AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS NO-*SACCHAROMYCES* DURANTE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE UVA VERDEJO PROCEDENTE DE VIÑEDOS ECOLÓGICOS

Josefina Vila-Crespo[1], Lorena López-Enríquez[1], Violeta Ruipérez[1], José M. Rodríguez-Nogales[2], Encarnación Fernández-Fernández[2], Marta Baquerizo Mesonero-Romanos[3]

[1] Área de Microbiología. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Av. Madrid 50, 34004, Palencia, España

[2] Área de Tecnología de los Alimentos. Universidad de Valladolid. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Av. Madrid 50, 34004, Palencia, España

[3] Bodega Belondrade S.L., La Seca, Valladolid, España

Email: josefinamaria.vila@uva.es

RESUMEN

El aislamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación espontánea se llevó a cabo en uva de la variedad Verdejo procedente de viñedos ecológicos de la Denominación de Origen Rueda, tomando muestras en distintas etapas del proceso de fermentación. Durante dos vendimias se obtuvieron aislados procedentes de vinificaciones de tres viñedos, obteniendo un total de 484 aislados, de los cuales, el 11,4 % se identificaron mediante técnicas moleculares como levaduras no-*Saccharomyces*. Varias de las cepas estudiadas destacaron por su potencial biotecnológico para su aplicación en la elaboración de Verdejo, mostrando la presencia de actividad enzimática relevante para la liberación de aromas varietales, así como otras actividades enzimáticas implicadas en la mejora tecnológica del proceso de vinificación.

INTRODUCCIÓN

La contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* a la complejidad aromática de los vinos y el impacto sobre sus características sensoriales es un factor a tener en cuenta en la elaboración de vinos de calidad, singulares y representativos de la zona de producción. Estas levaduras influyen en los aromas primarios y secundarios del vino a través de la producción de enzimas y metabolitos.

El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad de esta población presente durante la fermentación espontánea de uva Verdejo, y caracterizar su potencial enzimático para modificar las características aromáticas del producto final.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las levaduras objeto de este estudio fueron aisladas a partir de 3 viñedos diferentes (V1, V2 y V3), durante 2 vendimias (A1 y A2) y en 5 etapas del proceso fermentativo (MURE: Mosto de uva recién estrujada; MD: Mosto desfangado; IF: Inicio de fermentación; FT: Fermentación tumultuosa; FF: Final de fermentación).

La identificación molecular se realizó mediante PCR-RFLP de la región ITS-5,8S del ADN ribosomal (ADNr). La identificación a nivel de especie se confirmó mediante secuenciación.

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó en medios de cultivo y la actividad fue determinada como presencia o ausencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 55 aislados de levaduras no-*Saccharomyces*, divididos en 10 grupos genéticos distintos, los cuales fueron identificados como *Hanseniaspora meyeri* (Hm), *Hanseniaspora osmophila* (Ho), *Papiliotrema laurentii* (Pl), *Papiliotrema terrestris* (Pt), *Pichia guilliermondii* (Pg), *Torulaspora delbrueckii* (Td), *Rhodotorula mucilaginosa* (Rm), *Naganishia globosa* (Ng), *Pichia kudriavzevii* (Pk) y *Wickerhamomyces anomalus* (Wa) (Figura 1).

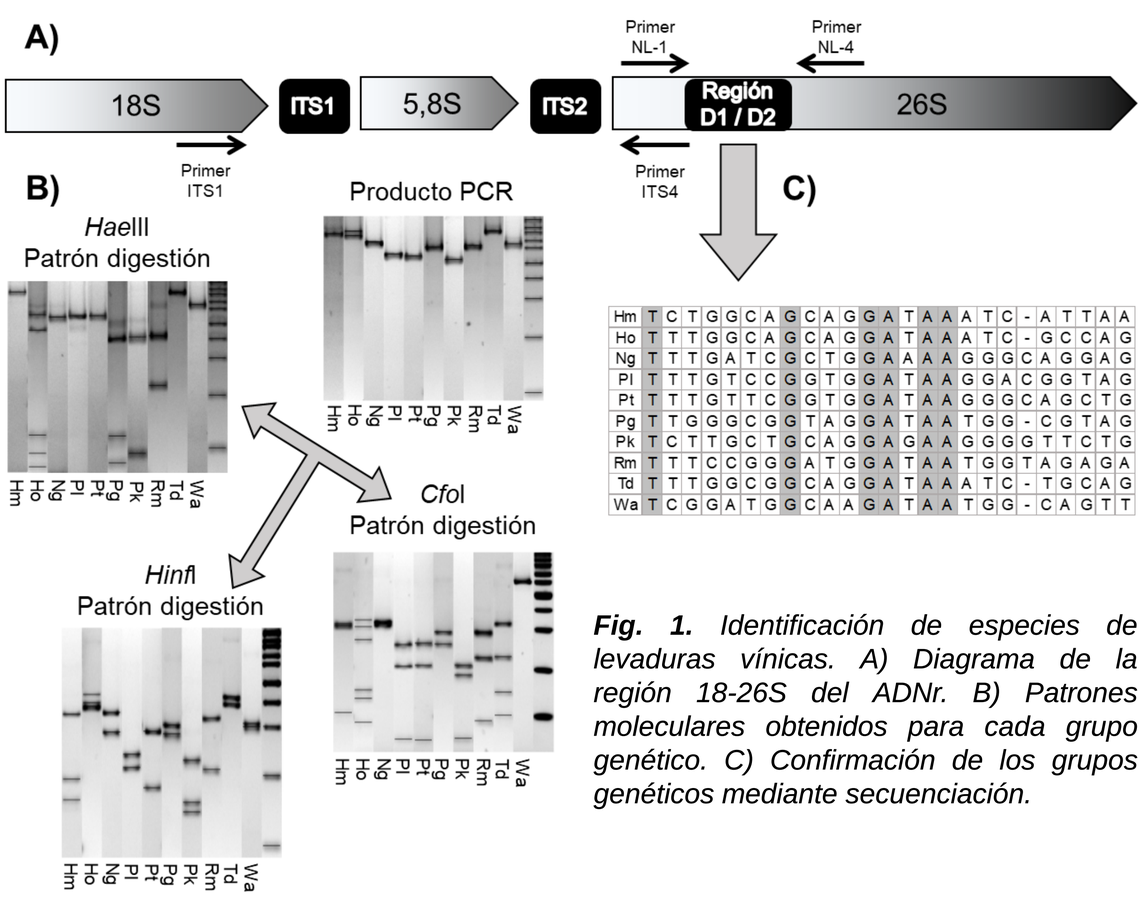

Fig. 1. Identificación de especies de levaduras vínicas. A) Diagrama de la región 18-26S del ADNr. B) Patrones moleculares obtenidos para cada grupo genético. C) Confirmación de los grupos genéticos mediante secuenciación.

La sucesión de poblaciones de levaduras a lo largo de las etapas de fermentación mostró diferencias significativas durante el proceso, destacando la etapa MURE por su mayor valor de diversidad y por su mayor diferencia con el resto de las etapas (Figura 2).

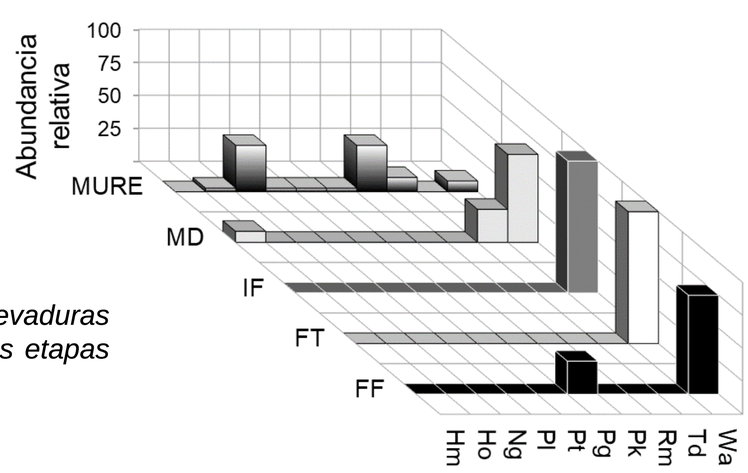

Fig. 2. Distribución de levaduras no-Saccharomyces en las etapas de fermentación.

La distribución de los diferentes aislados definió ecosistemas singulares asociados a un viñedo y una añada concretas y la relación de los mismos, en base a una matriz de distancias Bray-Curtis (Figura 3).

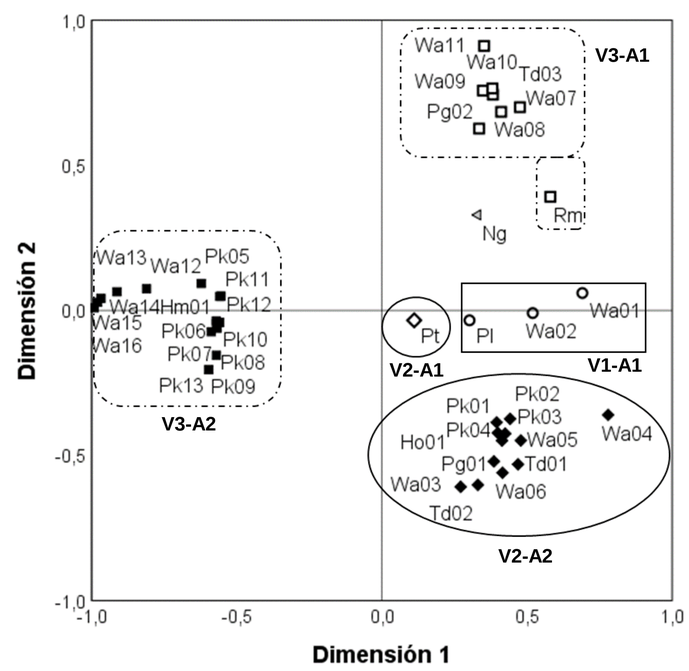

Fig. 3. Distribución de los aislados teniendo en cuenta los viñedos y las añadas mediante el método exploratorio NMDS (escalado multidimensional no métrico). S-Estrés: 0,00012.

Las actividades enzimáticas se determinaron en los aislados con capacidad fermentativa. El 50 % de los aislados mostraron actividad β-glucosidasa y proteasa. Solamente el 11 % de los aislados mostró presencia de actividad β-glucanasa, mientras que la actividad β-liasa se encontró en el 100 % de los aislados estudiados. Destacan los aislados de *W. anomalus* (Wa) 03, 04 y 05 por mostrar presencia de todas las actividades enzimáticas analizadas (Figura 4).

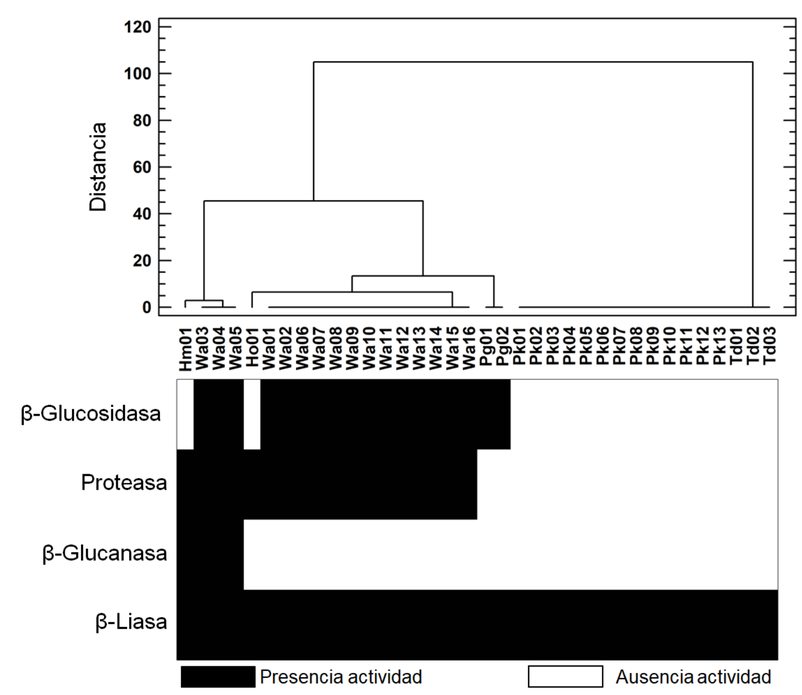

Fig. 4. Actividades enzimáticas. El mapa de calor muestra las actividades en cada aislado analizado. El dendrograma representa la relación de cada aislado en función de su comportamiento enzimático según un análisis de conglomerados basado en el método de Ward y en una matriz de distancia Euclídea al cuadrado.

CONCLUSIONES

- La mayor diversidad en la población de levaduras no-*Saccharomyces* se encontró en mosto de uva recién estrujada.
- La identificación y determinación de la sucesión de poblaciones microbianas definió ecosistemas singulares asociados a un viñedo y una añada concretas.
- El análisis enzimático demuestra el potencial biotecnológico de la especie *W. anomalus*, destacando su presencia en todas las etapas del proceso fermentativo.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la bodega BELONDRADE S.L. su colaboración en este estudio.