
Jornadas Científicas 99
Grupos de Investigación Enológica

Zaragoza, 17-19 de mayo de 1999

**Aspectos bioquímicos
y microbiológicos
del vino**

Utilización de compuestos nitrogenados en mostos garnacha inoculados con cepas *killer* de *S. cerevisiae*

D. Torrea Goñi y C. Ancín Azpilicueta

Las toxinas *killer* disminuyen el gradiente electroquímico de la membrana plasmática de las levaduras sensibles, interrumpiendo el transporte acoplado de protones y aminoácidos.¹ El objetivo de este trabajo es estudiar la utilización de aminoácidos en mostos garnacha, inoculados con dos cepas *killer* (K2) de *S. cerevisiae* (D47 y K1M). La implantación de dichas cepas se verificó por PCR, siguiendo el método de Lavallée *et al.* (1994).² Los resultados se comparan con un mosto fermentado con sus levaduras autóctonas (muestra control). El análisis de los aminoácidos libres se realizó por HPLC, siguiendo el método Pico-Tag.³

En el primer 25 % de azúcares fermentados, los aminoácidos se consumen en gran proporción en las tres muestras (tabla 1). Del 25 % al 50 % de azúcares fermentados, los

aminoácidos se siguen consumiendo, aunque algunos se excretan en las muestras sembradas con las levaduras *killer* (tabla 1). Del 50 al 75 % de azúcares fermentados (tabla 2), hay una tendencia a la excreción de aminoácidos, sobre todo en la muestra D47. En la muestra K1M, se consumen la mayoría de estos compuestos; esta cepa, en un medio sintético, presentó una demanda de nitrógeno muy superior a la de la cepa D47 (datos no publicados), lo que podría explicar la diferencia entre ambas muestras. En la última fase fermentativa (75-100 % de azúcares fermentados) (tabla 2) se produce excreción de aminoácidos al medio como consecuencia de la acción tóxica del etanol.⁴ Dicha excreción fue muy superior en las muestras sembradas con las levaduras D47 y K1M; en estas muestras, al efecto tóxico del etanol sobre la

Tabla 1 Concentración de aminoácidos (Aa) en el mosto y su utilización en la primera mitad de fermentación por distintas cepas

Aa (mg/L)	Mosto inicial	0-25 % de azúcares consumidos			25-50 % de azúcares consumidos		
		Control	D47	K1M	Control	D47	K1M
His	33 ± 2	26 ± 2	26 ± 2	24 ± 2	—	-3 ± 1	4,8 ± 0,4
Arg	384 ± 6	376 ± 6	349 ± 6	381 ± 6	5 ± 3	25 ± 1	—
Thr	15 ± 3	13 ± 3	13 ± 3	14 ± 3	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	-0,3 ± 0,2
Ala	56 ± 3	53 ± 3	52 ± 3	48 ± 3	0,9 ± 0,8	-4 ± 2	5,6 ± 0,3
Asp	17 ± 3	14 ± 3	13 ± 3	15 ± 3	2 ± 1	1,8 ± 0,1	—
Glu	64 ± 2	57 ± 3	54 ± 2	48 ± 2	4 ± 3	2,7 ± 0,4	8,0 ± 0,2

—: excreción; —: no presenta consumo ni excreción. Los resultados se presentan con su desviación estándar

Tabla 2 Utilización de aminoácidos (Aa) en la segunda mitad de fermentación por distintas cepas

Aa (mg/L)	50-75 % de azúcares consumidos			75-100 % de azúcares consumidos		
	Control	D47	K1M	Control	D47	K1M
His	3 ± 2	7 ± 1	3,5 ± 0,4	2,1 ± 0,6	-3,2 ± 0,4	-3,0 ± 0,3
Arg	—	—	1,6 ± 0,2	—	-9,6 ± 0,6	-11 ± 1
Thr	-0,7 ± 0,2	-1,3 ± 0,1	-1,0 ± 0,4	-0,7 ± 0,3	-2,1 ± 0,4	-3,0 ± 0,6
Ala	-2 ± 1	—	—	-5 ± 1	-11 ± 1	-10 ± 1
Asp	—	-1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,3	-2,5 ± 0,1	-3,7 ± 0,4
Glu	-9 ± 1	-18 ± 1	1,4 ± 0,2	5,4 ± 0,9	3,2 ± 0,6	-8,4 ± 0,3

-: excreción; —: no presenta consumo ni excreción. Los resultados se presentan con su desviación estándar

membrana de las células habría que sumar la liberación de aminoácidos de levaduras sensibles dañadas por la toxina *killer*. Por todo ello, se puede concluir que los vinos obtenidos a partir de muestras donde las levaduras *killer* se sembraron y predominaron, presentaron menor estabilidad microbiológica. •

Bibliografía

1. De la Peña P., Barros F., Gascón S., Lazo P.S., Ramos S.: *J Biol Chem* 1981; 256: 10420-10425.
2. Lavallée F., Salvas Y., Lamy S., Thomas D.Y., Degré R., Dulau L.: *Am J Enol Vitic* 1994; 45: 86-91.
3. Cohen S.A., Meys M., Tarvin T.L.: *The Pico-Tag Method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis*, Millipore Corp, Bedford, 1989.
4. Ingram L.O., Dombek K.M., Osman Y.A.: *Trends Biotechnol* 1986; 4: 40-44.

Selección de cepas de levadura para realizar la segunda fermentación en la elaboración de vinos de cava

A. Martínez-Rodríguez y A.V. Carrascosa

En la elaboración del cava tienen lugar dos fermentaciones alcohólicas sucesivas y el envejecimiento del vino en la botella con las levaduras. Las condiciones en las que se desarrolla la segunda fermentación determinan las características que deben reunir las levaduras que hay que utilizar para obtener un producto de óptima calidad.

En este trabajo se sugiere una metodología que consideramos adecuada para seleccionar cepas de levadura que lleven a cabo con éxito la segunda fermentación y el envejecimiento en botellas, utilizando criterios enológicos específicos que deben cumplir las levaduras que participan en la segunda fermentación e incorporando al sistema de selección la capacidad de autólisis de las levaduras en un sistema modelo.

El primer criterio de selección es el estudio del poder fermentativo en un medio sintético que presenta una composición similar al vino base de la segunda fermentación (25 g/L de sacarosa en un medio de 10° alcohólicos, a pH 3 e incubado a 16 °C).

El grupo de cepas que cumple este primer requisito se somete a las siguientes pruebas de selección: producción de acidez volátil, resistencia al SO₂, formación de SH₂, capacidad floculante y capacidad autolítica medida

por la liberación al medio de aminoácidos y proteínas después de 24 horas de incubación en un sistema modelo. El análisis conjunto de los resultados obtenidos permite hacer una segunda selección de las cepas que mejor se adaptan a los criterios de esta vinificación.

Para confirmar la identidad de las cepas se lleva a cabo un estudio de los patrones de digestión del DNA mitocondrial frente a un grupo de enzimas de restricción diferentes (*Nucleic Acids Res* 1990;18:1657).

Esta sistemática la hemos seguido en el laboratorio para seleccionar una cepa adecuada para realizar la segunda fermentación de vinos de cava. Se partió de 35 cepas de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales que *a priori* podía suponerse que eran adecuadas para este fin. En la primera selección quedaron 13 cepas. Éstas se sometieron al segundo grupo de criterios de selección superándolo cuatro cepas. El patrón del DNA mitocondrial nos indicó que dos de ellas eran la misma cepa por lo que quedaron tres, con las que se han realizado vinificaciones en bodega para llevar a cabo un estudio más profundo de los cambios que se producen en la segunda fermentación y de la liberación de compuestos que tiene lugar durante la autólisis de las levaduras. •

Aplicación de la SPE a la extracción de OTA

D. Jorner, O. Busto y J. Guasch

La presencia de ocratoxina A en los vinos ha suscitado un interés creciente en los últimos años debido a sus propiedades toxicológicas y carcinógenas. Hasta este momento, solamente se ha detectado en concentraciones inferiores a 5 ug/L, límite máximo admitido para los cereales y sus derivados, de acuerdo con el *Codex Alimentarius*.

La técnica analítica más empleada para su determinación es la RP-HPLC, aunque el método oficial propuesto por la AOAC está basado en la cromatografía en capa fina. En estudios recientes, se ha propuesto un método en el cual la OTA se extrae del vino mediante tolueno y, tras un tratamiento de *clean up* relativamente complejo, se cuantifica por HPLC. El método ha sido reconocido por la OIV como un método satisfactorio bajo un punto de vista analítico, aunque implica la necesidad de seguir unas condiciones estrictamente controladas.

En el estudio realizado se utiliza un método de HPLC precedido de una SPE que ha permitido el *clean up* y la concentración de

las muestras, pudiendo determinarse concentraciones de OTA en vino a niveles de concentración inferiores a 5 ug/L. La detección se ha realizado fluorimétricamente ($\lambda_{exc}=330$ nm, $\lambda_{em}=470$ nm).

Las muestras de vinos blancos, rosados y tintos han sido extraídas directamente con un cartucho de octadecilsilano y concentradas, en una segunda etapa, bajo corriente de nitrógeno. En estas condiciones, la OTA, que se añade a los vinos a una dosis de concentración de 3 ug/L, se concentra un mínimo de 100 veces.

Se ha optimizado el método de trabajo probando diferentes matrices y volúmenes de muestra. Se ha comprobado la linealidad de la respuesta en el intervalo de concentración habitual en los vinos y las recuperaciones han sido superiores al 80 % para todos los vinos analizados. El límite de detección ha sido de 50 ug/L (S/N = 3).

El método optimizado es suficientemente rápido y su reproducibilidad aceptable al nivel de concentración estudiado. •

Cambios en la composición de los vinos cencibel debidos a la fermentación maloláctica

M.C. Díaz-Maroto Hidalgo, E. García Romero, I. Hermosín Gutiérrez
y M.D. Cabezudo Ibáñez

La fermentación maloláctica es un proceso bacteriano deseable y determinante en la definición de las características sensoriales de los vinos, sobre todo de los tintos. Por ello es importante su conocimiento y control.

Han sido estudiados 13 vinos tintos de la variedad cencibel, obtenidos en la planta piloto de la Universidad de Castilla-La Mancha (Ciudad Real). Terminada la fermentación alcohólica, a seis de ellos se les adicionó bacterias lácticas comerciales liofilizadas (Viniflora OENOS, *Leuconostoc oenos* DSM 7008), dejando los restantes como muestras de control. Además de las determinaciones convencionales, se han analizado los compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios por cromatografía de gases (CG), y los ácidos orgánicos fijos y los antocianos por HPLC.

Las concentraciones del ácido láctico, el ácido málico y el lactato de etilo han sufrido

los cambios esperados. Además, los ácidos cítrico y fumárico han sido metabolizados por las bacterias lácticas utilizadas.

La concentración de acetaldehído disminuye de forma drástica, pues interviene en la ruta metabólica de las bacterias lácticas heterofermentativas, como es el caso de *Leuconostoc oenos*. También disminuye la concentración del piruvato de etilo, debido probablemente a las esterasas extracelulares que producen *Leuconostoc oenos*; además, el piruvato formado puede entrar en distintas rutas metabólicas citadas anteriormente, y favorecer de esta forma la reacción.

Por último, se observa un aumento de los antocianos presentes en el vino, sobre todo de los derivados no acilados, cifrándose desde un 40 % para el 3-monoglucósido de malvidol, hasta un 128 % para el 3-monoglucósido de peonidol. •

Diferencias en la composición de los vinos fermentados con cepas de *Saccharomyces cerevisiae killer* y *killer* curadas

D. Broceño Caminero, M.S. Pérez Coello, E. García Romero
y M.D. Cabezudo Ibáñez

Se fermentaron alícuotas de un mismo mosto airén a 19 °C y de un mosto cencibel a 25 °C (obtenidos ambos a partir de las uvas a escala de planta piloto) con seis cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de distinta procedencia: con factor *killer*, tratadas con cicloheximida (*killer* curadas), *killer* sensibles y *killer* resistentes. La fermentación se siguió mediante monitorización del dióxido de carbono desprendido.

A los vinos obtenidos se les realizaron los análisis químicos convencionales, los compuestos volátiles (mayoritarios y minoritarios) por cromatografía de gases (CG), y los ácidos orgánicos por HPLC.

Las seis levaduras presentan curvas de fermentación semejantes aunque con pequeñas diferencias de velocidad y de consumo de compuestos nitrogenados. No obstante, todas ellas agotan en su totalidad la glucosa y la fructosa.

Se encontraron diferencias en la producción de acetatos y ésteres de ácidos grasos por los distintos tipos de cepas así como en la producción de ácidos orgánicos.

La maceración de los hollejos en la vinificación del mosto cencibel produce vinos con mayor concentración de nitrógeno total, 1-hexanol, 2-feniletanol, glicerina, metanol y acetato de etilo que los vinos airén. •

Ácidos grasos libres y esterificados en mostos y vinos base para la elaboración de cava

S. Francioli, M. Gallart, E. López-Tamames y S. Buxaderas

Los ácidos grasos se encuentran en mostos y vinos tanto en forma libre como esterificada, mayoritariamente como ésteres de etilo. Ambas formas se han determinado utilizando un único método de cromatografía de gases (CG) y, en consecuencia, en el mismo cromatograma. Además se han solventado los problemas habituales de este tipo de determinaciones (volatilidad variable, concentraciones dispares, interferencias de otros componentes, etc.).

El método se ha aplicado para el estudio de la evolución de ácidos grasos y sus ésteres durante la vinificación de cuatro variedades de uva blanca (macabeo, xarel-lo, parellada y chardonnay) empleadas en la elaboración del cava. Para ello, durante tres vendimias consecutivas se han tomado muestras en cuatro puntos del proceso de obtención, a escala industrial, de los vinos base monovarietales.

Se ha comprobado que, debido a los orí-

genes diversos de los ácidos grasos (procedentes de la uva o fermentativos), el perfil de los mostos difiere del de los vinos, tanto por su naturaleza como por sus concentraciones. Así, los ésteres de etilo son siempre minoritarios respecto a la cantidad de ácidos grasos libres. La fracción esterificada en los mostos es prácticamente inexistente y, en cambio, en los vinos puede representar hasta un 30 % del total. Por otra parte, en los mostos el 96 % (~ 7 ppm) de los ácidos grasos son de cadena larga (de 16 a 18 átomos de carbono), mientras que en los vinos el 95 % (~ 18 ppm) son de cadena corta (de 6, 8 y 10 átomos de carbono). En el caso de los vinos, se ha observado también que la distribución porcentual de los ácidos grasos de diferente longitud de la cadena carbonada es la misma para la fracción libre y la esterificada. Asimismo, estos primeros datos de ácidos grasos de vinos base monovarietales apuntan la posibilidad de caracterizaciones varietales. •

Influencia del etanol y del ácido decanoico sobre la actividad H⁺-ATPasa y la incorporación de aminoácidos por *Saccharomyces cerevisiae*

J. Fuguet, F. Fort, N. Ferrer, Ll. Arola y F. Zamora

Las paradas de fermentación alcohólica antes del completo consumo de los azúcares fermentables son uno de los principales problemas de la enología actual. Estas paradas de fermentación comportan un alto de riesgo de desarrollo de bacterias lácticas heterofermentativas que pueden metabolizar las hexosas presentes en el medio e incrementar drásticamente la acidez volátil del vino.

La bibliografía existente sobre las paradas de fermentación señala que las altas concentraciones de etanol y la presencia de ácidos grasos de cadena corta liberados por las propias levaduras, podrían ser sus principales causas.

El principal objetivo de este trabajo fue el de estudiar la influencia del etanol y del ácido decanoico sobre algunos de los sistemas de transporte de nutrientes (actividad H⁺-ATPasa y captación de aminoácidos) a través de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

La determinación de la actividad H⁺-ATPasa y de la velocidad de incorporación de aminoácidos fueron realizada en levaduras (Levuline CHP; GLO) durante la fase tumultuosa de la fermentación (tercer día).

Para la determinación de la actividad H⁺-ATPasa, las levaduras eran tratadas con liti-casa con el propósito de obtener esferoblas-

tos, los cuales eran sometidos posteriormente a un choque osmótico. Tras la purificación de las membrana se determinó la actividad H⁺-ATPasa mediante la medida de la velocidad de hidrólisis del ATP y del flujo de protones a través de la membrana plasmática.

La determinación de la incorporación de aminoácidos fue realizada mediante la utilización de un análogo estructural de los aminoácidos no metabolizable, el ácido 2-aminoisobutírico (2-AIB) marcado con carbono-14, el cual es transportado al interior de la célula mediante la permeasa general de aminoácidos.

Los resultados obtenidos muestran que el etanol provoca una fuerte inhibición de la actividad H⁺-ATPasa y del flujo de protones a través de la membrana, mientras que el ácido decanoico produce un incremento de su actividad.

La disminución de la actividad H⁺-ATPasa provocada por la presencia de etanol indica que, a medida que transcurre la fermentación alcohólica, las levaduras presentarán mayores dificultades para mantener el pH intracelular y, por tanto, todos los sistemas de transporte activo (*symport* con protones) estarán seriamente comprometidos. El incremento de la actividad H⁺-ATPasa inducido por la presencia de ácido decanoico podría estar relacionada con la necesidad de mantener el pH

intracelular en condiciones que inducen su acidificación.

Por otra parte, tanto la presencia de etanol como de ácido decanoico provocaron una clara inhibición de la incorporación de 2-AIB, lo que indicaría que el transporte de los aminoácidos, necesarios para la multiplica-

ción celular, estaría seriamente afectado por estas condiciones. Todo ello indicaría que realmente las altas concentraciones de etanol y la presencia de ácidos grasos de cadena corta pueden realmente condicionar el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. •

Optimización de un fermentador de laboratorio para la elaboración de vinagre de vino

W. Tesfaye, M.L. Morales-Gómez, M.C. García-Parrilla y A.M. Troncoso

El objetivo del presente trabajo consiste en aumentar el rendimiento y la velocidad de acetificación para obtener vinagres de vino con alto grado acético en menor tiempo. Para ello, se estudian las variables que intervienen en el proceso: concentración inicial de etanol, velocidad de agitación, volumen de carga, proporción de carga, velocidad de carga, temperatura y suministro de aire.

El estudio se realizó con un fermentador a escala de laboratorio de B. Braun Biotech S.A. con un volumen de 5 L de capacidad provisto de control de temperatura, pH, presión parcial de oxígeno y velocidad de agitación.

Durante el proceso de acetificación se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: a) concentración inicial de etanol, que se fijó a 10° en los casos en que los sustratos vínicos presentaran un grado alcohólico superior diluyendo con agua destilada; b) el suministro de aire se mantuvo entre 100-200 L/h (0,33-0,98 vvm), y c) la temperatura se reguló a 30 °C.

Se han seleccionado tres variables: velocidad de agitación, volumen de carga y proporción de carga observándose como afectan al proceso de acetificación. Para ello se aplicó el diseño factorial a dos niveles (tabla 1). El efecto de cada variable, así como la posible

combinación, se evaluó en función de la velocidad de acetificación y el rendimiento. Se realizaron arbitrariamente 14 experimentos y se calcularon la velocidad de acetificación y el rendimiento. Se propuso una ecuación de regresión lineal múltiple que se resuelve con el programa estadístico CSS-Statistica.

Tabla 1 Representación de las tres variables a dos niveles

Factores	Niveles			
	Sin codificar	Codif.	Sin codificar	Codif.
Agitación (x_1)	250 rpm	-1	450 rpm	+1
Volumen de carga (x_2)	3400 mL	-1	5000 mL	+1
Proporción de carga (x_3)	1:1 vino/vinagre	-1	2:1 vino/vinagre	+1

Resultados

Del diseño experimental a dos niveles para tres variables se obtuvieron los siguientes resultados: la variable crítica para obtener un mejor rendimiento es la proporción de carga, y para conseguir una buena velocidad de acetificación la agitación ha demostrado ser la variable más importante. •

Bibliografía

- CSS-Statistica: *Complete Statistical System Statsoft*, Inc.Tulsa OK 74104, 1991.
- González A.G.: «Two level factorial experimental designs based on multiple linear regression models: a tutorial digest illustrated by case studies», *Anal Chim Acta* 1998; 360: 227-241.
- Nieto J.: «Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. El vinagre de vino», Llaguo C., Polo M.C. (eds.), Consejo Superior de Investigaciones científicas, Madrid, 1991: 69-103.

Seguimiento e identificación de bacterias lácticas y acéticas mediante métodos moleculares

C. Reguant, A. Ruiz, M. Poblet, N. Rozès, V. Garcia, M. Constantí, J.M. Guillamón, A. Bordons y A. Mas

Se han aislado e identificado cepas de bacterias lácticas y acéticas después de una fermentación alcohólica en tinto de la variedad garnacha negra, correspondiente a la vendimia de 1998, en la finca experimental Mas dels Frares, en Constantí, de la Facultad de Enología de Tarragona. Con ello se pretendía, además de la puesta a punto de los métodos identificativos con DNA, verificar por un lado cuáles eran las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica en esta vinificación y, por otro, cuál era la posible proliferación de bacterias acéticas en estas condiciones, así como la identificación de las mismas.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en paralelo en dos depósitos de vinificación y sin control de temperatura, uno de forma espontánea y otro inoculado con *Saccharomyces cerevisiae* (L1118). A continuación, sin adición de sulfuroso, se dejó que se llevara a cabo la fermentación maloláctica espontáneamente, siendo el contenido inicial en L-málico de 2 g/L. Durante el transcurso de dicha fermentación (10-20 días) se tomaron muestras para cuantificar y aislar los dos tipos de bacterias, lácticas en placas de MRS (suplementado con málico y zumo de tomate), y acéticas en placas con medio de Drysdale y Fleet (1985) modificado. Para cada uno de los dos tipos de bacterias y de cada

muestra, se tomaron unas 20 colonias aisladas para ser identificadas.

Las bacterias lácticas han sido identificadas mediante extracción de su DNA genómico, seguida de amplificación con PCR mediante dos cebadores (oligonucleótidos de 24 bases) complementarios de regiones específicas del gen del enzima maloláctico de *Oenococcus oeni*, obteniéndose en la electroforesis una banda de amplificado característico de esta especie. Se ha observado un crecimiento ostensible de la población de lácticas (hasta 10^8 por mL) solamente en el vino que había sido previamente inoculado con levadura. Se ha comprobado que la gran mayoría de aislamientos de bacterias lácticas de estas fermentaciones eran *Oenococcus oeni*. Para comprobar si la fermentación maloláctica fue llevada a cabo por una sola cepa o por varias, se está procediendo en la actualidad a la identificación a nivel de cepas, mediante amplificación con PCR de regiones inespecíficas (RAPD) con diversos cebadores aleatorios de 10 nucleótidos.

Las bacterias acéticas han sido identificadas también a nivel de especie, de entre los diversos *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Gluconobacter*, mediante extracción de su DNA genómico, seguida de amplificación con PCR mediante cebadores complementarios de regiones específicas del fragmento 16S

del rDNA, con tratamiento posterior con enzimas de restricción. Con ello se han obtenido unos perfiles RFLP de amplificados, característicos de las diferentes especies de bacterias acéticas. Se ha observado que la población de acéticas aumenta considerablemente durante la fermentación maloláctica para caer al final de ésta. Al principio de la

misma la población de acéticas tiene especies representantes de los tres géneros. En cambio, durante la fermentación maloláctica y al final de ésta, la especie mayoritaria y casi única ha sido *Acetobacter aceti*, con colonias esporádicas de *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans*. •

Efecto de la proteasa de *Oenococcus oeni* sobre las proteínas de vinos blancos y tintos

M.C. Manca de Nadra,* V. Moreno-Arribas,** E. Pueyo,**
M.E. Farías* y M.C. Polo**

Las proteínas del vino proceden en su mayoría de la uva. Se eliminan en parte de una forma espontánea durante la elaboración por insolubilizarse a medida que avanza la fermentación y aumenta el grado alcohólico y por formar complejos con los compuestos fenólicos, especialmente en el caso de los vinos tintos. Aunque están normalmente en el vino en concentraciones muy pequeñas, generalmente del orden de varios mg/L, pueden ocasionar turbidez en los vinos. También se ha descrito que forman parte de los inhibidores de la precipitación tartárica (Correa-Gorospe *et al.*, 1991) dificultando la eliminación del bitartrato potásico del vino, por lo que es necesario eliminarlas. Las enzimas que existen en el mercado no actúan sobre estas proteínas, sin que conozcamos totalmente las causas. Waters *et al.* (1996) atribuyen la causa de dicha resistencia al hecho de ser proteínas de resistencia a patógenos de la planta, con secuencias homólogas a taumatina y quitinasa.

Rollán *et al.* (1993 y 1995) han aislado cepas de *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oen*) que producen dos proteasas extracelulares. Esta actividad tiene un gran interés en vinificación no sólo por el hecho antes mencionado, sino porque la fermentación maloláctica se produce generalmente después de la fermentación alcohólica, cuando el vino es

deficiente en compuestos nitrogenados. La actuación de estos enzimas puede aportar al vino los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las bacterias lácticas.

El objetivo del trabajo es conocer el efecto de la actividad proteásica de la cepa *Oenococcus oeni* X₂L sobre las proteínas de vinos blancos y tintos. Los ensayos se han realizado con los sobrenadantes de un cultivo libre de células como solución del enzima, y las proteínas obtenidas por diálisis y posterior liofilización de los vinos, como sustratos. Se han realizado ensayos comparativos antes y después de la acción de la proteasa comprobándose la liberación de aminoácidos y de péptidos por HPLC. Además, se ha realizado la identificación parcial de algunos de los péptidos liberados, mediante el análisis espectral. Los primeros resultados de este estudio ya han sido publicados (Manca de Nadra *et al.*, 1997 y 1999). •

Bibliografía

- Correa-Gorospe *et al.*: *Food Chem* 1991; 41: 135-146.
Manca de Nadra *et al.*: *FEMS Microbiol. Letters* 1997; 150: 135-139 .
Manca de Nadra *et al.*: *FEMS Microbiol Letters* 1999 (en prensa).
Rollán *et al.*: *World J Microbiol Biotechnol* 1993; 9: 587-589.
Rollán *et al.*: *World J Microbiol Biotechnol* 1995; 11: 153-155.
Waters *et al.*: *J Agric Food Chem* 1996; 44: 3-5.

* Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán y Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA), Tucumán, Argentina

** Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid

Ecología de la fermentación alcohólica espontánea durante varios años consecutivos.

Influencia en la cinética fermentativa

P. Santamaría, A.R. Gutiérrez A.R., Epifanio, R. López y P. Garijo*

La fermentación alcohólica espontánea del mosto de uva es un proceso llevado a cabo por la acción de levaduras pertenecientes a diferentes géneros y especies. Las levaduras de bajo poder fermentativo crecen durante las etapas iniciales de las fermentaciones; cuando la concentración de etanol se incrementa, las levaduras más tolerantes a este compuesto pertenecientes al género *Saccharomyces* completan la fermentación. Dentro del género *Saccharomyces* existe una gran diversidad genética. Para estudiar esta diversidad se han utilizado diversas técnicas de biología molecular.

En los últimos años se han llevado a cabo gran cantidad de trabajos encaminados a estudiar si la fermentación alcohólica espontánea se lleva a cabo por un número alto o bajo de clones distintos de *Saccharomyces* y si estos clones se mantienen en el ecosistema de la bodega de un año a otro.

En el presente trabajo se ha estudiado la ecología de la fermentación alcohólica espontánea en la bodega experimental del CIDA durante cinco años consecutivos (vendimias 1994-1998). Para ello se han tomado muestras de 42 depósitos de elaboración de vinos blancos. Los aislamientos de levaduras se realizaron en tres etapas: mosto, fermentación tumultuosa y fin de fermentación. La identificación de los aislados se realizó utili-

zando el análisis de restricción del DNA mitocondrial.

El análisis de restricción del DNA mitocondrial de los aislados procedentes de los mostos mostró la ausencia de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* en esta etapa. Por el contrario, todas las colonias de las etapas fermentativas pertenecían a este género, salvo algunos aislados obtenidos en 1997.

Los patrones de restricción del DNA mitocondrial de los 840 aislados estudiados revelaron 73 perfiles diferentes, que corresponden a diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El número de cepas diferentes detectadas para cada año y su frecuencia de aparición varían en función de la campaña estudiada.

Al comparar los patrones obtenidos en los cinco años se observó que algunos de ellos estaban presentes en años consecutivos, pero su presencia varía notablemente de un año a otro. Estos resultados nos llevan a pensar sobre la existencia de un conjunto de clones propios del ecosistema de cada bodega, cuya participación en la fermentación viene determinada por su capacidad de adaptación a las condiciones en que se llevan a cabo las vinificaciones (características del mosto en cada campaña, tecnología empleada en las elaboraciones, etc.).

En los cinco años del estudio, cuatro tuvieron fermentaciones normales; la excepción fue la campaña de 1997. Este año fue problemático en varias regiones vitivinícolas españolas, donde se detectaron numerosas paradas de fermentación. En todos los depósitos sometidos a muestra este año los vinos quedaron dulces y con una acidez volátil muy elevada. Esta inusual situación también se reflejó en los datos microbiológicos obteni-

dos; la población de bacterias acéticas en el mosto de partida fue muy superior al resto de los años y además levaduras no *Saccharomyces* fueron las cepas dominantes durante la fermentación tumultuosa con una presencia del 50 %. Así, en este caso concreto, el desequilibrio en la población microbológica inicial y la falta de cepas del género *Saccharomyces* explicarían las disfunciones detectadas en estas fermentaciones. •

Aislamiento e identificación por métodos moleculares de la población levaduriforme presente en mostos

B. Esteve-Zarzoso, *** F. Uruburu* y A. Querol**

La transformación del mosto de uva en vino es el resultado de la acción sucesiva de diferentes especies de microorganismos, en la que las levaduras juegan un papel primordial, predominando al final de la fermentación cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Durante los primeros estadios de la fermentación se aíslan otras especies de levaduras que pueden aportar características organolépticas deseables a los vinos, estas especies que nosotros denominamos no *Saccharomyces*, se aíslan principalmente de fermentaciones espontáneas, siendo difícilmente aisladas de fermentaciones inoculadas.

Los métodos de identificación basados en la asimilación y fermentación de distintos compuestos carbonados y nitrogenados permiten actualmente una identificación lenta de las especies de levaduras, además de dar un resultado no muy fiable. Sin embargo, la metodología descrita por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) para identificar especies de levaduras permite una rápida y fiable identificación de las mismas. Esta técnica consiste en la amplificación por PCR y restricción de la región ribosomal ITS-5,8S. Utilizando esta metodología se han podido identificar la mayor parte

de las 2591 colonias de levaduras que se aislaron durante la vendimia de 1997 en las bodegas Gonzalez-Byass de Jerez de la Frontera (Cádiz). Los aislamientos se realizaron tanto de fermentaciones espontáneas como inoculadas, y en dos medios de cultivo diferentes. Uno de los medios utilizados es el agar lisina, descrito para aislar especies de levaduras no *Saccharomyces*, y el otro medio de aislamiento fue agar YPD, como medio general de aislamiento de levaduras.

De esta forma se pudo observar la presencia de una gran variedad de especies de levaduras durante las primeras fases de la fermentación, como especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, entre otros. Dichas especies fueron reemplazadas por cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en el transcurso de la fermentación, dominando al final de la misma. Cabe destacar que mediante esta tecnología se han aislado e identificado cepas de levaduras de las especies *Candida albicans*, *C. sorbosa*, *Kluyveromyces polysporus*, *Yarrowia lipolytica* y *Zygosascus hellenicus* que nunca se había descrito su aislamiento de este ambiente. •

* Colección Española de Cultivos Tipo, Edificio de Investigación Jeroni Muñoz, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia

** Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Burjassot, Valencia (braulio@iata.csic.es)

Sistemas moleculares de identificación y tipificación de *Lactobacillus* heterofermentativos presentes en el vino

G. Lluesma, A. Rodas, I. Pardo y S. Ferrer

Lactobacillus es uno de los géneros de bacterias lácticas que pueden desarrollarse durante el proceso de elaboración del vino. Dentro de dicho género existen especies homofermentativas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. En algunos casos, *Lactobacillus* puede alterar las características organolépticas de los vinos, de ahí la importancia de detectar la presencia de estas bacterias de una forma rápida y fiable con la finalidad de tomar medidas para evitar sus efectos perjudiciales.

Los objetivos de este trabajo son: 1) desarrollar sistemas moleculares de identificación y tipificación de las especies de *Lactobacillus* presentes en el vino; 2) comparar estas técnicas y seleccionar la más adecuada para tales fines; 3) utilizar estas técnicas para llevar a cabo el seguimiento de poblaciones naturales en vinificaciones. Las técnicas inicialmente elegidas para cumplir estos objetivos han sido RAPD'S, análisis de fragmentos de macrorestricción mediante electroforesis en campo pulsante (RFLP-PFGE) y desarrollo de cebadores específicos.

Durante la vendimia de 1997-1998 se aislaron 181 cepas de *Lactobacillus* a partir de vinos y mostos procedentes de diferentes

bodegas de las denominaciones de origen Utiel-Requena y Jumilla. De ellas, 91 pertenecían a especies heterofermentativas obligadas, de las cuales se identificaron 43 como *Lactobacillus hilgardii*, 12 como *Lactobacillus buchneri* y 36 como *Lactobacillus brevis*, siguiendo los criterios del libro *The Prokaryotes* (vol. II, 2ª ed.).

Tras poner a punto la técnica de extracción de DNA en discos de agarosa, se llevó a cabo el análisis de estas cepas mediante RFLP-PFGE con el enzima *Sfi*I, y el análisis de bandas generadas por RAPD'S utilizando para ello el cebador 17R. Los resultados obtenidos muestran en general una buena correlación con la identificación fenotípica de las tres especies. Sin embargo, se ha observado con ambas técnicas que las cepas identificadas fenotípicamente como *L. brevis* muestran tres grupos diferentes de patrones de macrorestricción y RAPD'S. En algún caso estos perfiles son muy parecidos a los que presentan cepas identificadas como *L. hilgardii*. Esto muestra que existe cierta confusión entre ambas especies, por lo que es necesario profundizar mediante otras técnicas moleculares para la correcta separación de ambas. •

Sistemas moleculares de identificación y tipificación de *Pediococcus* del vino

A. Rodas, G. Lluesma, I. Pardo y S. Ferrer

P*ediococcus* es uno de los géneros de bacterias lácticas que puede desarrollarse durante la elaboración del vino. El género *Pediococcus* incluye diferentes especies, pero en el vino fundamentalmente se presentan *Pediococcus parvulus* y *Pediococcus pentosaceus*.

La presencia de *Pediococcus* puede ser potencialmente peligrosa para la industria enológica al producir alteraciones en el sabor (producción de elevadas cantidades de diacetilo) y en la viscosidad (producción de polisacáridos). Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas de identificación rápida que permitan detectar su presencia en vino con el fin de poner medidas para evitar sus efectos perjudiciales en el mismo.

Los objetivos de este trabajo son analizar la capacidad de distintas técnicas moleculares para identificar y tipificar las especies de *Pediococcus* presentes en el vino. Las técnicas seleccionadas son RAPD'S, oligonucleótidos específicos del rDNA 16S y macrorresolución mediante electroforesis de campo pulsante (RFLP-PFGE). Una vez seleccionadas aquellas metodologías más adecuadas se realizarán estudios ecológicos sobre la presencia y evolución de los *Pediococcus* durante la vinificación.

En este trabajo se aislaron 114 cepas de *Pediococcus* a partir de 32 muestras recolec-

tadas de mostos y vino durante la vendimia 1997-1998. Las muestras fueron tomadas en distintas bodegas de las denominaciones de origen Utiel-Requena y Jumilla. Dichas cepas se identificaron según los criterios expuestos en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9ª ed.) y el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9ª ed.), utilizando como controles las cepas tipo de las siguientes especies de *Pediococcus* previamente descritas en el vino: *P. acidilactici* (CECT 98), *P. parvulus* (CECT 813), *P. damnosus* (DSM 20331), *P. inopinatus* (DSM 20285) y *P. pentosaceus* (CECT 923).

El resultado de la identificación fenotípica a nivel de especie de los 114 *Pediococcus* mostró que tres cepas presentaban el perfil fenotípico de *P. pentosaceus* y 111 cepas presentaban el perfil fenotípico de *P. parvulus*.

Para llevar a cabo la identificación y tipificación molecular se puso a punto la extracción de DNA en bloque de agarosa, consiguiendo minimizar el tiempo de lisis celular y obtener un elevado rendimiento de DNA de gran pureza. Tras analizar varios oligonucleótidos hemos seleccionado uno de ellos, denominado 16R, como más adecuado para la identificación a nivel de especie. Se ha realizado tipificación intraespecífica mediante RAPD'S con el oligonucleótido 17R y RFLP-

PFGE con los enzimas *Sfi* I, *Not* I y *Sma* I. Debido a los tamaños de fragmentos generados por dichos enzimas, se requirió la puesta a punto de las condiciones adecuadas de electroforesis en campo pulsante. Tras el análisis de estos fragmentos hemos observa-

do que el enzima *Sfi* I es más discriminativo que los otros dos enzimas.

En la actualidad estamos trabajando en el diseño de cebadores específicos para la detección directa de las especies presentes en el vino. •

Análisis estadístico del efecto del desfangado sobre la cinética fermentativa de mostos blancos

F. Varela, F. Calderón, M.C. González, B. Colomo y J.A. Suárez Lepe

La elaboración de vinos blancos de calidad ha de realizarse a partir de un mosto limpio, un mosto que haya sufrido el proceso de desfangado, tratamiento que consiste en provocar una clarificación del mosto antes de la fermentación, con el fin de eliminar las partículas susceptibles de comunicar aromas desagradables al vino. El efecto favorable del desfangado es puesto en evidencia por la superioridad organoléptica de los vinos obtenidos a partir de mostos desfangados, principalmente en el carácter aromático; además, los vinos obtenidos a partir de mostos desfangados son más estables, sobre todo frente a fenómenos oxidativos.

Frente a estos efectos positivos del desfangado, los mostos sometidos a este tratamiento sufren ciertos problemas relacionados con el proceso fermentativo, como son los arranques tardíos, las ralentizaciones de la fermentación o las paradas de ésta. Estos problemas se atribuyen al empobrecimiento químico y microbiológico causado por el desfangado.

El trabajo que se presenta evalúa el efecto de diez técnicas de desfangado, estáticas y dinámicas sobre la población de levaduras, la composición en ácidos grasos y la cinética fermentativa de los mostos obtenidos.

Se observa cómo los mostos tratados mediante frío son más limpios que los desfan-

gados a temperatura ambiente, no se observan diferencias, en relación a la turbidez, de los mostos desfangados en frío y los obtenidos mediante tratamientos dinámicos, aunque estos últimos presentan la ventaja de realizarse en pocas horas frente a la 48 necesarias para los desfangados estáticos.

El desfangado reduce la población de levaduras presente en los mostos, los tratamientos enzimáticos y dinámicos son los que mayor influencia ejercen sobre la población de levaduras.

En relación a las concentraciones de ácidos grasos los resultados indican que las burbas son más ricas que los mostos; el desfangado produce un descenso en la composición de ácidos grasos del mosto en todos los tratamientos, el desfangado mediante flotación es el que mayor pérdida de ácidos grasos induce. El ácido graso que se encuentra en mayor concentración es el ácido oleico, de los ácidos grasos saturados el palmítico es el principal.

El tratamiento de desfangado provoca un aumento en la duración de la fermentación, las fermentaciones más largas para los tratamientos dinámicos, intermedias para los desfangados en frío y cortas para el desfangado a temperatura ambiente.

En relación al análisis estadístico de componentes principales se observan altas corre-

laciones entre limpidez con población de levaduras, turbidez con ácidos grasos y población de levaduras con ácidos grasos. Se observa cómo la duración de la fermentación es más larga cuando la clarificación del mosto es más efectiva, esto es, cuando la turbidez es más baja.

También se observa cómo los diferentes mostos aparecen agrupados en diferentes

clusters según el tratamiento de desfangado a que ha sido sometido el mosto, así los tratamientos dinámicos forman un *cluster*, los enzimáticos otro grupo, mientras que el desfangado a temperatura ambiente se comporta de forma intermedia entre el mosto no desfangado y los mostos desfangados mediante frío. •

Participación de los hongos filamentosos en el «gusto a corcho»: biosíntesis y degradación de compuestos organoclorados *in vitro*

E. Navascués, F. Calderón, B. Colomo, J.A. Suárez y C. García Vallejo*

La alteración sensorial de vinos conocida como «gusto a corcho» o «gusto a tapón» se debe a derivados organoclorados de la familia de los cloroanisoles, particularmente al 2,4,6 tricloroanisol (TCA) (Buser *et al.*, 1982; Amon *et al.*, 1989; Duncan, 1995). Estos compuestos producen, en concentraciones pequeñas (del orden de ng/L), sensaciones olfativas muy marcadas, generalmente englobadas dentro del término mohoso, terroso o relacionados (humedad, cueva, pozo). El problema parece derivar de la presencia de fenoles clorados, que son transformados en cloroanisoles mucho más volátiles y odoríferos por ciertas especies de hongos filamentosos (Curtis *et al.* 1975; Tindale *et al.*, 1989).

En este estudio se indujo la biosíntesis de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2,3,4,6 tetracloroanisol (TeCA) y pentacloroanisol (PCA) a partir de los clorofenoles 2,4,6-triclorofenol (TCF), 2,4,6 tetraclorofenol (TeCF) y pentaclorofenol (PCF) en sistemas modelo *in vitro* por especies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Monilia*, aislados de vinos y tapones correspondientes, afectados por «gusto a corcho». Se pretendió la búsqueda de aquella especie o especies

que participan directamente en la producción de la anomalía sensorial, observando que todas ellas lo hacen en mayor o menor medida. Existen diferencias cuantitativas en función de la especie, siendo *Penicillium purpurogenum*, especialmente activo. Se detectan igualmente diferencias intraespecíficas, relacionadas con el grado de alteración de los vinos y corchos de partida, así como de la situación del hongo en el cuerpo del tapón de corcho. En cualquier caso, las pautas de degradación de clorofenoles y síntesis de cloroanisoles a lo largo del tiempo son comunes para todas las especies. Por último se demuestra que la biosíntesis de cloroanisoles por hongos filamentosos puede llevarse a cabo a partir de otros sustratos clorados distintos de los clorofenoles, como son ciertos detergentes de uso común en bodega y fitosanitarios (lindano) que presentan cloro en su composición. La formación de cloroanisoles se interpreta como la respuesta del hongo frente a un metabolito tóxico como el cloro. El hecho de que la presencia de corcho en los sistemas de cultivo potencie la biosíntesis de organoclorados parece deberse a la cesión de su estructura aromática, en la que quedan englobadas las moléculas de cloro. •

Vías metabólicas de utilización de arginina por bacterias lácticas. Producción de aminos

M.E. Arena y M.C. Manca de Nadra

Arginina es uno de los aminoácidos que se encuentra en mayor proporción en vinos y jugos de frutas, y puede ser degradado por bacterias lácticas. El conocimiento de las vías metabólicas para su utilización es de especial interés, principalmente en lo referente a la producción de aminos. Las bacterias lácticas juegan un papel fundamental en la elaboración de alimentos fermentados y las aminos biógenas pueden ser agentes causales de intoxicaciones alimentarias.

En cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de jugo de naranja y en cepas de *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus hilgardii*, aisladas de vinos, investigamos el o los caminos que utilizan para catabolizar arginina: sistema arginina dihidrolasa (ADI), sistema arginasa-ureasa y/o arginina descarboxilasa.

En ninguno de los microorganismos se detectó el sistema arginasa-ureasa. Con respecto al sistema ADI, dos cepas de *Lb plantarum*, N4 y N8, producen los metabolitos intermedios de este camino, citrulina y ornitina en concentraciones dependientes de la cepa.

De los géneros de bacterias lácticas de interés enológico, en *Lactobacillus hilgardii* se evidenció la degradación de arginina a CO₂, NH₃ y ornitina, detectándose citrulina como compuesto intermedio. *Pediococcus pentosaceus* y una cepa de *Oenococcus oeni* no tie-

nen capacidad para degradar arginina. Sin embargo, otra cepa de *Oenococcus oeni* tiene información para utilizar citrulina, dando como productos ornitina CO₂ y NH₃.

Como el sistema ADI es un camino que conduce a la síntesis de ATP, las bacterias que lo poseen tienen ventajas para desarrollar en medios nutricionalmente pobres. Esta capacidad es de especial importancia en medio vino con microflora láctica mixta. Al compartir el mismo nicho ecológico se producen interacciones y de las potencialidades de cada uno de ellos dependerá la simbiosis positiva o negativa establecida.

Por la capacidad decarboxilante sobre los aminoácidos arginina y ornitina, demostramos que arginina conduce a la síntesis de agmatina y ornitina a la de putrescina. Agmatina puede ser enzimáticamente convertida en putrescina.

Lactobacillus plantarum N8 produce ambas aminos biógenas a partir de ornitina. La cepa N4 sólo produce putrescina, pero en mayor cantidad. *Lactobacillus hilgardii* produce agmatina a partir de arginina y ornitina.

Los resultados hasta el presente indican que se debe conocer la actividad metabólica de los microorganismos respecto a la utilización de arginina, en los ambientes naturales en los cuales desarrollan, para predecir la posibilidad de síntesis de compuestos tóxicos para el hombre y actuar en consecuencia. •

Oenococcus oeni: degradación de proteínas

M.E. Farías y M.C. Manca de Nadra

Durante el proceso de vinificación, los microorganismos que intervienen en la desacidificación de los vinos están sujetos a condiciones ambientales desfavorables. Una cepa de *Oenococcus oeni* aislada de vino argentino tiene elevado potencial maloláctico y demostramos, por primera vez, que posee un sistema proteolítico que se expresa en diferentes condiciones de cultivo. Las proteasas liberan aminoácidos esenciales para el crecimiento de los microorganismos y pueden jugar un importante papel al degradar las proteínas, evitando su precipitación. Ambas propiedades son beneficiosas durante la elaboración de los vinos.

El sistema está integrado por dos actividades exoproteásicas, expresadas en los momentos de mayor estrés para el crecimiento bacteriano: inicio y final de fase exponencial. Los enzimas tienen diferentes óptimos de pH y temperatura, para la producción y actividad. Son inhibidas completamente por cisteína y beta-mercaptoetanol y parcialmente por ditioneitol, indicando que uniones disulfuro están implicadas en sus actividades. EDTA y omega-fenantrolina, inhibidores de metaloproteasas; iodoacetamida y p-hidroximercuribenzoato, reactivos covalentes de grupos sulfhidrilos, no afectan las actividades enzimáticas sugiriendo que un ion metal no es requerido y que grupos sulfhidrilos no están involucrados en el sitio activo. PMSF (fenilmetilsulfonilfluoro), inhibidor de serina proteasa, no afecta al enzima.

El enzima producido al final de la fase de crecimiento exponencial es inhibido por Ca^{2+} y estimulado por Mg^{2+} . La actividad proteolítica en células enteras se detecta solamente en presencia de Ca^{2+} , indicando que este catión podría mantener unida la proteasa a la célula. El ácido málico, en un rango de concentración de 2 a 4 g/L estimula la síntesis de las proteasas y a concentraciones superiores las inhibe. El ácido cítrico (0,1 a 0,5 g/L), estimula la producción de ambos enzimas.

Células no proliferantes de *Oenococcus oeni*, en condiciones de estrés nutricional y energético, producen una proteasa extracelular después de 2 horas de incubación a 30 °C. A su vez, SO_2 (60 mg/L) + etanol (8 %) estimulan su producción. Purificada a homogeneidad, el enzima nativo tiene un peso molecular aproximado de 33,5 kDa. La proteína está formada por dos subunidades idénticas de 17 kDa. •

Bibliografía

- Rollán G.C., Farías M.E., Manca de Nadra M.C.: *World J Microbiol Biotechnol* 1993; 9: 587-589.
- Rollán G.C., Farías M.E., Manca de Nadra M.C.: *World J Microbiol Biotechnol* 1995; 11: 153-155.
- Farías M.E., Rollán G.C., Manca de Nadra M.C.: *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 398-402.
- Rollán G.C., Farías M.E., Strasser de Saad A.M., Manca de Nadra M.C.: *J Appl Bacteriol* 1998; 85: 219-223.
- Farías M.E., Manca de Nadra M.C.: *Microbiol Alim Nutr* 1998; 16: 101-105.

Influencia de la contaminación por *Botrytis cinerea* en la calidad de vinos para la elaboración de cava

M. Quintana, S. Francioli, C. Andrés, E. López-Tamames, S. Buxaderas y M.C. de la Torre

Se ha estudiado la calidad de vinos destinados a la elaboración de cava cuya uva presentaba una infestación espontánea por *Botrytis cinerea*. Para ello, se han considerado distintos tipos de vinos de la variedad xarel·lo procedentes de uva afectada, en mayor o menor medida, por el hongo. El grado de infestación se ha establecido de forma visual por la observación del porcentaje de superficie dañada, estipulándose diferentes lotes de uva que se han vinificado paralelamente a escala industrial (control, botrítico 15 % y muy botrítico > 35 %).

En los mostos y vinos se han determinado parámetros generales y específicos de *Botry-*

tis, así como aromas y potencial espumante como parámetros de calidad.

Los resultados ponen de manifiesto que a medida que aumenta el grado de infestación de la uva, en los vinos hay una pérdida de potencial espumante y aparecen compuestos de oxidación, lo que evidencia el metabolismo oxidativo del hongo y la consecuente pérdida de calidad. Asimismo, estos primeros datos de mostos y vinos resultantes de uva con distintos niveles de contaminación botrítica apuntan la posibilidad de controlar vinos procedentes de uva infestada mediante la determinación del ácido glucónico, el glicerol y el benzaldehído. •

Análisis global del conocimiento actual del vino de cava

*M.C. Polo, E. Pueyo, V. Moreno-Arribas,
A. Martínez-Rodríguez y M.A. del Pozo*

De acuerdo con la legislación española actual, se denominan *cavas* a «los vinos espumosos de calidad producidos por fermentación en botella según el método tradicional, en una región determinada». Para optar a la denominación cava, «el vino debe estar en contacto con las levaduras de la segunda fermentación un mínimo de nueve meses». La legislación determina además que las variedades de uva autorizadas para la obtención de vinos destinados a la elaboración de *cavas* son: macabeo, xarel·lo, parellada, subirat (malvasía riojana) y chardonnay, como variedades de uva blanca, y garnacha tinta y monastrell, como variedades de uva

tinta. Para la elaboración de rosados están admitidas las variedades pinot noir y trepat.

En este trabajo se revisan las investigaciones que se han llevado a cabo sobre los mostos y los vinos base de las variedades autorizadas para la elaboración del cava, sobre los vinos de cava y sobre los cambios que se producen durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras, extrayendo las conclusiones de estos trabajos. Los temas se abordan por grupos de compuestos. También se dedica atención a los estudios que se han realizado sobre los aspectos microbiológicos de la elaboración del cava. •

Estudio de las actividades enzimáticas con interés enológico en levaduras no *Saccharomyces*

M. Fernández, J. Úbeda y A. Briones

Se estudiaron las actividades enzimáticas de interés en enología de 182 levaduras no *Saccharomyces* aisladas de mostos antes de empezar la fermentación y de mostos al inicio de la misma, en bodegas acogidas a la DO La Mancha.

Para conocer si cada uno de los 182 aislados mostraba las actividades proteolítica, poligalacturonásica y beta-glucosidásica, se realizaron ensayos en placa con los sustratos diferenciales adecuados para cada caso (caseína y gelatina, ácido poligalacturónico y arbutina). Con objeto de que los resultados de las actividades enzimáticas se pudieran comparar entre las levaduras a estudiar, los sustratos se inocularon con el mismo número de células. Se encontró que casi el 80 % de las levaduras espontáneas poseían algún enzima de interés biotecnológico.

Una vez conocidas las actividades enzimáticas de los aislados, se caracterizaron genéticamente 69 de ellos, que poseían alguna actividad de forma pronunciada y 11 sin ninguna escogidos al azar, mediante PCR/RFLP, para ello se les extrajo el DNA, se amplificó la región ITS y se sometió a restricción con el enzima *Hinf* I, obteniéndose 13 perfiles moleculares diferentes.

Los aislados pertenecientes a cada perfil se identificaron mediante las galerías API ATB32C y otras pruebas de taxonomía clásica recomendadas por el manual de Barnett *et al.* (1990) para levaduras vínicas.

El enzima beta-glucosidasa estuvo muy relacionado con la especie *Metschnikowia pulcherrima*, mientras que la actividad poligalacturonásica fue frecuente en la mayoría de las especies identificadas. La actividad proteolítica se observó en *Pichia membranaefaciens* y en *Metschnikowia pulcherrima*.

Todos los perfiles genéticos poseían aislados con alguna de las actividades estudiadas, excepto *Debaryomyces hansenii*.

La caracterización genética mostró que puede haber diferenciación intraespecífica en *Pichia membranaefaciens*, porque para la misma especie se obtuvieron seis perfiles moleculares distintos con alguna banda de restricción en común.

El polimorfismo obtenido mediante PCR/RFLP manifestó gran coincidencia con las características fenotípicas y permitió nombrar correctamente aquellas especies en las que hubo discrepancia por los métodos clásicos. •

Desarrollo de marcadores moleculares en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* basados en microsatélites

I. Martínez, F.J. Gallego,* M.A. Pérez y P. Hidalgo

La caracterización e identificación rápida, precisa y poco laboriosa de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, especie de notable importancia en el proceso de vinificación, constituye en la actualidad un aspecto relevante cada vez más demandado por investigadores del campo enológico y profesionales del moderno sector vitivinícola.

Con este fin, en los últimos años se han desarrollado diversos métodos entre los que se encuentran los fundamentados en el análisis del polimorfismo del DNA celular, como el análisis de restricción del DNA genómico y mitocondrial (RFLP), cariotipos moleculares por electroforesis en campo pulsante y «huella» genética del DNA.

La aplicación de modernas técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la tipificación de levaduras vínicas han representado un gran avance en relación con las utilizadas previamente.

En el presente trabajo se desarrolla un nuevo método rápido, sencillo y fiable para ob-

tener perfiles genéticos de cepas de *S. cerevisiae*. Éste incluye la localización de secuencias repetidas en la base de datos del DNA genómico de *S. cerevisiae*, la búsqueda de cebadores para amplificar mediante PCR alguna de esas secuencias, la amplificación con los primers elegidos y el análisis de la variabilidad obtenida en las cepas.

Concretamente, la utilización del microsatélite SCTAT1 localizado en el cromosoma XIII ha servido como marcador molecular para caracterizar y diferenciar nueve cepas de *S. cerevisiae* en estudio. En ellas se han observado cinco genotipos homocigotos con un solo tamaño de alelo y cuatro heterocigotos con dos alelos de distinto tamaño. El número de secuencias TAT repetidas se situó entre 18 y 45.

Consecuentemente, la utilización de microsatélites amplificados mediante PCR constituye una potente herramienta para analizar el genoma de las levaduras de esta especie. •

Separación y cuantificación por HPLC de lípidos liberados durante la autólisis de levaduras vínicas

A. Martínez-Rodríguez, B. Bartolomé, G. Santa-María,
M.C. Polo y E. Pueyo

La autólisis de las levaduras que se produce de forma espontánea en las elaboraciones que conllevan un prolongado tiempo de envejecimiento con las levaduras, como es el caso de los vinos espumosos elaborados por el método *champenoise* y de los vinos *sur lie* que se elaboran en algunas regiones francesas, confiere a estos vinos unas características peculiares que los diferencian de otros.

Entre los compuestos de las levaduras que se liberan al vino durante la autólisis se encuentran los lípidos. La escasez de métodos analíticos que permitan separar y cuantificar de forma fiable esta compleja fracción, que se encuentra en el vino en concentraciones del orden de microgramos o a lo sumo de miligramos, ha hecho que hasta el momento actual exista un gran desconocimiento sobre este grupo de compuestos.

El objetivo de este trabajo es la puesta a punto de un método de análisis de lípidos por HPLC, así como el estudio de la liberación al vino de los lípidos de las levaduras. Debido a que la autólisis de las levaduras en el vino tarda varios meses en producirse o al menos en ser detectable analíticamente, se ha realizado una inducción de la autólisis en un medio vínico modelo. Los autolizados se han

extraído con cloroformo:metanol (2:1, v/v). Para la separación de las distintas familias de lípidos, se ha adaptado a la separación de los lípidos presentes en las levaduras, el método propuesto por Christie y Urbin (*J High Resol Chromatogr* 1995; 18: 97-100) que emplea una columna YMC PVA-Sil. La detección se ha realizado con un detector de dispersión de luz. Se ha determinado la concentración de ésteres de esteroles, triacilgliceroles, esteroides, 1,3-diacilgliceroles, ácidos grasos libres, 1,2-diacilgliceroles, 2-monoacilgliceroles y 1-monoacilgliceroles. Se ha comprobado que las curvas de calibrado de los lípidos se ajustan a un modelo polinomial de tercer grado, obteniéndose coeficientes de determinación mayores de 0,94 en todos los casos con un error estándar de la predicción menor del 6 % para seis de las ocho clases de lípidos cuantificadas. La repetibilidad del proceso de extracción ($n = 3$) medida por la desviación estándar relativa es del 3 al 7 %.

Se ha observado una liberación de lípidos en los primeros momentos de la autólisis y una disminución posterior lo que podría indicar la solubilización de enzimas procedentes de las levaduras que degradan a los lípidos liberados. •

Enzimas implicados en la biosíntesis de acetatos con diferentes levaduras enológicas

M.C. Plata, M.C. Millán, E. Valero, J.C. Mauricio y J.M. Ortega

Los acetatos, tales como el acetato de etilo y el acetato de isoamilo, son compuestos importantes en el aroma del vino. Estos ésteres son sintetizados por las levaduras durante la fermentación a través de dos enzimas, la alcohol acetiltransferasa (AATasa, EC 2.3.1.84) y las estererasas (EC 3.1.1.1).

La sucesión de levaduras en una fermentación alcohólica de mosto de uva natural es un hecho comprobado. En este trabajo se ha estudiado la contribución de diferentes levaduras enológicas al aporte de este grupo de sustancias en el aroma del vino. Las levaduras utilizadas fueron las que se encuentran normalmente en la primera fase de fermentaciones industriales llevadas a cabo en la zona de DO Montilla-Moriles: *Pichia membranaefaciens*, *Candida guilliermondii*, *Hansenula subpelliculosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata* y *Torulaspota delbrueckii*. Como levadura típica fermentadora se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* raza *cerevisiae* (E-1). Las experiencias se realizaron en un mosto sintético para eliminar el posible efecto que acarrearán las diferentes vendimias en la composición del mosto.

Las levaduras de primera fase de fermentación produjeron mayor cantidad de estos acetatos en las primeras horas de desarrollo del proceso fermentativo (seis horas para la

producción de acetato de etilo con las levaduras *H. subpelliculosa*, *T. delbrueckii* y *K. marxianus* y 24 horas para la de acetato de isoamilo con *K. apiculata*, *H. subpelliculosa* y *K. marxianus*). La levadura típica fermentadora produjo mayores cantidades de acetato de isoamilo que el resto de las levaduras utilizadas en los estadios finales de la fermentación.

La síntesis de acetatos llevada a cabo por las estererasas sólo se mostró activa para la síntesis de acetato de etilo. Esta actividad se detectó en las primeras horas de fermentación en *K. apiculata*, *K. marxianus* y *P. membranaefaciens*, mientras que en *C. guilliermondii* y *T. delbrueckii* fue al final de la misma. No hubo detección de esta actividad en *H. subpelliculosa* y *S. cerevisiae* raza *cerevisiae*.

En todas las levaduras utilizadas se observaron síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo por el enzima AATasa, siendo sus cinéticas distintas en cada levadura.

El acetato de etilo se acumuló en el medio durante toda la fermentación excepto con *K. marxianus* donde disminuyó al final. La especie más productora fue *K. apiculata*.

El acetato de isoamilo se acumuló en el medio durante toda la fermentación con *S. cerevisiae* raza *cerevisiae*, *C. guilliermondii* y *P. membranaefaciens* y descendió al final de la misma con *K. marxianus*, *H. subpelliculosa* y *T. delbrueckii*. •