoholes, etc. que componen el aroma y el sabor, son los aromas secundarios.

Las nuevas técnicas de secuenciación de genes han revelado que algunas levaduras *no-Saccharomyces* codifican una cantidad superior de enzimas extracelulares, encargadas de catalizar la formación de compuestos aromáticos primarios y secundarios. Actualmente, ha aumentado un gran interés por las investigaciones sobre el aroma que producen las levaduras *no-Saccharomyces*, debido a que se ha demostrado que poseen actividad β -glucosidasa, que producen terpenos al romper los enlaces entre las moléculas aromáticas del resto de carbohidratos no volátiles.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de levaduras procedentes de mostos de la Denominación de Origen Protegida (DOP) Montilla-Moriles (Córdoba) cuya variedad de uva más abundante y utilizada es Pedro Ximénez, de piel fina, casi transparente y con un elevado contenido en azúcares.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Aislamiento e identificación de levaduras

Para el aislamiento de levaduras de los mostos de los diferentes lagares de la DOP Montilla-Moriles se ha realizado mediante la técnica de siembra por agotamiento, utilizando los siguientes medios de cultivo:

Medio WL (Wallerstein Laboratory, Oxoid), sirve para la identificación las diferentes cepas de levaduras según el color y morfología de la colonia (Boscaino *et al.*, 2019) debido a que posee verde-bromocresol, que es un indicador ácido base. Las colonias se tiñen de un color verdeazulado cuando las cepas acidifican el medio. Si no se produce acidificación las cepas crecen de color blanco, permitiendo así seleccionar diferentes cepas de levaduras. Este medio se preparó según las recomendaciones del fabricante. Luego, se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 120°C.

Para la identificación de las levaduras, las colonias se llevaron al servicio del SCAI de la UCO para ser analizadas mediante MALDI-Biotyper.

Medio de lisina (Oxoid) Es un medio de cultivo selectivo para detectar las levaduras no-*Saccharomyces* y se utiliza para comprobar si una determinada levadura pertenece a alguno de los géneros que se engloban dentro de este grupo o, por el contrario, al género *Saccharomyces*. (Boscaino *et al.*, 2019) y se preparó según las instrucciones del fabricante. Luego, se esterilizó en el autoclave durante 30 minutos a vapor fluente. Después de la primera siembra por la técnica de agotamiento, es necesario realizar una segunda siembra para que se considere una verdadera levadura no-*Saccharomyces*. Las siembras se incubaron entre cinco y siete días a una temperatura de 28°C.

Medio selectivo para *Saccharomyces*, se usó para verificar que las cepas son *Saccharomyces cerevisiae*. Es un medio compuesto por 0,3% (p/v) de extracto de levadura, 0,5% (p/v) de peptona y 1% (p/v) de sacarosa. Luego se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 120°C y se le añadió 7,6 % (v/v) de etanol (Sniegowski *et al.*, 2002). Los parámetros que se analizaron en esta prueba fueron turbidez (si hubo crecimiento o no), floculación, intensidad de olor y aroma. Las siembras se incubaron durante veintidós días a una temperatura de 28°C.

Medio para detectar actividad β -glucosidasa, esta actividad tiene un gran interés porque produce la liberación de terpenos, al hidrolizar el enlace

químico entre las moléculas aromáticas activas y el resto de los carbohidratos no volátiles (Bonciani *et al.*, 2018). El fundamento de este medio se basa en la hidrólisis de un compuesto natural, la arbutina, mediante la acción de la β -glucosidasa, que reacciona con el cloruro férrico provocando el pardeamiento del medio, pasando de amarillo a marrón-negro. El medio se preparó según las instrucciones del fabricante. Luego se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 120°C. Las siembras se incubaron durante quince días a 28°C.

Medio para detectar actividad celulasa este medio se usó para medir la actividad celulasa, se preparó YPD agar que contenía 0,4% de CMC (Sigma). Las cajas de Petri se incubaron durante cinco días a 30°C. Las colonias se tiñeron con lugol, de manera que los resultados positivos formaban un halo.

Fenotipo Killer, se prepararon tres soluciones: i) Solución 1M de Ácido cítrico monohidratado. ii) Solución 2M de Hidróxido de potasio. iii) Solución 2M de Fosfato potásico monobásico. A continuación, se preparó tampón cítrico hidróxido de potasio y se ajustó a un pH de 5,8. Con este tampón se ajustó la solución 2M de fosfato potásico monobásico hasta un pH de 4,5. Se esterilizaron 895 mL de medio YPD compuesto por 1% (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de glucosa y 2% (p/v) de agar. Luego, se añadieron 100 mL de la solución 2M de fosfato potásico monobásico estéril ajustada a 4,5 de pH, y 5 mL de una solución 0,6% de azul de metileno estéril, se agitó (Velázquez Molinero, 2016). Estas cepas han sido facilitadas por el Dr. M. Ramírez. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

Cepa sensible	Genotipo
EX33	MATa/ α HO/HO [k1-0; k2-0; k28-0; Klus-0]
EX 1180-2k	cyh ^R L-Abarr Mbarr-0 [cyh ^R Kbarr ⁰]

Tabla 1. Genotipo de las cepas sensibles

La cepa sensible se resuspendió en un tubo con 10 mL de medio YPD hasta conseguir una turbidez adecuada (Tabla1). A continuación, se tomaron 100 μ L de esa suspensión, se vertieron en el medio *killer* y con un asa de Digrafsky se extendió por la superficie de la caja de Petri. Se incubó a una temperatura de 21°C durante 1 hora y 15 minutos. Tras la incubación de la cepa sensible se enfrentaron con las levaduras aisladas de las muestras

de los vinos, se llevaron a incubar de nuevo durante 4 días a la misma temperatura para comprobar su fenotipo *killer*. Después de este periodo de tiempo, se procedió a realizar el mismo procedimiento a aquellas cepas que manifestaron fenotipo *killer* para enfrentarlas con otras cepas con este fenotipo (Tabla 2) y así poder conocer el tipo de toxinas que sintetizan. Este fenotipo se determinó por coloración de las colonias de azul oscuro. En el caso de la detección del tipo de toxina del fenotipo *killer* se realizó por la ausencia de color en las colonias.

Cepa killer	Genotipo
F166	MAT α leu1 kar1 L-A-HNB M1 [K1 ⁺]
EX 73	MAT α / α HO/HO L-A M2 [K2 ⁺]
F182	MAT α his2 ade1 leu2-2 ura3-52 ski2-2 L-A M28 [K28 ⁺]

Tabla 2. Genotipo de las cepas Killer

RESULTADOS

Se han obtenido un total de 155 aislados de levaduras procedentes de mostos de tres lagares de la DOP Montilla-Moriles. En Los Borbones, se han aislado 48 cepas, de las cuales se hizo una clasificación previa donde se obtuvieron 26 cepas no-*Saccharomyces*. De ellas, se consiguieron identificar 12, cuya especie a destacar fue *Torulaspota delbrueckii*. Algunas cepas de esta especie fueron celulósicas positivas y otras β -glucosidasa positivas, lo que sugiere resultados esperanzadores para su posterior uso.

Con respecto al segundo lagar, Cañada Navarro, se han conseguido 55 aislados, 25 de ellos fueron no-*Saccharomyces*. Se han identificado 10, de los cuales se encontraron de forma proporcional *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Pichia kudriavzevii*. Solo algunas presentaron actividad β -glucosidasa, pero ninguna presentó actividad celulosa.

Finalmente, fue en el tercer lagar, Saavedra, donde se encontraron más cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, se ha obtenido 30 aislados de un total de 52, se identificaron solo 13, la especie predominante fue *Torulaspota delbruecki*. Estas cepas fueron positivas para la actividad β -glucosidasa y negativas para la actividad celulosa. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de los diferentes lagares.

Lagares	Nº de aislados	Saccharomyces	No-Saccharomyces
Los Borbones	48	22	26
Cañada Navarro	55	30	25
Saavedra	52	22	30

Tabla 3. Número de aislados por lagar

Según muestran los resultados, se ha encontrado mayor biodiversidad en el lagar Cañada Navarro (Tabla 4), esto podría indicar que las características organolépticas del vino elaborado posean ciertos atributos más variados en este lagar. Tras la realización de la caracterización se pueden observar numerosas especies que presentan un alto potencial enzimático para su uso en enología favoreciendo su uso para la obtención de nuevas bebidas fermentadas, y algunas cepas tienen fenotipo *Killer*, sin embargo, estamos a la espera de sus identificaciones.

Lagares	Identificaciones de no Saccharomyces	Nº de levaduras
Los Borbones	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	12
Cañada Navarro	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	3
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	3
	<i>Candida glabrata</i>	2
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	3
Saavedra	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	11
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	2

Tabla 4. Variedad de levaduras no-Saccharomyces por lagar

Lagares	Medio Lisina	Actividad β -glucosidasa	Actividad Celulasa	Medio Selectivo <i>Saccharomyces</i>	Fenotipo killer
Los Borbones	26	12	14	22	4
Cañada Navarro	25	21	13	30	5
Saavedra	30	6	11	22	4

Tabla 5. Caracterizaciones de los aislados seleccionados

CONCLUSIONES

Hasta hace pocos años, *S. cerevisiae* se utilizaba en la producción por sus características deseables, y las levaduras no-*Saccharomyces* destacan como microorganismos que pueden influir positivamente en el perfil de aroma. Según los datos proporcionados, existe una gran diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* que pueden mejorar o disminuir la producción de algunos compuestos aromáticos como se han presentado en los tres lagares. Entre ellas, *Torulaspora delbrueckii* ha sido la especie no-*Saccharomyces* predominante, y el lagar hasta la fecha con mayor número de especies diferentes ha sido Cañada Navarro. El siguiente reto sería continuar con la caracterización de sus actividades enzimáticas y genes relacionados, por lo que es necesario más investigaciones al respecto.

Agradecimientos: JA-Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad: Convocatoria PAIDI 2020. PYC20 re 068 UCO

BIBLIOGRAFÍA

- Bonciani, T., Vero, L.D., Giannuzzi, E., Verspohl, A. & Giudici, P. (2018). "Qualitative and quantitative screening of the β -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* strains isolated from refrigerated must." **Letters in Applied Microbiology**, 67, 72-78.
- Boscaino, F.; Ionata, E.; La Cara, F.; Guerriero, S.; Marcolongo, L. & Sorrentino, A. (2019). "Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous mixed starter on Aglianico wine volatile compounds". *Journal of Food Science and Technology*, 56, 4982-4991.
- Carpene, M.; Fraga-Corral, M.; Otero, P.; Nogueira, R. A.; Garcia-Oliveira, P.; Prieto, M. A. & Simal-Gandara, J. (2020). "Secondary aroma: influence of wine microorganisms in their aroma profile". *Foods*, 10, 1-26.
- Sniegowski, P.D.; Dombrowski, P.G. & Fingerhahn, E. (2002). "*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics". *FEMS Yeast Research*, 1, 299-306.
- Velázquez Molinero, R. (2016). "Estudio de nuevas levaduras Killer "*Saccharomyces cerevisiae*" y "*Torulaspora delbrueckii*" para elaborar vinos tranquilos y espumosos". Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.