



ANÁLISIS SOBRE EL NÚMERO ÓPTIMO DE AISLADOS PARA DETERMINAR LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN

Pilar Santamaría¹, Patrocinio Garijo¹, Rosa López¹, Ana Rosa Gutiérrez²

¹ Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km. 88), 26071 Logroño (La Rioja). Tel. 941291833. e-mail: microbiologia.cida@larioja.org.

² Departamento de Agricultura y Alimentación (CCT), Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, (La Rioja).

Resumen:

El objetivo de este trabajo fue establecer el número mínimo de aislamientos y el momento más adecuado de realizarlos, para determinar la diversidad de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica. Se estudiaron tres fermentaciones, y en cada una se tomaron muestras de levaduras en tres momentos: inicio, fermentación tumultuosa y final. En cada uno de ellos se caracterizaron a nivel clonal un número variable de levaduras (5, 10, 15, 20 y 25). Todas las levaduras aisladas al inicio del encubado se caracterizaron como No-*Saccharomyces*. En general, se observa que el número de cepas distintas aumenta al final del proceso y que un porcentaje bajo de clones coinciden en fermentación tumultuosa y final, por lo que un muestreo en ambos puntos da más información sobre la diversidad del depósito. El estudio de 10 aislados en ambos momentos proporciona valores de diversidad similar a la obtenida al analizar 25 cepas en cada punto, por lo que el muestreo de 10 colonias aisladas en fermentación tumultuosa y al final del proceso, parece ser un número adecuado para llevar a cabo estudios de biodiversidad de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en depósitos de vinificación.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, biodiversidad, fermentación alcohólica, aislamientos, inoculación.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica espontánea del mosto de uva es un proceso complejo llevado a cabo por la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levadura. Las levaduras indígenas con baja capacidad fermentativa crecen durante las primeras etapas del encubado, pero cuando la concentración de etanol aumenta en el medio, las levaduras más tolerantes al mismo, pertenecientes principalmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, completan la fermentación. También se ha puesto de manifiesto que en el curso de una fermentación espontánea pueden participar diferentes cepas o clones de *Saccharomyces cerevisiae*.

En los últimos años se han realizado varios trabajos sobre la ecología de levaduras vínicas, con el fin de establecer si las fermentaciones espontáneas son conducidas por un alto o bajo número de cepas de *S. cerevisiae* y si hay estabilidad de estas cepas en las bodegas de un año a otro, es decir si existen "cepas típicas" de un ecosistema (bodega o región) [4]. También se ha evidenciado que la diversidad está condicionada por la localización geográfica [2], por el año de estudio [6] y por la tecnología de vinificación empleada [1,5]. No obstante, se han obtenido resultados contradictorios en las fuentes consultadas: en unos casos se ha encontrado una cepa claramente dominante y en otros una sucesión de cepas presentes en un porcentaje muy pequeño [3]. Estos resultados contradictorios pueden deberse a aspectos como: zona geográfica, edad de la bodega, técnica de elaboración, práctica de inoculación, materiales empleados, e incluso la propia metodología de muestreo seguida en los estudios.

Los trabajos sobre ecología de fermentaciones industriales aportan datos más precisos y fiables cuanto mayor es el número de días muestreados y mayor el número de ais-

lamientos por muestra. Sin embargo, el número de aislados a estudiar no puede ser muy elevado si se quieren obtener datos rápidos y no excesivamente costosos. La pauta utilizada sistemáticamente por nuestro equipo en los estudios sobre ecología de fermentaciones es tomar muestras en los depósitos tres veces a lo largo del proceso fermentativo (inicio, mitad y final), y aislar 10 colonias de levadura en cada momento. El objetivo de este estudio fue valorar esta metodología de trabajo y establecer el número mínimo de tomas de muestra y de aislamientos a realizar en cada una, con el fin de determinar la diversidad de *Saccharomyces cerevisiae* y las cepas de esta especie responsables de la fermentación alcohólica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron las levaduras en tres fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en tres bodegas diferentes de la D.O.Ca. Rioja durante las vendimias del año 2005. En cada depósito, se tomaron muestras del mosto en fermentación en tres momentos del proceso: encubado, fermentación tumultuosa y final. Las muestras fueron trasladadas en condiciones estériles al laboratorio, donde fueron sembradas en placas petri con medio Cloranfenicol Glucosa Agar e incubadas a 25°C durante 48-72 horas. De cada una de las placas se tomaron al azar 25 colonias de levadura que se sembraron en tubos con Agar Malta y se almacenaron hasta su posterior examen. Todas las colonias aisladas fueron sometidas al análisis de restricción de su ADN mitocondrial, lo que nos permitió clasificar las levaduras por su género (*Saccharomyces* o no-*Saccharomyces*), así como comparar las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Los datos se estudiaron agrupando aleatoriamente las 25 colonias de levadu-

ras aisladas en bloques de 5, 10, 15, 20 y 25. Esta metodología de trabajo permitió evaluar la diversidad clonal de las levaduras y la presencia de cepas comunes en las distintas etapas de la vinificación, así como comparar los resultados obtenidos en función del número de aislados estudiados. La diversidad (%) se calcula como: cepas distintas / cepas totales x 100.

3. RESULTADOS

Todos los aislamientos realizados en el momento del encubado fueron identificados como levaduras *No-Saccharomyces*, y por lo que este muestreo no se consideró en este estudio.

Los resultados obtenidos al estudiar todos los aislados (25 colonias en cada etapa) mostraron diferencias en la diversidad clonal en las tres vinificaciones estudiadas (Tabla 1): en la Bodega 1 hubo una diversidad alta (64% en fermentación tumultuosa y 80% al final de la misma), en la Bodega 3 la diversidad fue muy baja (28% en ambos momentos), mientras que en la Bodega 2 se dió una situación intermedia con una diversidad del 32 y 68% respectivamente. Estos datos explican que en la Bodega 1 no hubiera cepas dominantes (datos no mostrados); en la Bodega 2, algún clon se encontró en cantidades algo superiores al resto pero sin ser dominantes (datos no mostrados), mientras que en la Bodega 3 dos clones (I y IV) dominaron claramente sobre el resto (Tabla 2).

Tabla 1. Variación de la diversidad clonal (%) en las distintas vinificaciones y fases de fermentación en función del número de aislados estudiados.

| Etapas de vinificación | Nº DE AISLADOS ESTUDIADOS | | | | |
|------------------------|---------------------------|-----|----|----|----|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| BODEGA 1 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 100 | 70 | 67 | 60 | 64 |
| FA Final | 100 | 100 | 87 | 90 | 88 |
| BODEGA 2 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 60 | 50 | 47 | 35 | 32 |
| FA Final | 60 | 70 | 80 | 80 | 68 |
| BODEGA 3 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 60 | 40 | 40 | 30 | 28 |
| FA Final | 70 | 30 | 27 | 30 | 28 |

Tabla 2. Presencia (%) de los distintos clones de *Saccharomyces cerevisiae*, en función del número de aislados estudiados en la bodega 3. Datos medios de fermentación tumultuosa y final.

| CLONES | Nº DE AISLADOS ESTUDIADOS | | | | |
|--------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 5+5 | 10+10 | 15+15 | 20+20 | 25+25 |
| I | 50 | 70 | 56.7 | 52.5 | 54 |
| II | 10 | | 3.3 | 5 | 4 |
| III | 10 | | 3.3 | | 2 |
| IV | 30 | 15 | 26.7 | 22.5 | 24 |
| V | | 5 | | 2.5 | 2 |
| VI | | 5 | | 2.5 | 2 |
| VII | | 5 | | 2.5 | 2 |
| VIII | | | 3.3 | 2.5 | 2 |
| IX | | | | 2.5 | 2 |
| X | | | 3.3 | 5 | 4 |
| XI | | | 3.3 | 2.5 | 2 |

El número de cepas distintas identificadas en los depósitos aumentó al aumentar el número de aislados estudiados (Tabla 3), especialmente al final de la fermentación en las Bodegas 1 y 2. Un porcentaje bajo de clones coincidieron

en fermentación tumultuosa y final (4 de 32 en la Bodega 1; 5 de 20 en la Bodega 2, y 3 de 11 en la Bodega 3). Por estas causas, un muestreo en ambos puntos proporciona más información sobre la diversidad del depósito, y no sería aconsejable reducir a uno los momentos de muestreo durante la fermentación.

Por otra parte, como se observa en la Tabla 1, un muestreo de 10-15 aislados en ambos momentos da valores de diversidad similar a la obtenida al muestrear 25 cepas en cada punto. Por ello, sin tener conocimiento previo de las características de una bodega o depósito concreto, un análisis de 10-15 aislados daría resultados bastante aproximados a los obtenidos con 25. El estudio de cinco colonias da valores de diversidad mucho mayores que con un número mayor de aislados, por lo que éste sería un número rechazable a la hora de llevar a cabo estudios de biodiversidad. No obstante, como se muestra en la tabla 2, cuando la biodiversidad es más baja (Bodega 3), o como sería el caso de los controles de implantación de cepas comerciales inoculadas, con 5 aislados se podría detectar ya la cepa o cepas dominantes, y en porcentajes similares a los obtenidos con 25 aislados.

Tabla 3. Número de clones diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* identificados en cada fase de fermentación en función del número de aislados estudiados

| Etapas de vinificación | Nº DE AISLADOS ESTUDIADOS | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| BODEGA 1 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 5 | 7 | 10 | 12 | 16 |
| FA Final | 5 | 10 | 13 | 18 | 20 |
| Cepas comunes ambas etapas/Totales | 2/6 | 2/15 | 2/21 | 4/26 | 4/32 |
| BODEGA 2 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 3 | 5 | 7 | 7 | 8 |
| FA Final | 3 | 7 | 12 | 15 | 17 |
| Cepas comunes ambas etapas/Totales | 1/5 | 2/10 | 3/15 | 5/17 | 5/20 |
| BODEGA 3 | | | | | |
| FA Tumultuosa | 5 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| FA Final | 3 | 3 | 4 | 6 | 7 |
| Cepas comunes ambas etapas/Totales | 2/4 | 2/5 | 2/6 | 2/10 | 3/11 |

4. CONCLUSIONES

La metodología seguida hasta el momento para estudios de diversidad (muestreo en 3 momentos de la fermentación alcohólica con 10 colonias estudiadas en cada punto), da resultados similares a los obtenidos al aumentar el número de colonias estudiadas a 25. No obstante, este número podría aumentarse a 15 aislados para ajustar más los resultados, salvo en el caso de controles de implantación de cepas inoculadas, donde podría reducirse a 5 colonias.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. EPIFANIO, S.; SANTAMARÍA, P.; LÓPEZ, R.; GUTIÉRREZ, A.R. 1999. **The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation.** *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (2) 219-224.
2. GUILLAMÓN, J.M. 1996. **Estudio ecológico de la fermentación alcohólica mediante la utilización de mar-**



- cadore moleculares.** Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
3. QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. 1994. **Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentation.** *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.
 4. SABATE, J.; CANO, J.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J.M. 1988. **Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years.** *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-255.
 5. TORIJA, M.J.; ROZÉS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. 2003. **Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47-53.
 6. VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.P.H.; KHAN, W.; PRETORIUS, I.S. 2000. **Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South africa.** *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 1, 10-16.