

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD
FERMENTATIVA DE LEVADURAS PRESENTES EN UVA CARIÑENA Y
GARNACHA DE LA DO MONTSANT 2019**

Cristina Cuesta Martí

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: María Jesús Torija Martínez, Biotecnología Enológica,
mjesus.torija@urv.cat

En cooperación con: VITEC – Centre Tecnològic del Vi

Supervisor/es: Imma Andorrà Solsona, VITEC, imma.andorra@vitec.wine

Fecha de convocatoria: Junio 2021

1. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis padres, a mi hermano, familiares y amigos por su ayuda y cariño en todo momento y por haberme apoyado siempre. Gracias a ello he podido llevar a cabo uno de mis sueños de la infancia y estudiar un grado de Biociencias. Sin su soporte no habría llegado a aquí.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mi tutora profesional, María Jesús Torija Martínez, por su paciencia y ayuda con este trabajo.

También querría darle las gracias a la doctora Imma Andorrà Solsona, por su acogida en el departamento de Microbiología enológica en VITEC, por permitirme realizar las prácticas y poder basar el TFG en las mismas, y por todo su apoyo durante este período. Asimismo, me gustaría agradecerle a mi compañera del departamento, la bióloga Noelia Espligares Horno su ayuda constante e incondicional. Y también querría destacar el agradecimiento al biólogo Sergi Forcadell, del departamento de Patología enológica y Viticultura por ayudarme cuando era preciso. Por parte del centro profesional, querría agradecer en último lugar a todos los compañeros de VITEC por permitir mi estancia de prácticas en este centro y haberme hecho sentir parte del equipo desde el inicio.

ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE	4
2. DATOS DEL CENTRO	6
3. GUÍA PREVENCIÓN DE PLAGIO	6
4. RESUMEN	7
5. PALABRAS CLAVE	7
6. ABREVIATURAS	8
7. SECTOR VINÍCOLA A NIVEL ESPAÑOL, EUROPEO Y MUNDIAL.....	9
1. Nomenclatura vitivinícola.....	9
2.1. DO Montsant.....	10
3. Proceso de elaboración del vino	12
4. Evaluación de la madurez de la uva para la vendimia	12
5. “Terroir” microbiano.....	13
6. Ecología de la fermentación	14
7. Identificación de levaduras.....	16
8. Proyecto PECT	17
8. HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVO/S.....	18
9. METODOLOGÍA.....	18
1. Aislamiento de levaduras autóctonas en uva Cariñena y Garnacha de DO Montsant.....	18
2. Identificación de las levaduras a nivel de especie	19
2.1. Extracción de DNA.....	19
2.2. Amplificación de la región ITS-5,8S del rRNA	20
2.3. Digestión del amplificado mediante enzimas de restricción.....	21
3. Tipificación de <i>S. cerevisiae</i>	21
4. Caracterización de la capacidad fermentativa de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	22
5. Caracterización y análisis químico	23
6. Análisis estadístico.....	24
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
1. Identificación a nivel de especie de las levaduras aisladas	24

2. Tipificación de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3. Fermentaciones a escala laboratorio de las cepas diferentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.1. Análisis químico inicial del mosto	31
3.3.2. Análisis estadístico de los resultados del análisis químico del vino	37
11. CONCLUSIONES	42
12. PERSPECTIVAS DE FUTURO	43
13. AUTOEVALUACIÓN	44
14. BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	48
1. Ejemplo de la microbiota que participa en la producción del vino.....	48
2. Fermentación alcohólica espontánea de la vendimia de 2019 DO Montsant	48
3. Concentraciones iniciales, volúmenes iniciales y finales	49
4. Gel de electroforesis de la digestión mediante enzimas de restricción	50
5. Ejemplo de secuencia de la muestra CAR_AMO_MIT_1.....	50

2. DATOS DEL CENTRO

 VITEC - Centro Tecnológico del Vino

- **Departamento:** Microbiología enológica
- **Dirección:** Carretera de Porrera, Km 1 Falset, 43730, Tarragona
- **Tutor profesional de prácticas:** Imma Andorrà Solsona

VITEC es el centro de investigación en el que he realizado mi estancia de prácticas, en concreto en el departamento de microbiología enológica. En esta institución realizan investigación para transmitir los resultados de la investigación e innovación vitivinícola a los clientes. VITEC, además del departamento de microbiología enológica, presenta soporte analítico en todas las etapas de la producción, asesoría y asistencia técnica, servicios de patología enológica, servicio de análisis sensorial y de servicio de bodega experimental para valorar a escala piloto nuevos procesos y productos.

VITEC se creó en 2009 como una fundación sin ánimo de lucro y se financia a través de la investigación que desarrolla y los servicios tecnológicos que ofrece el sector. El centro destina todos los ingresos a la actividad investigadora y potenciar la innovación vitivinícola para obtener una mejor producción y calidad vitícola y enológica.

3. GUÍA PREVENCIÓN DE PLAGIO

Yo, Cristina Cuesta Martí, con DNI 48010727K, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el 07 2017) (<https://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2021



4. RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que los microorganismos presentes en la viña y especialmente en la uva, entre ellos las levaduras autóctonas, son responsables de aportar al vino características regionales específicas (conocido como “terroir microbiano”). Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo es la identificación de levaduras autóctonas presentes en las variedades de uva Cariñena y Garnacha de la DO Montsant, de diferentes momentos de vendimia (Antes Del Momento Óptimo, Momento Óptimo y Después del Momento Óptimo), y evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, al tratarse de la principal especie responsable de la fermentación alcohólica. Las levaduras se identificaron a nivel de especie mediante el análisis de restricción de la zona ribosomal (RFLP-PCR del 5,8S-ITS rDNA) y las cepas de *S. cerevisiae* tipificadas mediante la PCR de los elementos delta. Asimismo, se evaluó la capacidad fermentativa de las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, analizando los compuestos químicos del mosto inicial y del vino, así como la evolución y la cinética fermentativa. Se aislaron e identificaron 422 colonias, incluyendo levaduras, hongos y bacterias, de las cuales 302 correspondieron a especies de levaduras. Asimismo, en este trabajo se han identificado 7 especies diferentes de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* x *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora* sp, *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Candida zemplinina*) y se han tipificado en principio 23 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con distintas cinéticas fermentativas, de las cuales 2 parecen tanto morfológicamente como fisiológicamente no ser de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

5. PALABRAS CLAVE

Fermentación alcohólica, Cariñena, Garnacha, DO Montsant, levaduras no-*Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, autóctono.

6. ABREVIATURAS

Tabla 1 | Colección de abreviaturas y su significado correspondiente que se utilizan en el presente trabajo

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
DO	Denominación de Origen
IGP	Indicación Geográfica Protegida
GP	Indicación Geográfica Protegida
VP	Vinos de Pago
DOP	Denominaciones de Origen Protegidas
VC	Vinos de Calidad con Indicación Geográfica
FAL	Fermentación Alcohólica
FML	Fermentación Maloláctica
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> o extracto de levadura peptona dextrosa.
AMO	Antes del Momento Óptimo de vendimia.
MO	Momento Óptimo de vendimia
DMO	Después del Momento Óptimo de vendimia
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
GAP	Grado Alcohólico Probable
NAP	Nitrógeno Amino Primario
NFA	Nitrógeno Fácilmente Asimilable
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
MAT	<i>Mating Type Locus</i> o Acoplamiento de levaduras
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
CAR	Cariñena
GAR	Garnacha
INI	Inicio
MIT	Mitad

7. SECTOR VINÍCOLA A NIVEL ESPAÑOL, EUROPEO Y MUNDIAL

La superficie global de viñedos en el mundo era de 7.4 millones de hectáreas (Mha) en el año 2019, el 50% de la cual es representada por tan solo 5 países (Figura 1). La Unión Europea presenta en conjunto 3,2 Mha, situándose España en la cabeza con 966 miles de hectáreas (mha), seguida de Francia e Italia con 794 y 708 mha respectivamente (“State of the world vitivinicultural sector in 2019” 2021).

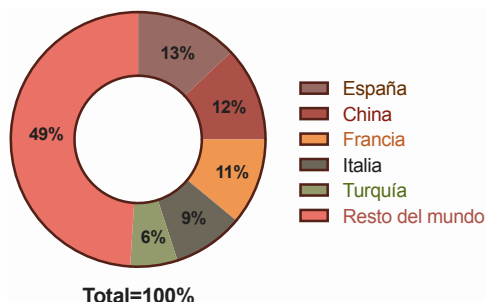


Figura 1 | Superficie de viñedos alrededor del mundo en el año 2019, representando en porcentajes los países con más peso. Extraído de: (“State of the world vitivinicultural sector in 2019” 2021).

En cuanto a la producción mundial de vino (excluyendo zumos y mostos), en el año 2019 fue de 260 millones de hL (MhL), presentando una disminución del 11,5% respecto al 2018. La UE siguió esta tendencia negativa, estimándose en 156 MhL en 2019 y España produjo durante este mismo año 33,5 millones de hectolitros. En relación con el consumo mundial de vino, en 2019 incrementó en un 0,1% respecto al año 2018, situándose en 244 MhL. La UE representó el 53% del consumo mundial de 2019, con un total de 128 MhL. Específicamente, el consumo de vino de 2019 en España fue de 11,1 MhL (“State of the world vitivinicultural sector in 2019” 2021).

1. Nomenclatura vitivinícola

Las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) hacen referencia a aquellos productos con origen en un lugar, región, o excepcionalmente un país, determinados, los cuales se han producido totalmente en esa zona geográfica y presentan una calidad o características exclusivas relacionadas con esta, debido a factores naturales y humanos, entre otros.

Por un lado, los vinos con IGP (Indicación Geográfica Protegida) se denominan vinos de la Tierra. Por otro lado, los vinos con DOP se pueden clasificar en distintos grupos: **Vinos de Pago** o **VP** (categoría superior de un vino y recoge aquellos con prestigio o características distintivas de paraje determinado), **Vinos con Denominación de Origen Calificada (DOCa o DOQ)** (vinos con altas cotas de calidad durante 10 o más años como Denominación de Origen), **Vinos con Denominación de Origen o DO** (vinos de prestigio de un área de producción delimitada y



Figura 2 | Logo de los vinos con Denominación de Origen Protegida de España. Extraído de: (“Mapa De Las Denominaciones De Origen Protegidas De Vinos De España” 2020).

con elaboración reglamentada por un Consejo Regulador que gestiona la DO), y finalmente, **Vinos de Calidad con Indicación Geográfica o VC** (vinos producidos y elaborados en una zona determinada con características asociadas al medio geográfico y/o al factor humano de la zona) ("Términos Tradicionales Y Términos Facultativos" 2021).

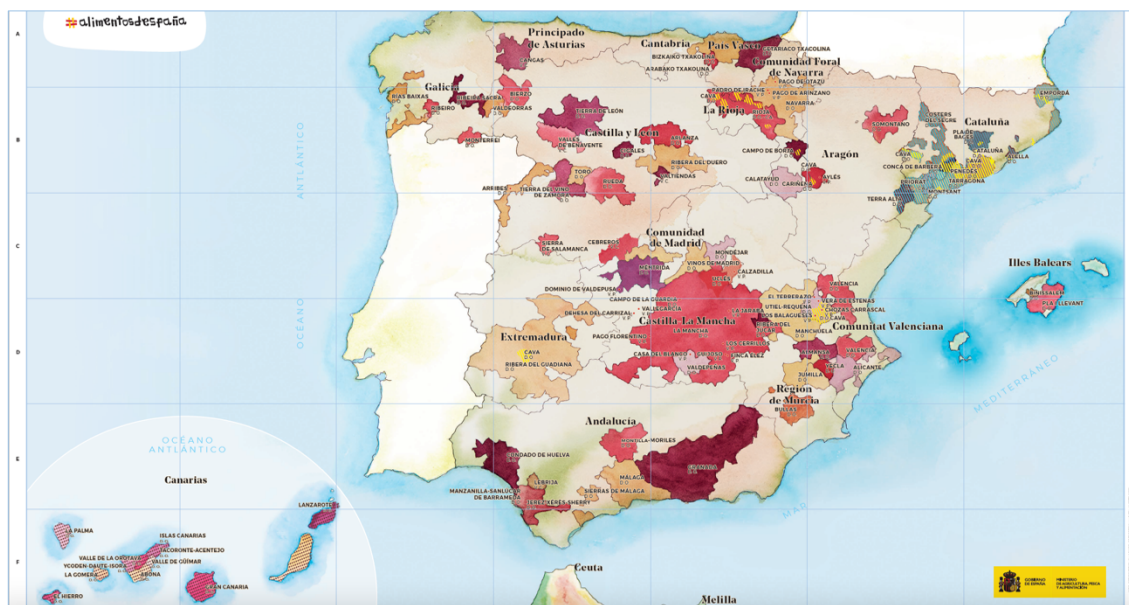


Figura 3 | Mapa de las Denominaciones de Origen Protegidas de España. En España hay 42 Indicaciones Geográficas Protegidas y 97 Denominaciones de Origen del Vino, de las cuales hay 2 con Denominación de Origen Calificada (Rioja y Priorat), 20 vinos de pago y 7 vinos de calidad. Extraído de: ("Mapa De Las Denominaciones De Origen Protegidas De Vinos De España" 2020).

En este trabajo se estudian muestras pertenecientes a vino de la DO Montsant (vendimia 2019). La DO Montsant, junto a la DOCa Priorat, son las denominaciones de origen gestionadas por los dos consejos reguladores de la comarca del Priorat ("Mapa De Las Denominaciones De Origen Protegidas De Vinos De España" 2020).

2.1. DO Montsant

La Denominación de Origen Montsant es una región vitivinícola de Tarragona (Cataluña), creada en el año 2001 y aprobada en 2002, que engloba más de 50 bodegas. El nombre de esta DO se debe a la montaña del Montsant que rodea el paisaje donde se encuentran los viñedos y la comarca (Figura 4). Aunque la comarca del Priorat engloba la DOCa Priorat, existen diversos municipios de esta comarca que pertenecen a la DO Montsant. Asimismo, algunas bodegas de Falset y El Molar pertenecen a ambas denominaciones de origen ("DO Montsant" 2020; "Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación" 2021). Esta región presenta un clima continental y mediterráneo con el impacto habitual del sol, el cual influye en la maduración de la uva, ya que se producen grandes diferencias de temperatura entre el día y la noche. Asimismo, la topografía de esta zona varía mucho, aunque, el promedio de altitud es entorno los 360 metros sobre

el nivel del mar. Además, los suelos de la DO Montsant se pueden clasificar principalmente en tres tipos: suelo arcilloso calcáreo, suelo de granito arenoso con poca capacidad de retención de agua (como el de Falset), y finalmente, suelos de pizarras ("DO Montsant" 2020; "Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación" 2021).

Los vinos de la DO Montsant han cobrado importancia recientemente debido al carácter de las vides con relativamente baja producción y por el clima de la zona. La DO Montsant presenta producción de vinos de diferentes variedades de uva, siendo las variedades blancas más habituales, Garnacha Blanca, Chardonnay, Macabeo, Moscatel, Pansá, Parellada y Picapoll Blanco, y las tintas, Garnacha Tinta, Garnacha Peluda, Cariñena, Cabernet Sauvignon, Merlot, Monastrell, Picapoll Tinto, Moscatel, Syrah y Tempranillo. La DO Montsant también es conocida por la producción de vinos blancos de licor (como mistelas), vino añejo, vino dulce, vino kosher y vimblanc ("DO Montsant" 2020; "Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación" 2021).

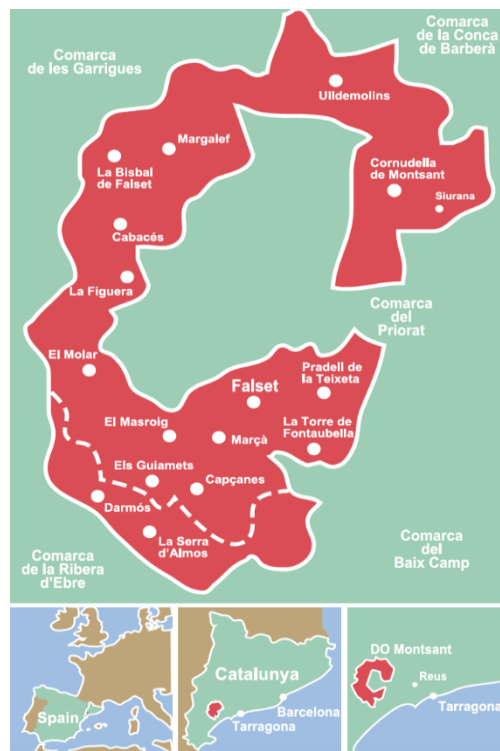


Figura 4 | Situación geográfica de la comarca del Montsant, a la cual pertenece la Denominación de Origen Montsant, y que tiene forma de C rodeando a la comarca del Priorat, como se observa. Extraído de: (Portada – DO Montsant 2020).

Tabla 2 | Características principales de la DO Montsant. Información extraída de: ("DO Montsant" 2020; "Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación" 2021).

DO Montsant	
Región	<i>Priorat, Ribera d'Ebre, Tarragona</i>
Producción - Cultivo máximo	12.000 kg / ha (blanco), 10.000 kg / ha (tinto)
Cifras	<ul style="list-style-type: none"> • Pueblos y bodegas: 16 y 53, respectivamente • Superficie de Viña: 1.863,80 ha • Superficie Variedades Tintas: 1.753,20 ha (94%) • Superficie Variedades Blancas: 110,60 ha (6%) • Producción mediana: 7-9 millones de kg • Producción 2018: 7.359.553 kg • Comercialización 2017: 6.226.865 botellas
Consejo Regulador DO Montsant	Plaza Quartera, 6, 43730, Falset, Tarragona Teléfono: +34 977831742 info@domontsant.com www.domontsant.com

3. Proceso de elaboración del vino

La producción de vino es una industria con gran peso económico. En la producción de vino hay diferentes características fundamentales para su calidad, desde factores como la variedad y calidad de la uva, el grado de maduración en el momento de vendimia, añada y climatología, características del suelo, hasta las prácticas vitivinícolas, técnicas de vinificación, procesos de producción y período de envejecimiento (Liu *et al.*, 2019). El proceso de vinificación se basa en la producción de vino (Figura 5), que consta de varias etapas: la cosecha de la uva, la selección de la uva, el estrujado y el prensado de la uva, la maceración y fermentación alcohólica (FAL) o primaria y remontado, el descube y la fermentación maloláctica (FML) o secundaria, la crianza, la estabilización y finalmente, el embotellado (Goold *et al.* 2017).

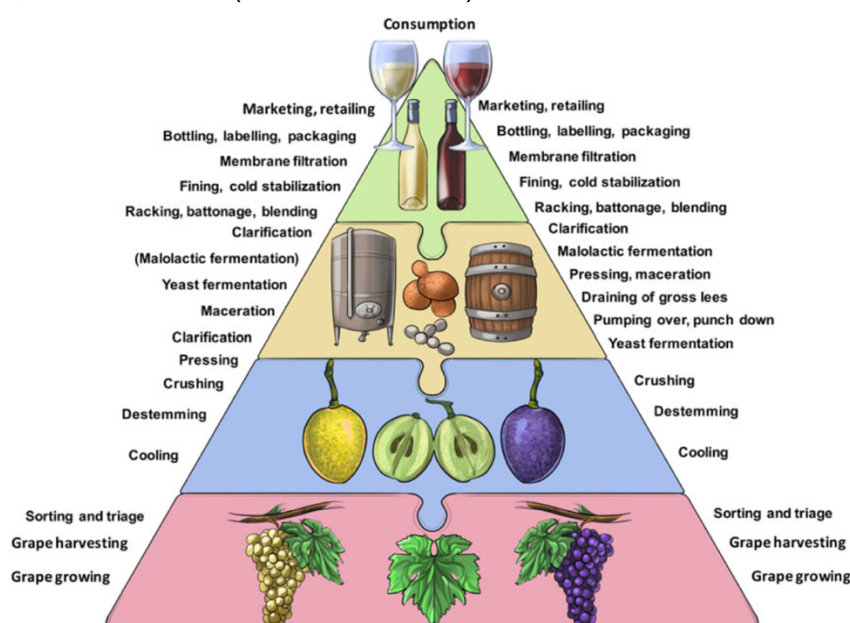


Figura 5 | Esquema con los pasos principales de la producción de vino tinto (derecha) y vino blanco (izquierda). Extraído de: (Goold *et al.* 2017).

4. Evaluación de la madurez de la uva para la vendimia

En concreto, el primer paso de vendimia se caracteriza por cosechar la uva mecánicamente o a mano. En enología, la madurez de la pulpa de la uva se corresponde a una relación óptima azúcar/ácido. Por otra parte, la madurez fenólica se produce cuando los compuestos fenólicos y las sustancias aromáticas alcanzan la concentración máxima. De este modo, se realiza la vendimia cuando la uva está madura (concentración de azúcares alrededor de 180-240 g/L o 18-24°Bx) con el fin de facilitar el proceso de obtención del mosto de la uva, ya que es más fácil separar la pared celular de la piel. La evaluación del estado de madurez de la uva se da atendiendo las siguientes características: nivel de azúcares o Grado Brix (°Bx), acidez titulable (TA) y el pH, principalmente. Aun así, también se pueden tener en cuenta otros factores como

grado alcohólico probable, concentración de compuestos fenólicos, compuestos aromáticos, concentración de nitrógeno, niveles de potasio y otros minerales, contenido de dióxido de azufre y turbidez (Jacobson 2010).

El Grado Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) se define por el contenido de azúcar de una solución acuosa y representa la fuerza de dicha solución como porcentaje en masa (% m/m), siendo 1°Bx un 1% m/m (porcentaje en masa) de sacarosa pura. El Grado Brix depende de la temperatura (variando $0,1^{\circ}\text{Brix}$ por cada 1°C , aproximadamente) y del porcentaje de etanol, y ciertas expresiones relacionan estas magnitudes. El $^{\circ}\text{Bx}$ se puede medir mediante el índice de refracción o bien a través de la densidad, a través de hidrómetro, picnómetro, refractómetro óptico, refractómetro y densímetro digital (como el usado en este estudio (Mettler Toledo) (Jacobson 2010; “Alcoholic Beverage Solution Guide A Collection of Essential Analyses” 2021). El Grado Brix considerado como óptimo para la cosecha depende del tipo de vino y de los intereses de los enólogos y productores, de manera que se consideran óptimos entre $19\text{-}24^{\circ}\text{Brix}$, específicamente $19\text{-}22^{\circ}\text{Bx}$ para los vinos blancos y $22\text{-}24^{\circ}\text{Bx}$ para los vinos tintos. Por otra parte, la acidez total del vino es la suma de todos los ácidos orgánicos, (incluidas sus sales), siendo los principales el ácido tartárico, el málico, y en menor medida el cítrico y succínico. En cambio, la acidez titulable (AT) es la concentración de protones de la acidez total. Sin embargo, a menudo se hace referencia a AT como la acidez total porque comprende la mayor parte de la acidez total. La acidez titulable (AT), volátil (AV) y fija (AF) son parte de la acidez total, y existen diferentes fórmulas y técnicas para determinar sus valores (Jacobson 2010). De este modo, los niveles ideales de AT para evaluar la maduración de la uva, dependen del tipo de vino que se desee producir, situándose la AT entre el 0,60% y el 0,80% para la producción de vino tinto y el 0,65-0,85% en el caso de vinos blancos de mesa tranquilos (Jacobson 2010). En relación con el pH de un vino, este corresponde a la cantidad de iones de hidrógeno (H^+) libres presentes, y que está muy relacionado con los ácidos presentes. Se puede medir el pH del mosto o vino mediante un indicador (como una tira reactiva) o con un pHímetro. Generalmente, los enólogos pretenden que los vinos blancos presenten un pH de 3,1-3,2 (o incluso 3,4) y los vinos tintos entre 3,2 y 3,3 (Jacobson 2010; Joshi *et al.* 2016).

5. “Terroir” microbiano

Un factor clave en este sector son los rasgos y características regionales distintas del vino, en las cuales el microbioma de la uva influye directamente en los aromas fermentativos y por tanto en la calidad final de los vinos. Diversos estudios ecológicos, metabólicos y caracterizaciones sensoriales de vinos producidos sugieren la existencia de un denominado “*terroir*” microbiano. En el estudio llevado a cabo por Bokulich *et al.*

(2016) se demostró que la microbiota autóctona de la uva y el vino está relacionada directamente con la composición química y propiedades del vino, ratificando el hecho que la biodiversidad microbiana (de la uva y vino) propias de cada región puede influir en el *terroir*, considerándose como su huella (*fingerprint*) microbiológica. Por este motivo, la investigación enológica a nivel mundial va encaminada en la elaboración de vinos únicos, preservando su identidad histórica y verificando su calidad y origen geográfico (Amerine y Kunkee 1968; Bokulich *et al.* 2013; Bozoudi y Tsaltas, 2016).

6. Ecología de la fermentación

Tras la obtención del mosto, el siguiente paso en la producción de vino es la fermentación. Durante la vinificación se realizan principalmente dos tipos de fermentaciones que influyen fuertemente en la composición del vino: en primer lugar, la fermentación alcohólica (FAL) en la cual generalmente levaduras convierten los azúcares de la uva en etanol y, en segundo lugar, la fermentación maloláctica (FML), en la cual principalmente bacterias ácido-lácticas (BAL) convierten el ácido málico presente en ácido láctico y dióxido de carbono. Estos complejos procesos metabólicos a veces generan la producción de metabolitos indeseables.

En las uvas se encuentran levaduras (principalmente *Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia* y *Pichia*, en una concentración de $\sim 10^3$ - 10^6 cel/mL antes de la cosecha) y también en menor proporción bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias acéticas y hongos. Las levaduras son los microorganismos mayoritarios involucrados en la conversión del mosto de uva en vino mediante un complejo metabolismo, siendo *Saccharomyces cerevisiae* muy relevante en este proceso. No obstante, hay presentes otros géneros y especies de levaduras en el proceso de vinificación que se conocen en general como no *Saccharomyces*, abarcando alrededor de 150 géneros y 1500 especies de levaduras diferentes (revisado por Andorrà *et al.* 2019). Las levaduras no *Saccharomyces* se denominan autóctonas o silvestres por su presencia en superficies de bayas, racimos de uvas y vides y los géneros principales son *Dekkera/Brettanomyces*, *Candida/Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia Kluyveromyces* o *Lachancea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*. Diversos factores externos, como el clima, geografía, variedad, añada y madurez de la uva, daños físicos o uso de fungicidas entre otros afectan a esta microbiota silvestre de la uva y, a los mostos resultantes (Amerine y Kunkee 1968; revisado por Andorrà *et al.* 2019). La supervivencia de especies no *Saccharomyces* durante el proceso de fermentación está regulada por la producción de etanol como principal producto metabólico de la fermentación alcohólica. Especies como *Hanseniaspora*, *Candida*,

Pichia, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* aisladas de uva y mosto se ha demostrado que son sensibles a concentraciones elevadas de etanol (superiores al 5-7%). Por este motivo, el incremento de etanol a lo largo de la fermentación se ha sugerido como posible razón del declive y muerte de estas levaduras no *Saccharomyces*. Por otro lado, algunos de los microorganismos autóctonos sobreviven y esto es debido a su mejor adaptación a las condiciones ambientales de la zona vitivinícola, y a la bodega donde se elabora el vino (Amerine *et al.* 1982, Bokulich *et al.* 2016; Liu *et al.* 2019; Andorrà *et al.* 2019). En general, las especies no *Saccharomyces* son capaces de colonizar mostos no inoculados y de iniciar la FAL a pesar de tener una baja actividad de fermentación y una baja resistencia al SO₂, proliferando hasta alcanzar el máximo de 10⁶-10⁷ cel/mL a mitad de la fermentación. Adicionalmente, las levaduras no *Saccharomyces* son importantes para la complejidad del aroma del vino debido a sus actividades enzimáticas (por ejemplo, proteasas, β-glucosidasas, esterasas, pectinasas y lipasas) y por incrementar la producción de ésteres. Asimismo, las fermentaciones mixtas con levaduras no *Saccharomyces* y *S. cerevisiae* aumentan la formación de ésteres con un impacto sensorial positivo. No obstante, *S. cerevisiae* se encuentra en concentraciones bajas en las uvas, pero su población crece a lo largo de la fermentación, alcanzando poblaciones de ≥ 10⁷-10⁸ cel/mL. *S. cerevisiae* es mayoritariamente la levadura dominante a medida que avanzan las fermentaciones e incrementan sus productos, debido a su alta tolerancia al etanol y a otros productos metabólicos de la fermentación, a su alta capacidad para fermentar azúcares, y para competir con otras especies y colonizar el medio del vino (Amerine *et al.* 1982; Mills *et al.* 2007; Andorrà *et al.* 2010; Andorrà *et al.* 2019).

La inoculación de cepas autóctonas es de reciente interés con el fin de evitar fermentaciones lentas y/o paradas de fermentación, así como evitar la producción de metabolitos indeseables. Debido a esto y al obvio incremento de la diversidad microbiana, se ha observado que la inoculación de cepas autóctonas potencia el carácter del vino (Fleet y Heard 1993; revisado por Andorrà *et al.* 2019). Los microorganismos inherentes u autóctonos, también conocidos como microbioma de la uva, comprenden un conjunto diverso de hongos, levaduras y bacterias, con un papel coordinado y fundamental para el proceso de producción del vino, siendo clave en la composición y calidad de este. Sin embargo, no solamente los microorganismos afectan a las características del vino, sino que las comunidades microbianas también responden a las condiciones locales y se ven alteradas según la fase y las condiciones del proceso de producción del vino (Fleet y Heard 1993; Liu *et al.* 2019). El proceso de elaboración del vino puede producirse mediante fermentación espontánea (sin añadir

microorganismos) o bien, impulsada por cultivos iniciadores (*starters*) de cepas específicas, comerciales o silvestres (Querol *et al.* 1992a). Aunque las fermentaciones espontáneas se han definido como impredecibles, varios estudios han demostrado sus efectos positivos sobre la complejidad organoléptica del vino como consecuencia del crecimiento de una gran biodiversidad de especies y/o cepas (Bokulich *et al.* 2016; Andorrà *et al.* 2019; Binati *et al.* 2020). Por otro lado, se usan cultivos iniciadores comerciales para potenciar una fermentación reproducible, controlada y predecible, aunque estudios han demostrado que estas condiciones conducen a vinos menos complejos. Asimismo, la inoculación del mosto con ciertos microorganismos conduce a una reducción en la diversidad y presencia de especies autóctonas, siendo uno de los objetivos de ciertos productores con el fin de disminuir en general levaduras no-*Saccharomyces* (Bokulich *et al.* 2016; revisado por Andorrà *et al.* 2019; Liu *et al.* 2019; Binati *et al.* 2020).

7. Identificación de levaduras

En este trabajo se han estudiado las levaduras silvestres presentes en mosto de uva de la variedad Cariñena y Garnacha de DO Montsant de la vendimia 2019, responsables de la FAL espontánea. Para ello, se han identificado las levaduras a nivel de especie mediante la técnica de análisis de restricción del amplificado de la zona ITS-5,8S del rDNA (PCR-RFLP rDNA) (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). El principio de la técnica PCR-RFLP rDNA se basa en la amplificación del gen 5,8S del rDNA, zona altamente conservada, junto con las regiones ITS1 y ITS2, las cuales presentan gran variabilidad genética entre diferentes especies. Los productos de la PCR presentan en general idénticos patrones entre cepas de la misma especie y género. Una vez realizada la amplificación, se realiza la digestión con enzimas de restricción (como *Hinfl*, *Ddel*, *HaeIII*, *CfoI* o *MboI*) para identificar las diferencias en los patrones de los amplificados de la PCR entre las especies. Esta técnica se ha usado ampliamente para identificar más de 145 especies de levaduras, y de más de 26 géneros (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999; Zanol *et al.* 2010).

Otras técnicas habituales para identificar levaduras a nivel de especie son: la amplificación por PCR de la región D1/D2 del gen 26S rDNA y su posterior secuenciación. Al secuenciar esta zona si dos secuencias difieren en más del 1% se consideran especies diferentes y en cambio si difieren en menos del 1% serán cepas de la misma especie (Kurtzman y Robnett 1998; Baleiras Couto *et al.* 2005). También hay otros métodos moleculares de identificación de levaduras como el DGGE/TGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) y Temperature Gradient Gel

Electrophoresis (TGGE)) entre otros, demostradas todas por ser capaces de detectar diferentes especies fúngicas y de levaduras (Ivey y Phister 2011).

Las levaduras se han identificado a nivel de cepa mediante PCR de los elementos δ . Las secuencias delta (δ) son elementos de 334 pb que flanquean retrotransposones TY1 y TY2 dispersos en el genoma de *S. cerevisiae*. La ubicación y el número de dichos elementos se ha demostrado que presenta cierta variabilidad intraespecífica, de manera que lo convierte en una herramienta genética para la tipificación de *S. cerevisiae*. La amplificación de estas regiones interdelta mediante PCR fue reportada en primer lugar en 1993 por Ness *et al.* (1993), quienes observaron que los productos eran de diferente longitud y cepa específicos. Ness *et al.* (1993) aplicaron este método barato, rápido, y fácil mediante PCR con los primers $\delta 1$ y $\delta 2$. Sin embargo, el protocolo se ha modificado en los últimos años, como por ejemplo usando los primers $\delta 12$ y $\delta 21$ (el aplicado en este trabajo y reportado por Legras *et al.* (2003)) o con los primers $\delta 12$ - $\delta 21$ o $\delta 12$ - $\delta 2$, los cuales presentan mayor poder discriminatorio de cepas de *S. cerevisiae* diferentes (Legras *et al.* 2005). Otras técnicas habituales para identificar levaduras a nivel de cepa son: RFLP del DNA mitocondrial (mtDNA) o genotipado de microsatélites. El DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae* tiene un tamaño de 65-80 Kb, y presenta elevado grado de polimorfismo, lo cual permite evaluar específicamente la variabilidad de cepas de dicha especie (Guillamón *et al.* 1994, Schuller *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2006). Los microsatélites son secuencias que se pueden encontrar en regiones codificantes y no codificantes en el genoma de levaduras y estos marcadores son *loci* polimórficos que permiten tipificar cepas de la misma especie, como en el caso de *S. cerevisiae* (Legras *et al.* 2005).

8. Proyecto PECT

Este trabajo de final de grado de Biotecnología se basa en el proyecto PECT ("PRIORAT-MONTSANT-SIURANA, paisaje agrícola de la montaña mediterránea, (2016-2020)". El PECT es un proyecto de investigación e innovación cuyo objetivo principal es potenciar un modelo de desarrollo de la comarca del Priorat integrando el desarrollo económico y la gestión sostenible del paisaje y de los recursos agrícolas y culturales de dicha comarca. En concreto, VITEC lleva a cabo las tareas de preservación de la biodiversidad e innovación vitivinícola del Priorat. En mi caso, he llevado a cabo una parte de este proyecto, ya que he evaluado muestras de vino DO Montsant de la cosecha del 2019 en diferentes momentos de la vendimia y según la variedad de dos tipos uva (Cariñena y Garnacha) de esta región.

8. HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVO/S

La hipótesis de este trabajo es que las levaduras autóctonas *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces* presentes en la variedad de uva Garnacha y Cariñena de la DO Montsant presentan un carácter y una capacidad fermentativa equiparable a las levaduras comerciales.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Aislar e identificar levaduras autóctonas presentes en uva de la variedad cariñena y garnacha de la DO Montsant a nivel de especie, atendiendo al momento de vendimia y al momento de la fermentación alcohólica
- Tipificar las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y caracterizar su capacidad fermentativa mediante fermentación a escala laboratorio, también atendiendo al momento de vendimia y al momento de la fermentación alcohólica

9. METODOLOGÍA

En diferentes apartados del presente trabajo se usa la nomenclatura CAR/GAR_AMO/MO/DMO_INI/MIT/FIN_Nº, para referirse a las muestras correspondientes: primero a la variedad de uva (Cariñena o Garnacha), en segundo lugar, al momento óptimo de vendimia de obtención de muestra (antes, durante o después del momento óptimo), después, punto de la FAL de obtención de muestra (inicio, mitad o final), y el Nº corresponde al número de las 24 colonias obtenidas.

1. *Aislamiento de levaduras autóctonas en uva Cariñena y Garnacha de DO Montsant*

Para estudiar las levaduras autóctonas en uva de la variedad Cariñena y Garnacha de la DO Montsant, se realizó la vendimia durante los meses de septiembre y octubre del 2019, atendiendo a las condiciones climáticas, madurez fenólica de la uva, añada, entre otros. El equipo de bodega y microbiología de VITEC se encargó de realizar la vendimia y la obtención de las muestras para continuar con el estudio, respectivamente. Las muestras se dividieron en tres puntos: antes del momento óptimo de vendimia (AMO; recolección e inicio de la FAL en 03/09/2019), momento óptimo de vendimia (MO; 20/09/2019) y después del momento óptimo de vendimia (DMO; 21/10/2019). El momento óptimo es el tiempo determinado por el viticultor para vendimiarse, teniendo en cuenta los factores anteriormente comentados y en especial, analizando la densidad y azúcares. Primero, se seleccionaron en el viñedo unos 100 granos de uva de cada variedad de la forma más aséptica posible y se guardaron en bolsas asépticas. A continuación, dentro de la misma bolsa, se prensaron las uvas hasta obtener entre 0,5

y 1L de mosto. Entonces, se añadió el mosto en botellas estériles y se pusieron a 25°C para realizar la fermentación alcohólica espontánea. Diariamente, se extraía una muestra para realizar el seguimiento de las fermentaciones espontáneas a 25°C. De este modo, se determinaba la densidad y temperatura (con ayuda del densímetro *Mettler Toledo*), el recuento de levaduras totales (en el microscopio óptico mediante la cámara *Thoma 0,1 mm Vidrafoc S.A.*), recuento en placa de levaduras viables (siembra de 100 µL de la dilución correspondiente en YPD sólido (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura y 2% de agar) e incubación a 27°C) y la concentración de azúcares. Este proceso no se realizó por triplicado, ya que no se disponía de suficientes uvas para ello. De este modo, se fermenta el mosto y se recogen muestras al inicio, mitad y final de la FAL. A partir de la evaluación de los parámetros anteriores, se sembraron para cada momento de la FAL 100 µL de mosto en placas con medio YPD y se incubaron 48 horas a 27°C. A continuación, se aislaron 24 colonias y se inocularon en 5 mL de medio YPD líquido. Los tubos inoculados se incubaron en agitación a 27°C durante 24h. Por un lado, se añadió 1 mL de los tubos inoculados en eppendorfs una vez transcurrido este tiempo, y se centrifugó (10 minutos a 12.000 rpm). Se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet para la posterior extracción de DNA (9.2.1. Extracción de DNA). Paralelamente, se extrajeron 900 µL del medio inoculado (tubos incubados 24h a 27°C), se añadieron en nuevos eppendorfs y se añadieron 500 µL de glicerol, y se almacenaron a -80°C.

2. Identificación de las levaduras a nivel de especie

2.1. Extracción de DNA

Se realizó la extracción del DNA a partir del pellet obtenido en el punto 9.1 y almacenado en el congelador a -20°C (Figura 6). Para ello, se siguió el protocolo descrito por Querol *et al.* (1992b).

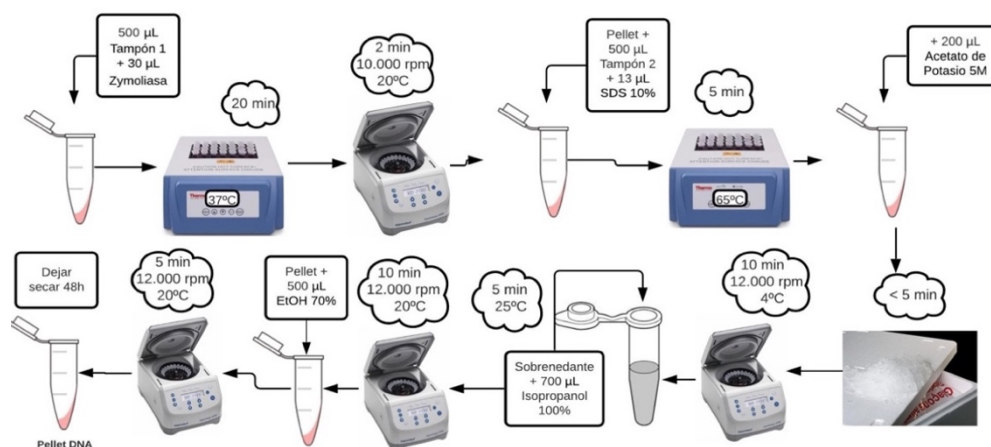


Figura 6 | Esquema del procedimiento de extracción de DNA llevado a cabo en este estudio (Querol *et al.* 1992).

2.2. Amplificación de la región ITS-5,8S del rRNA

A partir del DNA extraído, se realiza la identificación de levaduras a nivel de especie mediante la técnica PCR-RFLP del rRNA ITS-5,8S. Para ello, la amplificación del DNA se realizó con *MyCycler Thermal Cycle M006* de *BioRad Laboratories S.A* (Hércules, California, Estados Unidos) (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). La Tabla 3 recoge los reactivos de *Bioline* (Londres, Reino Unido) y las concentraciones usadas en el mix de esta PCR. La secuencia de los primers ITS1 e ITS4 que se utilizaron en este procedimiento se detallan en la Tabla 4. El programa aplicado en el termociclador *MyCycler Thermal Cycle* para llevar a cabo esta PCR se especifica en la Figura 7.

Tabla 3 | Reactivos y concentraciones del mix de la PCR para identificar levaduras a nivel de especie.

	Reaction Buffer NH₄	MgCl₂	Primer ITS1	Primer ITS4	dNTP	TAQ Polimerasa
Concentración	1X	2,5 mM	0,2 µM	0,2 µM	0,8 mM	0,02 U/µL

Tabla 4 | Secuencia de los primers usados en la PCR para identificar levaduras a nivel de especie (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

	PRIMER	
	ITS1	ITS4
Secuencia	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

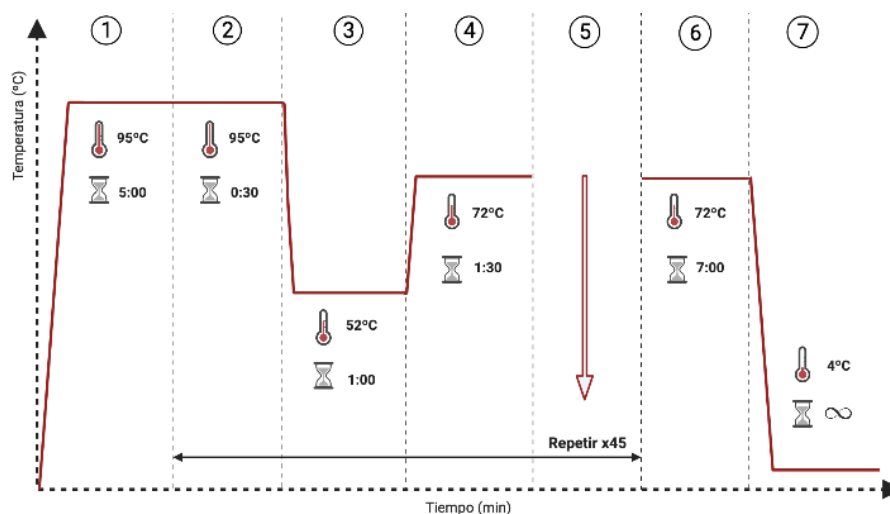


Figura 7 | Programa de los ciclos de la PCR ITS-5,8S del rRNA. Paso 5: repetición de los pasos 2-4, por 45 veces.

Una vez obtenidos los productos de la amplificación mediante el termociclador, se observaron los resultados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,6% (p/v). Para ello se emplearon los siguientes reactivos: agarosa, tampón TBE 1X (pH 8) (cuya composición era TRIS 0,089M, ácido bórico 0,089M y EDTA 0,002M), *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20.000X)* (*LaboTaq*, Sevilla, España), Tampón de carga (Blue), y Marcador de peso molecular *Hyperladder 100bp* (*Bioline*, Londres, Reino Unido). Se visualizaron los geles de agarosa de la electroforesis en el transiluminador Gel Doc™ XR (*Bio-Rad Laboratories*, Hércules, California, EE. UU.).

2.3. Digestión del amplificado mediante enzimas de restricción

En la digestión enzimática, se empleó el mix con los siguientes reactivos: H₂O MiliQ estéril, Buffer R 10X, enzima de restricción *Hinfl* y/o *Ddel* (10 U/μL) de *ThermoFisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, EE. UU.). La digestión se realizaba mezclando el DNA amplificado mediante la PCR con el mix de la digestión, e incubando las muestras a 37°C *overnight*. Finalmente, se visualiza el resultado de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v). El procedimiento realizado para la visualización del resultado de la digestión es el mismo que en el caso de la amplificación de la PCR, excepto por el porcentaje de agarosa.

Para confirmar la especie de levaduras aisladas se enviaron a secuenciar las muestras de DNA amplificadas mediante la PCR-RFLP del ITS-5,8S del rRNA (con primers ITS1 e ITS4) a la empresa *Macrogen Spain* (Madrid, España). Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, se realiza un BLAST de cada una de ellas mediante la base de datos *NCBI GenBank*, con el fin de realizar un alineamiento de la secuencia y obtener el resultado con el porcentaje de similitud.

3. Tipificación de *S. cerevisiae*

Una vez identificadas las especies de levaduras aisladas, se tipificaron las muestras de la especie *S. cerevisiae*. Con este fin, se realiza la cuantificación y análisis del DNA de las muestras de *S. cerevisiae* de los diferentes puntos de la FAL, de los diferentes momentos de vendimia, mediante la técnica BioDrop μLite de *Isogen Life Science*, (Servicios Hospitalarios S.L, Barcelona). Se realizan las diluciones oportunas para obtener una concentración de DNA de 1-50 μg/mL para poder amplificar las muestras mediante la PCR de los elementos delta (primers δ12 y δ21) (Legras y Karst 2003).

La Tabla 5 recoge los reactivos de *Bioline* (Londres, Reino Unido) y las concentraciones usadas en el mix de la PCR. La secuencia de los primers δ12 y δ21 que se utilizaron en este procedimiento se detallan en la Tabla 6. El programa realizado en el termociclador *MyCycler Thermal Cycle* para llevar a cabo la PCR se especifica en la Figura 8.

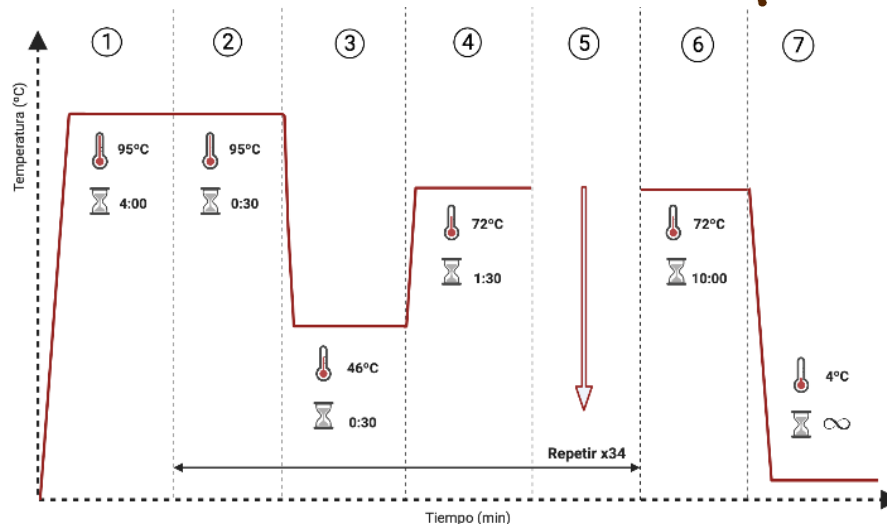
Tabla 5 | Reactivos y concentraciones del mix de la PCR para la tipificación de especie de *Saccharomyces cerevisiae*.

	<i>Reaction Buffer NH₄</i>	MgCl ₂	Primer δ12	Primer δ21	dNTP	TAQ Polimerasa	BSA
Concentración	1X	2,5 mM	1 μM	1 μM	0,2 mM	0,02 U/μL	0,2 mg/mL

Tabla 6 | Secuencia de los primers usados en la PCR para la tipificación de especie de *Saccharomyces cerevisiae* (Legras y Karst 2003).

PRIMER		
	δ12	δ21
Secuencia	5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'	5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'

Figura 8 | Programa de los ciclos de la PCR de los elementos delta con los primers $\delta 12$ y $\delta 21$. Paso 5: repetición de los pasos 2-4, por 45 veces.



Se observan los resultados de la amplificación de las muestras de DNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,6%, según el procedimiento detallado en los apartados anteriores. Sin embargo, en este caso se usó el marcador de peso molecular *HyperLadder 1Kb* (BioLine, Londres, Reino Unido), en vez de *HyperLadder 100bp* (BioLine, Londres, Reino Unido).

4. Caracterización de la capacidad fermentativa de las cepas de *S. cerevisiae*

Se realizaron microfermentaciones a escala laboratorio para evaluar la capacidad fermentativa de 16 cepas diferentes de *S. cerevisiae* aisladas de muestras de Cariñena y 7 de Garnacha (3 muestras identificadas como *S. cerevisiae* (GAR_MO_FIN.1_2, GAR_MO_FIN.2_3 y GAR_DMO_FIN_13) y 4 muestras identificadas como híbrido *S. bayanus x S. cerevisiae* (GAR_DMO_MIT_7, GAR_DMO_MIT_9, GAR_DMO_MIT_14 y GAR_DMO_MIT_20). Dichas microfermentaciones se realizaron por duplicado y siguiendo el mismo protocolo en ambos casos, pero ajustando el grado Brix del mosto según cada tipo de variedad. Con este objetivo, se partió de mosto concentrado tinto estéril con un grado Brix de 65-69°, suministrado en latas herméticas por Concentrats Pallejà S.L. (Riudoms, Tarragona, España). A continuación, se vertió el mosto en botellas de 5L estériles, se determinó la densidad y se añadió agua destilada estéril hasta obtener un mosto con un grado Brix de 23,6°Bx y GAP de 13,70% para las microfermentaciones de Cariñena y de 27,0°Bx y GAP de 16,00% para las de Garnacha. Paralelamente, se inoculan en tubos con 10 mL de medio YPD líquido, 100 μ L de cada cepa diferente de *S. cerevisiae*. Se incuban los tubos durante 24-48h a 27°C y una vez transcurrido ese tiempo, se realiza un recuento de levaduras totales en el microscopio óptico mediante la cámara Thoma. Según la concentración de levaduras totales de cada muestra, se calcula el volumen de muestra a inocular para un volumen de 250 mL de mosto y una concentración inicial de $1,5 \cdot 10^6$ cel/mL. Debido a que en algunas muestras la concentración de levaduras totales era inferior a la esperada, se inoculó muestra en

Erlenmeyers con 200 mL de mosto, y en algún caso, resultando en una concentración final de $1,0 \cdot 10^6$ cel/mL en vez de $1,5 \cdot 10^6$ cel/mL (Tabla 12 detallada en el Anexo 3). El día de la inoculación del mosto es considerado el día 0 de la FAL a escala laboratorio. El departamento de química de VITEC realiza un análisis de los compuestos químicos básicos (explicado en el apartado 9.5. Caracterización y análisis químico) tanto del mosto estéril como del mosto recién inoculado el día 0. Se realiza el seguimiento de la fermentación analizando a diferentes tiempos la densidad, la temperatura, recuento de las levaduras totales y viables. Cabe destacar que el primer día se siembra 1 mL de mosto estéril en una placa con medio YPD sólido y se deja incubando durante 24/48h para comprobar su esterilidad. Debido a que 3 de las 16 microfermentaciones sembradas con levadura extraída de las muestras de variedad de uva Cariñena no avanzaron adecuadamente, se repitieron por segunda vez. Se evaluó la evolución de las fermentaciones, y cuando la densidad era inferior a 1.000 g/L, se entregó una muestra al laboratorio de química de VITEC para conocer la concentración de azúcares. La FAL se dio por finalizada cuando la concentración de azúcares era inferior a 2,00 g/L. Entonces, se entregaron 50 mL del vino al departamento de química de VITEC para realizar un análisis de los compuestos químicos básicos.

5. Caracterización y análisis químico

El departamento de química de VITEC realizó un análisis de los compuestos químicos en el mosto inicial y el vino final (obtenido al finalizar la FAL) aunque algunos de los parámetros determinados en cada caso han sido diferentes. En el caso del mosto, se determinaron los siguientes parámetros: ácido L-málico (g/L), °Brix, grado alcohólico probable % (v/v), acidez total tartárica (g/L), pH, masa volúmica (g/cm^3), Nitrógeno Amino Primario (NAP) (mg/L), concentración de amonio (mg/L) y Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) (mg/L). En cambio, en el análisis químico del vino final se determinaron los siguientes parámetros inherentes: determinación de azúcares totales (D-glucosa y D-fructosa), grado Brix, Grado Alcohólico Potencial (GAP), densidad, ácido L-málico (g/L), ácido L-láctico (g/L), concentración de dióxido de azufre libre (mg/L), grado alcohólico (%volumen/volumen), acidez volátil (g/L), Acidez Total Tartárica (ATT) (g/L), pH, y glicerol (g/L)).

Mediante el método enzimático o colorimétrico con el uso del analizador automático *Random Access Analyzer Y15* junto con los kits enzimáticos de BioSystems SA (Barcelona, España), se realizó la determinación de azúcares totales (D-glucosa y D-fructosa), NAP (Nitrógeno Amínico Probable), amonio (NH_4^+), glicerol, ácido L-málico, y L-láctico, Dióxido de Azufre (SO_2) Libre. La densidad se determinó con el densímetro

Densito™ 30px (Mettler Toledo, Columbus, EE.UU.). El NFA se calculó mediante la fórmula 1.

$$\text{NFA} = ([\text{NH}_4^+] \times 0,78) + \text{NAP} \quad (1)$$

El grado Brix, grado alcohólico, pH, ATT y acidez volátil se determinaron mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) con 1 equipo WineScan FT120 (Foss Eléctrico, Barcelona, España) (“OIV” 2021).

6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el Software Estadístico XLSTAT *Statistical Analysis add-in* de Excel. Se realizó un análisis unidireccional de variancia (ANOVA), seguido del test Tukey (HSD) y de la prueba sobre la normalidad de los residuos mediante Shapiro-Wilk. Para todos los tests, se consideró un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación a nivel de especie de las levaduras aisladas

Se realizó la identificación de 289 colonias mediante la técnica de PCR-RFLP del ITS-5,8S rDNA (Tabla 7 y Figura 9).

Tabla 7 | Resumen de las especies identificadas, el número de colonias, tamaño de los productos de las PCRs (ITS, elementos delta y digestión enzimática) y el porcentaje de homología al realizar el BLAST a partir de la secuencia.

Nombre muestra	Especie	Nº de colonia	% Homología	Tamaño productos PCR (bp) Perfil ITS1-4	Digestión enzimática	
					Tamaño fragmento restricción Perfil	Enzima restricción
CAR_AMO_INI	<i>A. pullulans</i>	1-16, 19-24	99,61%	600 pb	290, 180, 120	<i>Hinfl</i>
	<i>S. cerevisiae</i>	17, 18	93,38%	880 pb	380, 290, 180, 120	
CAR_AMO_MIT	<i>H. uvarum</i>	1-15, 17-24	98,74%	760 pb	290, 170, 160, 90, 70, 20	<i>Hinfl</i>
CAR_AMO_FIN	<i>T. delbrueckii</i>	3-14, 16, 17, 20-23	96,00%	800 pb	410, 390	<i>Hinfl</i>
CAR_MO_INI	<i>Aurebasidium sp.</i>	1-6, 8-13, 15 (n=16 en este caso)	99,42%	600 pb	280, 180, 140	<i>Hinfl</i>
	<i>H. uvarum</i>	16	99,51%	760 pb	290, 170, 160, 90, 70, 20	
CAR_MO_MIT	<i>H. opuntiae</i>	1-6, 9-24	98,30%	780 pb	350, 190, 160, 50	<i>Hinfl</i>
	<i>H. uvarum</i>	8	98,18%	760 pb	360, 170, 90, 50	
CAR_MO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1,5, 7, 13, 14, 16, 17, 24	88,00%	880 pb	290, 170, 160, 90, 70, 20	<i>Hinfl</i>
	<i>H. opuntiae</i>	2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 19-22	99,00%	780 pb	290, 170, 90, 70, 20	
					350, 190, 160, 50	<i>Hinfl</i>
					780, 550, 360, 160, 120, 90, 50	<i>Ddel</i>

CAR_DMO_INI	<i>H. uvarum</i>	1-6, 8, 10-24	96,21%	760 pb	290, 170, 160, 90, 70, 20	<i>Hinfl</i>
					290, 170, 90, 70, 20	<i>Ddel</i>
	<i>C. zemplinina</i>	7, 9	99,49%	480 pb	220	<i>Hinfl</i>
CAR_DMO_MEI	<i>H. uvarum</i>	2-15, 20, 22	97,00%	760 pb	290, 170, 160, 90, 70, 20	<i>Ddel</i>
	<i>H. opuntiae</i>	21	98,00%	780 pb	390, 170, 100	
CAR_DMO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	-	880 bp	-	
GAR_AMO_INI	<i>Aurebasidium sp.</i>	1-4, 6-12, 14-24	99,81%	590 pb	280, 180, 140	
	<i>C. pallidicorallinum</i>	5, 13	98,79%	600 pb	280, 160, 110, 80	<i>Hinfl</i>
GAR_MO_INI	<i>Aurebasidium sp.</i>	1-12, 14, 15 (n=15)	-	590 pb	280, 180, 140	<i>Hinfl</i>
GAR_MO_MEI	<i>T. delbrueckii</i>	1-5, 7-18, 20-24	95,95%	800 pb	410, 390	<i>Hinfl</i>
GAR_MO_FIN.1	<i>T. delbrueckii</i>	1-24	89,00%	800 pb	410, 390	<i>Hinfl</i>
GAR_MO_FIN.2	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	-	880 bp	-	
GAR_DMO_INI	<i>H. uvarum</i>	2-15, 20, 22	97,00%	760 pb	350, 190, 160, 50	<i>Hinfl</i>
					290, 170, 160, 90, 70, 20	<i>Ddel</i>
	<i>C. zemplinina</i>	3, 4, 6-9, 12, 16, 17, 21, 22, 24	98,63%	490 pb	240	<i>Hinfl</i>
GAR_DMO_MEI	<i>Hanseniaspora sp.</i>	1, 3-5, 8, 10, 11, 15, 16, 18, 19, 22	93,00%	780 pb	340, 190, 170, 50	<i>Hinfl</i>
					290, 170, 90, 70, 50	<i>Ddel</i>
GAR_DMO_MEI	<i>S. bayanus x S. cerevisiae</i>	2, 7, 8, 14, 17, 20	98,00%	800 pb,	360, 190, 170	<i>Hinfl</i>
	<i>C. zemplinina</i>	21	-	480 pb	240	<i>Hinfl</i>
GAR_DMO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	-	880 bp	-	

Tabla 8 | Resumen de las cepas de *S. cerevisiae* identificadas, el número de colonias, tamaño de los productos de las PCRs (elementos delta y digestión enzimática) y el porcentaje de homología al realizar el BLAST a partir de la secuencia.

Nombre muestra	Especie	Nº de colonia	% Homología	Tamaño productos PCR elementos delta (bp) Perfil	Digestión enzimática	
					Tamaño fragmento restricción Perfil	Enzima de restricción
CAR_AMO_INI	<i>S. cerevisiae</i>	17, 18	93,38%	880 pb	380, 290, 180, 120	<i>Hinfl</i>
CAR_MO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1,5, 7, 13, 14, 16, 17, 24	88,00%	880 pb	360, 120	<i>Hinfl</i>
CAR_DMO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	-	880 bp	Perfil PCR Delta: 16 perfiles diferentes	
GAR_MO_FIN.2	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	PCR delta	880 bp	Perfil PCR Delta: 1 perfil diferente (350, 210, 180, 100, 90, 70, 50 pb)	
GAR_DMO_MEI	<i>S. bayanus x S. cerevisiae</i>	2, 7, 8, 14, 17, 20	98,00%	800 pb, 5 perfiles diferentes en la PCR Delta (colonias 7, 9, 14, 17, 20)	360, 190, 170	<i>Hinfl</i>
GAR_DMO_FIN	<i>S. cerevisiae</i>	1-24	PCR delta	880 bp	Perfil PCR Delta: 1 perfil diferente (800, 720, 380, 320, 280, 260, 190, 60, 40 pb)	

En la Figura 9 se muestra el porcentaje de abundancia de las diferentes especies de levaduras identificadas en las muestras de Cariñena y Garnacha DO Montsant 2019.

Se han identificado un total de 302 colonias de levaduras, de las cuales *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura mayoritaria, con un 28,03%.

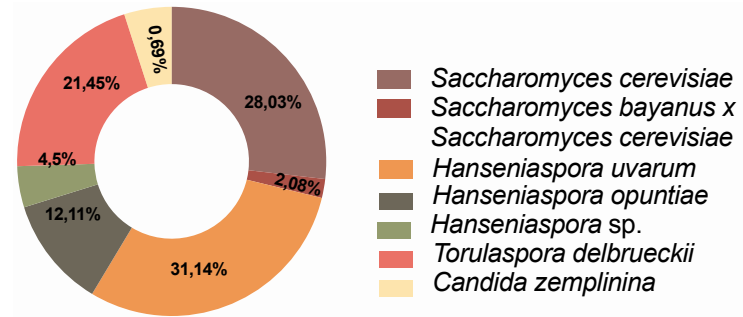


Figura 9 | Abundancia de la diversidad de especies de levaduras identificadas en las variedades de uva Cariñena y Garnacha DO Montsant 2019.

La identificación a nivel de especie de las levaduras aisladas se basó en los resultados obtenidos por Guillamón *et al.* (1998) y Esteve-Zaroso *et al.* (1999).

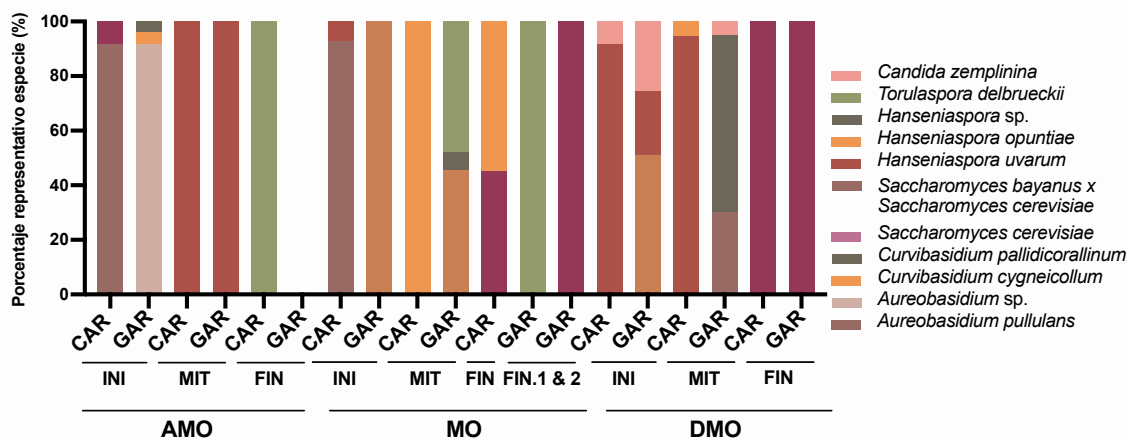


Figura 10 | Diversidad de especies identificadas en las muestras de variedad de uva Cariñena y Garnacha según el momento de vendimia para la obtención de muestra. Tanto GAR_AMO_INI como GAR_AMO_MIT no presentan resultados porque no se recogieron muestras en la vendimia para estos momentos.

Por un lado, en la FAL espontánea de Cariñena se identificaron 6 especies de microorganismos diferentes (Figura 11 y 12), de las cuales 5 eran levaduras y 1 era fúngica (*Aureobasidium pullulans*). Las especies de levaduras diferentes identificadas en estas muestras son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspora delbrueckii*, y *Candida zemplinina*.

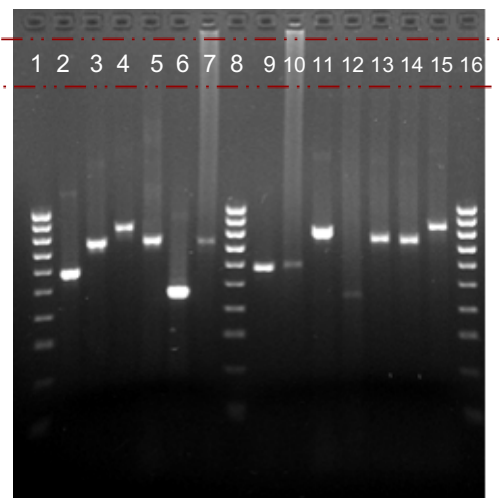


Figura 11 | Amplificación de la región ITS-5,8S rDNA de las muestras de Cariñena (carriles 2-7) y Garnacha (carriles 9-14). Carriles: 1, 8 y 16 Hyperladder 100 bp, 2. CAR_AMO_INI_20, 3. CAR_MO_MIT_4, 4. CAR_MO_FIN_17, 5. CAR_AMO_MIT_6, 6. CAR_DMO_INI_7, 7. CAR_AMO_FIN_6, 9. AMO-GAR-INI-4, 10. GA_AMO_INI_13, 11. GAR_MO_MIT_4, 12. GAR_DMO_INI_6, 13. GAR_DMO_INI_2, 14. GAR_DMO_MIT_9, 15. GAR_MO_Fi.2_3.

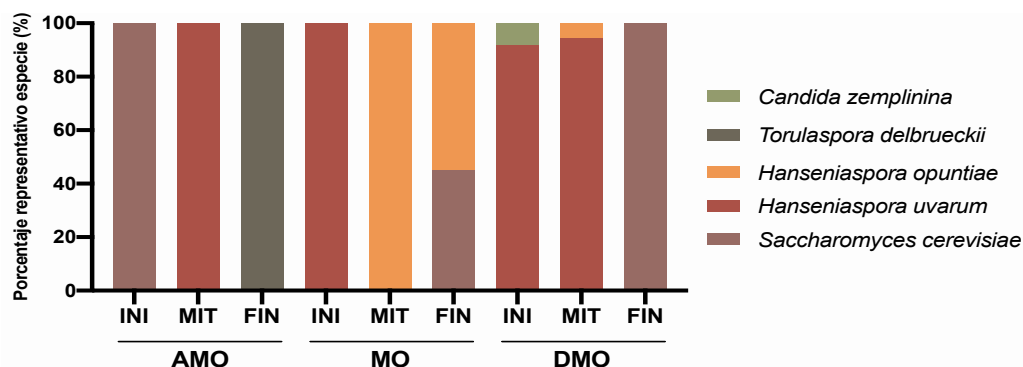


Figura 12 | Biodiversidad de especies detectadas en las muestras de uva de la variedad Cariñena. Se representa el porcentaje de abundancia de cada especie según cada momento y tiempo de la FAL.

Tal y como se observa en la Figura 12, la biodiversidad de levaduras autóctonas presentes en uva Cariñena cambia según el momento óptimo de la vendimia. El género de levadura más abundante, en las muestras de uva de la variedad Cariñena es *Hanseniaspora*. En concreto, antes del momento óptimo de vendimia *H. uvarum* y *T. delbrueckii* son las especies mayoritarias, con un 53,49% y 41,86%, respectivamente, respecto al total de especies identificadas en este momento de vendimia. Es decir, de las 43 colonias de levaduras identificadas en AMO, el 53,49% pertenece a la especie *H. uvarum*, el 41,86%, a *T. delbrueckii* y el 4,65% restante a *S. cerevisiae*. En la Figura 12 se representa el porcentaje de cada especie respecto al total de colonias de levaduras identificadas para un momento óptimo de vendimia y tiempo de FAL, por ejemplo, de *S. cerevisiae* se han identificado 2 colonias en AMO, Inicio de la FAL, siendo el 100% para CAR_AMO_INICIO y representando el 4,65% para antes del momento de vendimia, ya que corresponde a 2 colonias de las 43 de levaduras identificadas para CAR_AMO. De esta forma se han calculado los resultados que también vienen a continuación. Por otra parte, *H. opuntiae* es la especie más abundante en el momento óptimo de vendimia con un 77,27%, seguida de *S. cerevisiae* con un 20,46%. Los resultados de después del momento óptimo de vendimia muestran que la especie mayoritaria es también *H. uvarum* con un 59,09% en dicho momento, seguida de *S. cerevisiae* con un 36,36%. Al analizar el factor tiempo de la FAL espontánea, también se observan cambios destacables en la biodiversidad de levaduras autóctonas en esta variedad (Figura 12). Específicamente, *H. uvarum* es la levadura más abundante en el inicio y mitad de la FAL, con un 85,19% y un 62,50% respectivamente. La segunda especie de levadura más abundante en el inicio de la FAL es *S. cerevisiae* y *C. zemplinina*, ambas especies con un 7,41% de abundancia. La segunda especie de levadura más abundante en la mitad de la FAL es *H. opuntiae* con un 37,50%. Sin embargo, la levadura más abundante en el final de la FAL es *S. cerevisiae* (53,23%), seguida de *T. delbrueckii* (29,03%) y *H. opuntiae* (17,74%), Por otro lado, en la FAL espontánea de la Garnacha se identificaron

10 especies de microorganismos diferentes (Figura 13), de las cuales 7 eran levaduras, y 3 eran fúngicas (*Aureobasidium sp.*, *Curvibasidium cygneicollum* y *Curvibasidium pallidicorallinum*). Las especies de levaduras diferentes identificadas en Garnacha son: *Hanseniaspora sp.*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus x Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Candida zemplinina* (Figura 13).

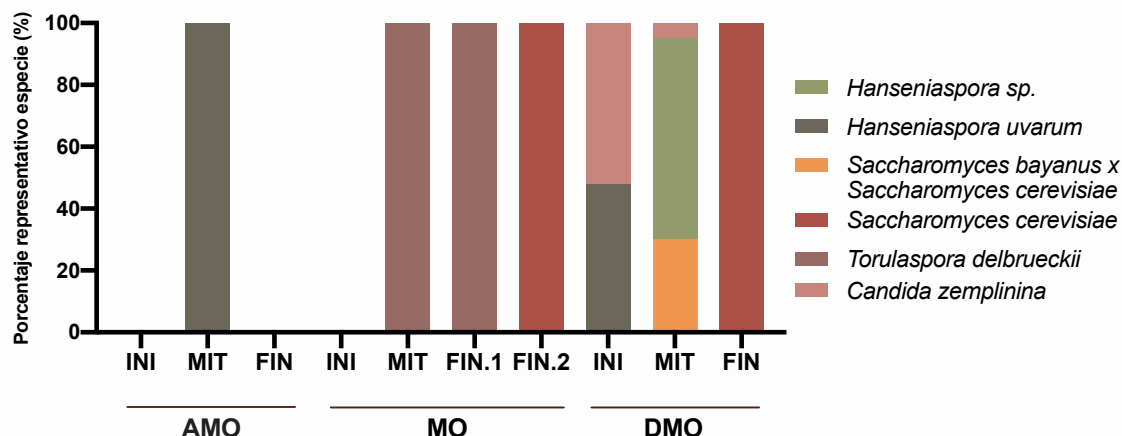


Figura 13 | Biodiversidad de especies detectadas en las muestras de uva de la variedad Garnacha de la vendimia del año 2019 de la DO Montsant.

Como se observa en la Figura 13, se recogieron muestras a dos tiempos en el final de la FAL del momento óptimo de vendimia de Garnacha, ya que se recogieron muestras en un tiempo que parecía el final de la FAL (FIN.1), sin embargo, los resultados mostraron pasado unos días que la densidad seguía siendo superior a 1.000 g/L y se recogió muestra (colonias) otra vez transcurrido unos días más (FIN.2), cuando la densidad ya era inferior a 1.000 g/L. La biodiversidad de levaduras autóctonas presentes en uva Garnacha, al igual que en uva Cariñena, cambia según el momento óptimo de la vendimia (Figura 13). El género de levadura más abundante, en las muestras de uva de la variedad Cariñena es *T. delbrueckii* (39,31%). Al analizar el factor momento óptimo de vendimia, se observa que *H. uvarum* es la levadura mayoritaria en muestras obtenidas antes del momento óptimo de vendimia, con un 100,00%, teniendo en cuenta tan solo las especies de levaduras. En cambio, en el momento óptimo de vendimia la especie mayoritaria es *T. delbrueckii* con una abundancia del 66,67%, seguida de *S. cerevisiae* (33,33%). Los resultados de después del momento óptimo de vendimia muestran que la especie mayoritaria es *S. cerevisiae* con un 36,00%, seguida de *Hanseniaspora sp.* y *Hanseniaspora uvarum*, con un 19,00% y 18,00% respectivamente. Al analizar el factor tiempo de la FAL espontánea en uva Garnacha, también se observan cambios destacables en la biodiversidad de levaduras autóctonas en esta variedad (Figura 13). A diferencia de lo que sucede en la variedad de uva Cariñena, *H.*

uvarum es la segunda levadura más abundante en el inicio de la FAL en las muestras de Garnacha, con un 47,83%, precedida por *C. zemplinina* con un 52,17% de abundancia respecto a las especies de levaduras. En cambio, la especie más abundante en la mitad de la FAL es *T. delbrueckii* con un porcentaje del 37,93%, seguida de *H. uvarum* y *Hanseniaspora* sp., con un 27,59% y 22,41% respectivamente. Sin embargo, la levadura más abundante en el final de la FAL es *S. cerevisiae* (68,00%), seguida de *Torulaspota delbrueckii* (32,00%), respectivamente. Cabe destacar que en la variedad Garnacha se ha observado una diferencia total en la especie de levadura entre las muestras del momento óptimo de vendimia del final denominado Final.1 y el Final.2, siendo en el primer caso *T. delbrueckii* (100%) y en el segundo caso *S. cerevisiae* (100%). Aunque suele ser común que *S. cerevisiae* se imponga en el final de la fermentación alcohólica como en el estudio de Pramateftaki, Lanaridis y Typas (2000) y otros estudios (revisado por Andorrà *et. al* 2019), el tiempo transcurrido entre la obtención de las muestras del Final.1 y Final.2 no es muy extenso (son 15 días de diferencia). Sin embargo, el número de réplicas biológicas seleccionadas (n=24) es una muestra representativa de la población. Por este motivo, para realizar una mejor observación de la diversidad poblacional se podría incrementar el número de réplicas biológicas, o bien, homogeneizar el mosto entre toma y toma de muestra.

En resumen, se han identificado 422 colonias de diferentes especies teniendo en cuenta levaduras, hongos y bacterias (Tabla 7 y Figura 11). De las 422 colonias de diferentes especies, 302 corresponden a especies de levaduras (Figura 12) y 121 a especies diferentes de hongos y bacterias (no levaduras que son los microorganismos estudiados en este trabajo por participar en la fermentación alcohólica del vino). En concreto, se han identificado 7 especies diferentes de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* x *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora* sp., *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Candida zemplinina* (Figura 12). La especie de levadura predominante en el inicio y mitad de la FAL es *H. uvarum*. En cambio, la especie predominante en el final de la FAL es *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*. No obstante, también se identificaron 2 especies de *S. cerevisiae* en las muestras de CAR_AMO_INI, en el inicio, aunque no se tipificaron porque no se obtuvo amplificación de su genoma al realizar una PCR de los elementos delta. Las especies de levaduras presentes en ambas variedades de uva estudiadas (Cariñena y Garnacha) son *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *H. uvarum*. En cambio, *H. opuntiae* y *C. zemplinina* se han identificado tan solo en muestras de uva Cariñena. Por otro lado, *Saccharomyces bayanus* x *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora* sp sólo se han identificado en muestras de la Garnacha. Estos resultados de la

identificación de especies de levaduras según el momento de la FAL son los esperados, ya que son parecidos a los reportados en otros estudios como el de Pramateftaki, Lanaridis y Typas (2000) (entre otros estudios), en el cual se identificó como levadura principal *H. uvarum* en el inicio de la FAL y *S. cerevisiae* como principal en mitad y final de la FAL. En cambio, los resultados de levaduras identificadas en relación con el momento óptimo de vendimia no se han podido comparar con otros resultados reportados porque no se ha encontrado mucha bibliografía en que se haya estudiado esta evolución.

2. Tipificación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Posteriormente, se tipificaron las cepas de *S. cerevisiae* mediante la técnica de PCR de los elementos delta, tanto en muestras provenientes de la variedad de uva Garnacha como Cariñena, DO Montsant (vendimia 2019) (Legras *et al.* 2003). En las muestras de la variedad Cariñena, se identificaron 15 perfiles diferentes de *S. cerevisiae* (Figura 14). De este modo, se identificó una cepa de *S. cerevisiae* de las muestras de Cariñena en el Momento Óptimo de Vendimia en el final de la FAL y, 14 cepas diferentes restantes en muestras de Después del Momento Óptimo de Vendimia del final de la FAL espontánea. También se identificó un perfil de *S. cerevisiae* en muestras de Antes del Momento Óptimo de Vendimia de Inicio de la FAL, sin embargo, no se evaluó su capacidad fermentativa porque no se amplificó esta muestra en la PCR con elementos delta y al realizar la restricción con *Hinfl* se observó un perfil con productos de la PCR de 380, 290, 180, 120 pb, a diferencia de los productos de la digestión con *Hinfl* de 320, 220, 180, 145 reportados por Guillamón *et al.* (1998).

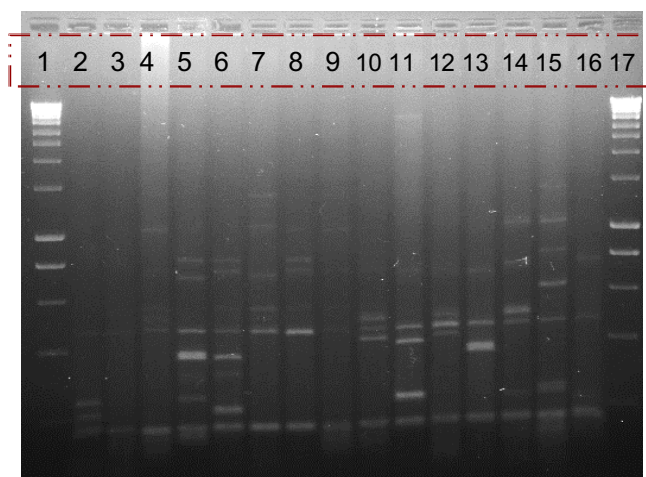


Figura 14 | Cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* identificadas en las muestras de uva de la variedad Cariñena (CAR) DO Montsant 2019. Carriles: 1 y 17. *Hyppertladder* 1 kb, 2. CAR_MO_FIN_1, 3. CAR_DMO_FIN_2, 4. CAR_DMO_FIN_3, 5. DCAR_DMO_FIN_4, 6. CAR_DMO_FIN_5, 7. CAR_DMO_FIN_6, 8. CAR_DMO_FIN_10, 9. CAR_DMO_FIN_11, 10. CAR_DMO_FIN_13, 11. CAR_DMO_FIN_15, 12. CAR_DMO_FIN_18, 13. CAR_DMO_FIN_20, 14. CAR_DMO_FIN_22, 15. CAR_DMO_FIN_23, 16. CAR_DMO_FIN_24.

En el caso de las muestras de la variedad Garnacha, se identificaron 6 perfiles diferentes de *S. cerevisiae* (Figura 15), una de las cuales se identificó en el Momento Óptimo de Vendimia y segundo final de la FAL espontánea. Sin embargo, 4 de las 5 cepas diferentes restantes se identificaron en muestras de Después del Momento Óptimo de Vendimia y la mitad de la FAL espontánea (las cuales eran híbridos *S. bayanus* x *S. cerevisiae*) y 1 cepa también Después del Momento Óptimo de Vendimia en el final de la FAL.

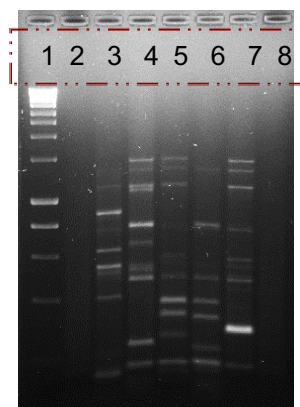


Figura 15 | Cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* identificadas en las muestras de uva de la variedad Garnacha DO Montsant 2019. Carriles: 1. Hyperladder 1 kb (Bioline, Londres, Reino Unido), 2. MO_GAR_FIN.2_3, 3. DMO_GAR_MIT_7, 4. DMO_GAR_MIT_9, 5. DMO_GAR_MIT_14, 6. DMO_GAR_MIT_20, 7. DMO_GAR_FIN_13. Se cargó la muestra número 3 del segundo final de la FAL del momento óptimo de vendimia en el carril 1 (Figura 15) pero no se aprecia ninguna banda. Sin embargo, sí que aparecían bandas en las PCR anteriores de elementos delta.

En conjunto, se han identificado 21 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Figuras 14, 15 y 16). En el caso de la variedad Cariñena, todas las cepas de *S. cerevisiae* diferentes pertenecen a muestras obtenidas Después del Momento Óptimo de vendimia y en el final de la FAL. En cambio, las diferentes cepas de *S. cerevisiae* identificadas en la variedad de uva Garnacha pertenecen a muestras recogidas en el Momento Óptimo (final de la FAL) y Después del Momento Óptimo (tanto a mitad como final de la FAL). Como se observan en las Figuras 14, 15 y 16, se han obtenido cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* que muestran patrones de bandas distintas entre ellas, como resultado de la amplificación de los elementos delta. El estudio de Legras *et al.* (2003) se ha tomado como referencia para la metodología de este procedimiento y para el análisis y discusión de los resultados.

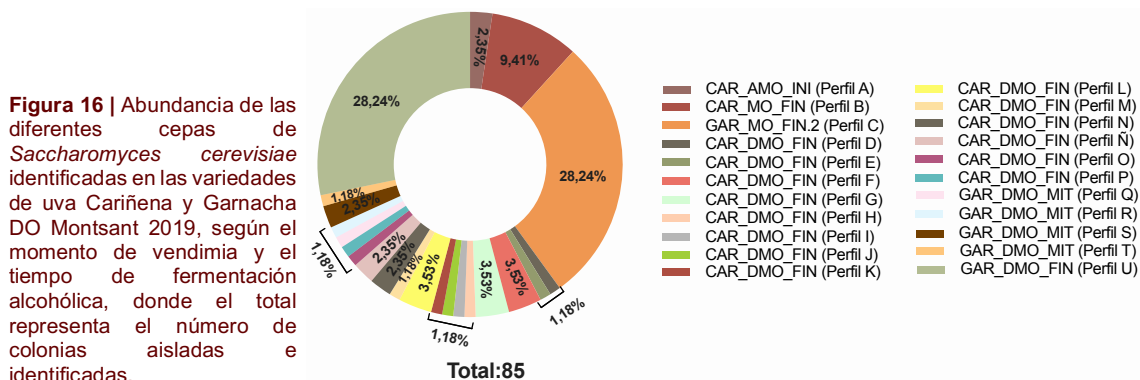


Figura 16 | Abundancia de las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* identificadas en las variedades de uva Cariñena y Garnacha DO Montsant 2019, según el momento de vendimia y el tiempo de fermentación alcohólica, donde el total representa el número de colonias aisladas e identificadas.

3. Fermentaciones a escala laboratorio de las cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*

3.1. Análisis químico inicial del mosto

Los mostos empleados para las microfermentaciones fueron caracterizados químicamente con el objetivo de analizar la concentración de ácido L-málico (g/L), el

°Brix (aparte de analizar la concentración de azúcares con densímetro), el Grado Alcohólico Probable (GAP) (% en volumen), el pH, la masa volúmica (g/cm^3), el Nitrógeno Amínico Probable (NAP), la concentración de amonio (NH_4), y el Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) (mg/L).

Tabla 9 | Resultados del análisis químico del mosto ajustado el °Brix y la densidad para la inoculación de levaduras extraídas en muestras de Cariñena y Garnacha, respectivamente, DO Montsant 2019.

	Ácido L- málico (g/L)	°Brix	GAP (v/v)	Acidez total tartárica (g/L)	pH	Masa volúmica (g/cm^3)	NAP (mg/L)	$[\text{NH}_4^+]$ (mg/L)	NFA (mg/L)
CAR	2,25	23,9	14,06	3,30	3,69	1098	127	88,5	196
GAR		27,0	15,98			1114			

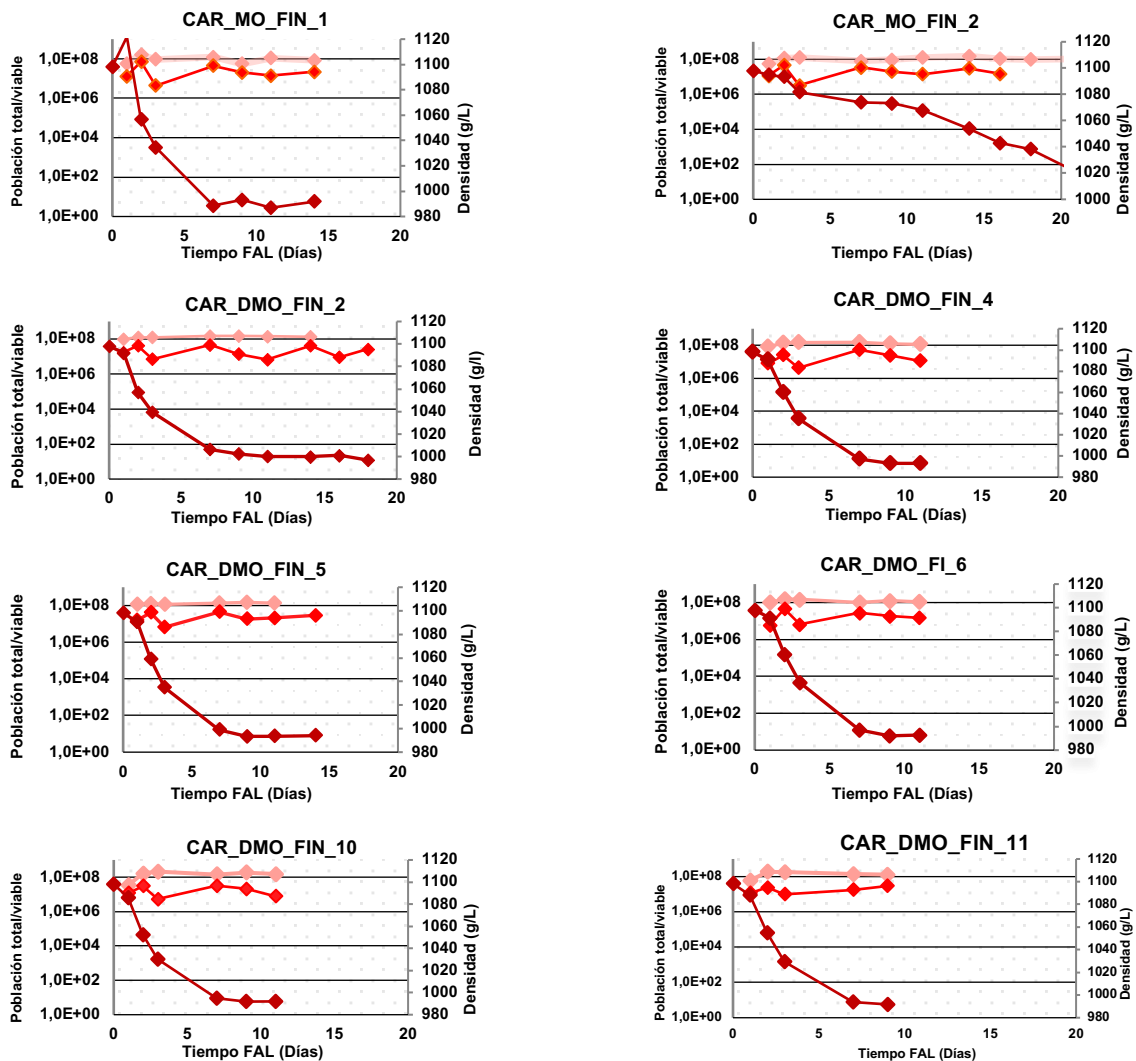
GAR: Garnacha, CAR: Cariñena, AP: Grado Alcohólico Probable, NAP: Nitrógeno Amínico Primario, NFA: Nitrógeno Fácilmente Asimilable.

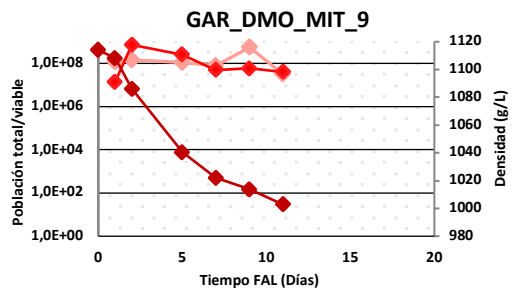
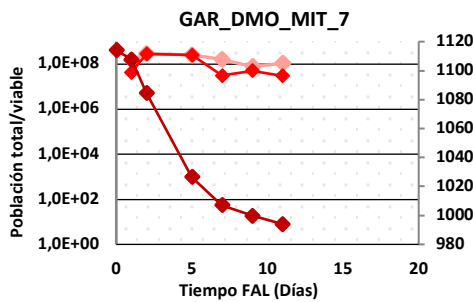
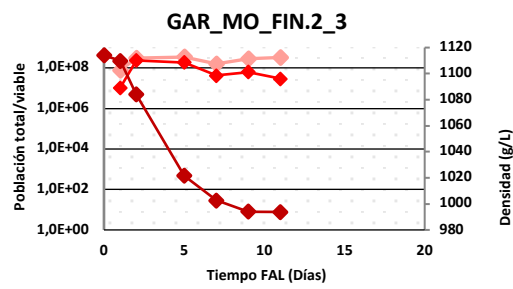
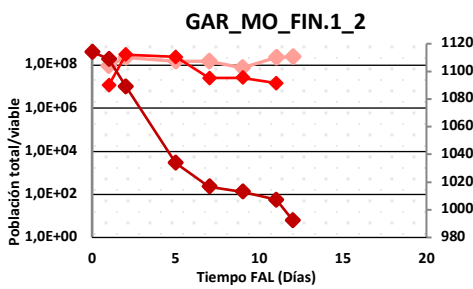
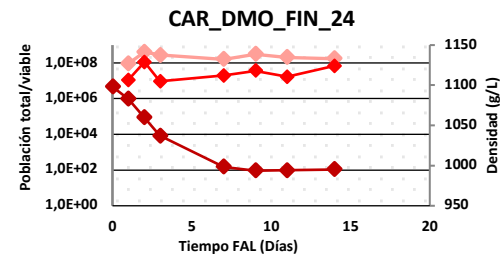
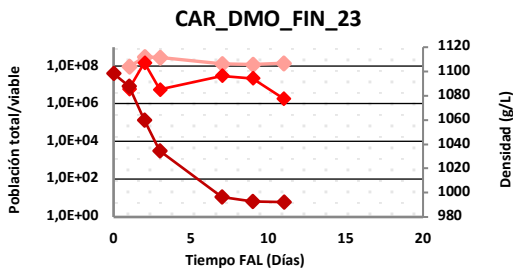
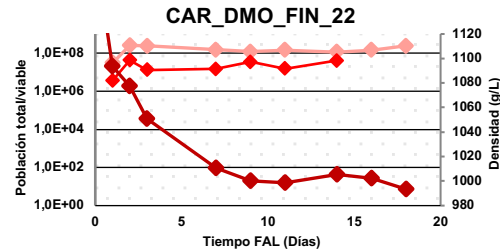
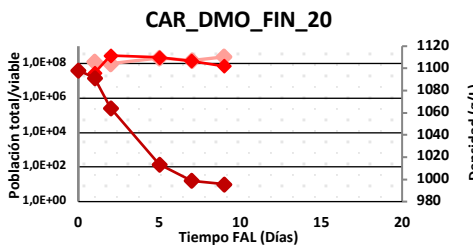
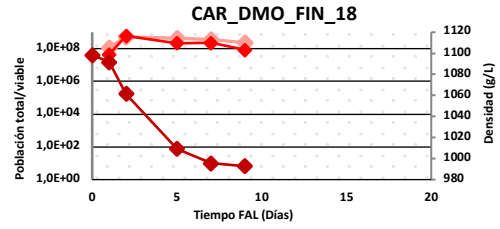
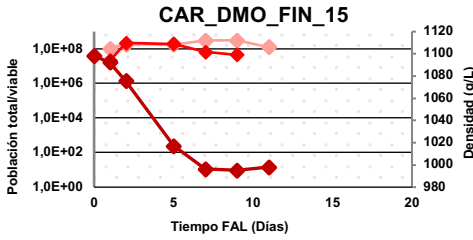
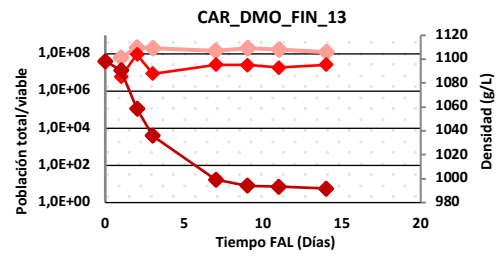
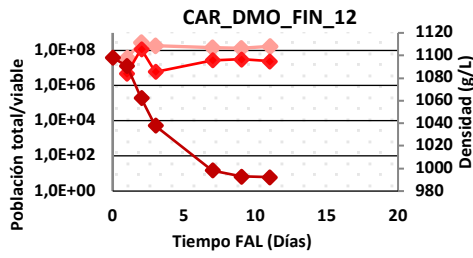
La densidad del mosto para las muestras destinadas a evaluar la capacidad fermentativa de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en uva de la variedad Cariñena es de 1.098 g/cm^3 , ya que se ajustó añadiendo agua destilada estéril para tener un °Brix y Grado Alcohólico Probable característico de vinos de variedad de uva Cariñena (Tabla 9). En relación con estos dos valores, el °Brix en el mosto 1 es de 23,9 y el GAP es de 14,06%, y por lo tanto cumplen los rangos característicos de los vinos de la variedad Cariñena, siendo 22-26°Brix y 12,00-14,50% (v/v) (Robinson 2015; Gutiérrez-Gamboa y Moreno-Simunovic 2018). Por otra parte, la densidad del mosto ajustada con agua destilada para las muestras de Garnacha es de 1.114 g/cm^3 . En este caso, el °Brix y Grado Alcohólico Probable del mosto para las microfermentaciones de Garnacha es 27,0 y 16,01 respectivamente, los cuales también cumplen los rangos característicos para vinos de variedad Garnacha (23-27°Bx y 14,00%-16,00% (v/v)) (Robinson 2015). La concentración de ácido L-málico en el mosto es 2,25 g/L . Asimismo, los valores de acidez total tartárica y pH son 3,30 g/L y 3,69, respectivamente. El Nitrógeno Amínico Primario (NAP) en este caso es de 127 mg/L , en cambio, valores de concentración de amonio (NH_4), y el Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) son 88,5 y 196 mg/L respectivamente. El nitrógeno se determina en el mosto porque es un elemento necesario para la fermentación, ya que es esencial para el metabolismo de las levaduras y su crecimiento. El nitrógeno que pueden usar las levaduras del vino se denomina Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA) o *Yeast Assimilable Nitrogen* (YAN). El NFA está formado principalmente por amonio (que se puede encontrar en forma de sales de amonio) y también por aminoácidos y péptidos. La concentración de aminoácidos se determina a través del Nitrógeno Alfa-Amínico Primario (NAP) o *Primary Amino Nitrogen* (PAN). Por este motivo, el análisis del mosto incluye la determinación de la concentración de amonio, de NAP y de NFA. De este modo, el NFA es esencial para la FAL porque participa en el metabolismo implicado en este proceso en diferentes formas en: la síntesis proteica, el transporte de azúcares, y la síntesis de alcoholes y ésteres.

El rango de nitrógeno total en el mosto es muy variado, aunque en general es 60-1000 mg/L. El rango de concentraciones habituales de NFA en el mosto suele ser de 60-500 mg/L, aunque depende de factores como la variedad de uva, la añada o el microclima. Generalmente, se considera que un mosto presenta deficiencia de nitrógeno asimilable cuando el NFA es ≤ 150 mg/L. Por este motivo, se puede considerar que el mosto obtenido no es deficiente en nitrógeno asimilable, y por lo tanto es un buen marcador de calidad de la fermentación que se realizará (Gobert *et al.* 2019; "OIV" 2021).

3.2. Evolución de las microfermentaciones

A continuación, la Figura 18 muestra la evolución de las microfermentaciones realizadas individualmente para cada cepa (promedio del duplicado de las muestras) de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de uva de la variedad Cariñena y Garnacha. Cabe destacar que todas las microfermentaciones finalizaron con una concentración de azúcares residuales finales $\leq 2,02$ g/L.





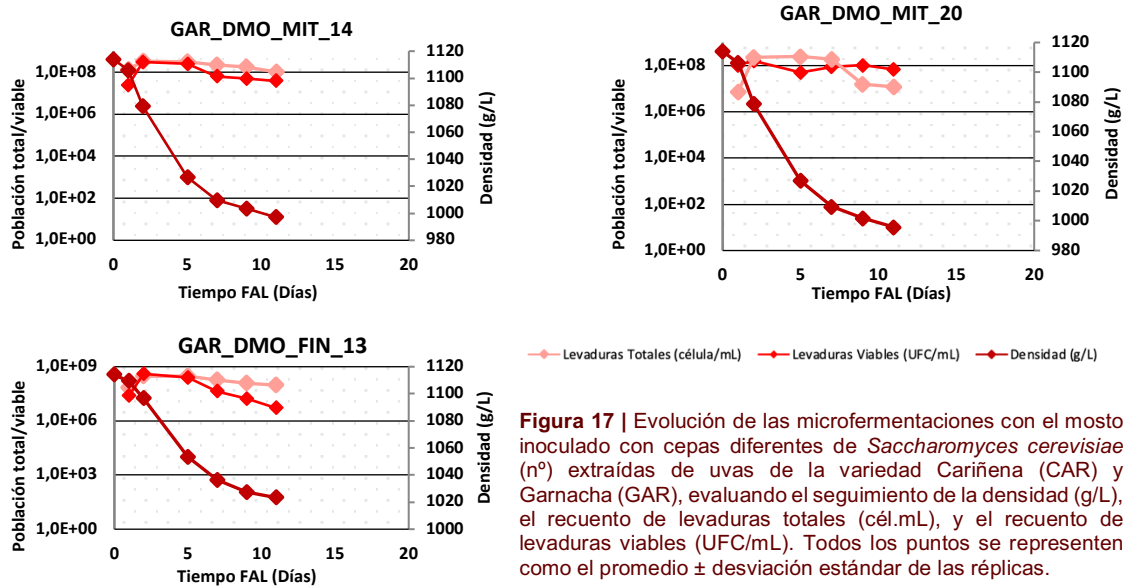


Figura 17 | Evolución de las microfermentaciones con el mosto inoculado con cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* (nº) extraídas de uvas de la variedad Cariñena (CAR) y Garnacha (GAR), evaluando el seguimiento de la densidad (g/L), el recuento de levaduras totales (cél.mL), y el recuento de levaduras viables (UFC/mL). Todos los puntos se representen como el promedio \pm desviación estándar de las réplicas.

Para analizar y discutir los resultados no se ha descartado ninguna réplica debido a que se había realizado el estudio por duplicado. En caso de que alguna o ambas réplicas no siguieran la evolución esperada, se repitió el experimento por duplicado para dichas muestras, como por ejemplo es el caso de las muestras CAR_DMO_FIN_15, CAR_DMO_FIN_18 y CAR_DMO_FIN_20. El estudio de microfermentaciones para evaluar la capacidad fermentativa de las diferentes cepas muestra que de las 21 cepas diferentes de *S. cerevisiae* identificadas, 2 de ellas presentan una cinética fermentativa lenta (CAR_DMO_FIN_2 y CAR_DMO_FIN_22), 3 una cinética intermedia (todas de las muestras de Cariñena, CAR_DMO_FIN_5, CAR_DMO_FIN_13 y CAR_DMO_FIN_24) y las 15 restantes, una cinética fermentativa relativamente rápida.

En general, las microfermentaciones han durado entre 9 y 14 días salvo alguna excepción, siendo 11 días la duración mayoritaria. De este modo los resultados están dentro del rango reportado en las referencias, ya que la FAL suele completarse en 5-25 días, dependiendo de la cepa (Massera *et al.* 2011; Dutraive *et al.* 2019; Binati *et al.* 2020). Cabe destacar que la cepa CAR_MO_FIN_2 necesitó más tiempo para realizar la fermentación, con una media de 30 días para las dos réplicas. Este hecho junto a la morfología de dichas levaduras bajo el microscopio óptico hizo pensar que no se tratara de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a esto, se volvieron a comprobar los resultados de los análisis anteriores, y se vio que se sembró por error la cepa CAR_MO_FIN_2, cuando se trata de *H. opuntiae*. Este error ha permitido ver la diferencia de capacidad fermentativa entre cepas de *S. cerevisiae* y una cepa no-*Saccharomyces*, como es *H. opuntiae*. Además, se creía que tanto las colonias de las

muestras DMO_GAR_FIN.1 como DMO_GAR_FIN.2 eran cepas de *S. cerevisiae*, se evaluó la capacidad fermentativa de una colonia de cada tiempo. Sin embargo, al ver que la cinética fermentativa de DMO_GAR_FIN.1 era bastante más lenta que las otras cepas se revisaron los resultados y al no estar seguros, se envió a secuenciar una muestra. Tanto el resultado de la PCR-RFLP del rRNA ITS-5,8S como de la PCR de los elementos delta ratifican el resultado de secuenciación que determinó que DMO_GAR_FIN.1 se trata de la especie *T. delbrueckii* y no de *S. cerevisiae*.

Finalmente, también destaca la cepa CAR_DMO_FIN_22 por terminar la FAL a los 14 días de promedio entre las dos réplicas (una 11 días y la otra 18 días). Sin embargo, esta cepa sí presentaba una morfología típica de *Saccharomyces cerevisiae* (colonias color blanco/crema, diámetro alrededor de 2-8 μm y longitud de 3-25 μm) (Ni y Snyder 2001). Este hecho manifiesta claramente que no todas las cepas de *S. cerevisiae* aisladas presentan la misma capacidad fermentativa.

En la Tabla 10, se recogen los análisis finales químicos del vino resultante de las microfermentaciones de cada cepa diferente de *S. cerevisiae*.

Tabla 10 | Análisis finales de los vinos obtenidos con las diferentes cepas de *S. cerevisiae* de la variedad Cariñena y Garnacha estudiados.

Muestra	SO ₂ total (mg/L)	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)	Acidez volátil FTIR (g/L)	Acidez total tartárica FTIR (g/L)	Grado alcohólico adquirido FTIR v/v	pH FTIR	Glicerol (g/L)
CAR_MO_FIN_1	58,0±1,4	1,70±0,14	0,10±0,00	0,68±0,02	4,9±0,14	13,60±0,23	3,58±0,03	6,30±0,14
CAR_MO_FIN_2	64,0±8,5	1,65±0,07	0,10±0,00	0,94±0,45	5,55±0,78	13,53±0,30	3,58±0,04	4,50±2,55
CAR_DMO_FIN_2	58,5±6,4	1,75±0,07	0,10±0,00	0,48±0,08	4,65±0,07	13,48±0,01	3,58±0,02	6,40±0,28
CAR_DMO_FIN_4	68,0±11,3	1,70±0,00	0,10±0,00	0,59±0,08	5,25±0,78	13,73±0,21	3,56±0,06	6,95±0,35
CAR_DMO_FIN_5	58,0±2,8	1,65±0,07	0,10±0,00	0,62±0,04	4,95±0,07	13,39±0,13	3,60±0,00	7,05±0,07
CAR_DMO_FIN_6	67,5±4,9	1,70±0,14	0,10±0,00	0,64±0,04	4,65±0,07	13,82±0,18	3,61±0,03	6,20±0,28
CAR_DMO_FIN_10	65,5±2,1	1,70±0,00	0,10±0,00	0,62±0,17	4,95±0,21	13,74±0,14	3,57±0,08	6,85±0,92
CAR_DMO_FIN_11	62,0±2,8	1,80±0,14	0,10±0,00	0,57±0,04	5,05±0,07	13,66±0,12	3,50±0,02	6,90±0,14
CAR_DMO_FIN_12	61,5±3,5	1,75±0,07	0,10±0,00	0,60±0,04	4,85±0,07	13,68±0,14	3,59±0,02	6,50±0,14
CAR_DMO_FIN_13	61,0±1,4	1,65±0,07	0,10±0,00	0,59±0,04	5,60±1,13	13,63±0,15	3,58±0,04	6,60±0,14
CAR_DMO_FIN_15	77,5±2,1	1,60±0,00	0,10±0,00	0,66±0,01	4,65±0,07	13,74±0,25	3,65±0,01	6,60±0,14
CAR_DMO_FIN_18	75,5±4,9	1,65	0,10±0,00	0,64±0,05	4,80±0,00	12,86±1,17	3,61±0,01	6,55±0,07
CAR_DMO_FIN_20	68,0±2,8	2,05±0,07	0,10±0,00	0,52±0,02	5,65±0,07	13,47±0,05	3,46±0,01	6,45±0,07
CAR_DMO_FIN_22	66,5±2,1	1,50±0,07	0,10±0,00	0,61±0,03	4,65±0,07	13,30±0,27	3,60±0,02	6,10±0,28
CAR_DMO_FIN_23	83,5±3,5	1,60±0,00	0,10±0,00	0,67±0,11	4,70±0,14	13,95±0,06	3,63±0,04	6,20±0,42
CAR_DMO_FIN_24	60,0±2,8	1,50±0,00	0,10±0,00	0,51±0,01	4,70±0,00	13,41±0,33	3,58±0,01	6,70±0,14
GAR_MO_FIN.1_2	84,0	1,90±0,14	0,10±0,00	1,22	5,80	15,76	3,75	8,70
GAR_MO_FIN.2_3	73,5±0,7	1,80	0,10	1,11±0,03	5,75±0,07	15,86±0,10	3,73±0,00	8,60±0,14
GAR_DMO_MIT_7	77,5±10,6	1,95±0,00	0,45±0,35	0,79±0,07	5,35±0,07	15,64±0,25	3,72±0,04	5,45±3,18
GAR_DMO_MIT_9	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR_DMO_MIT_14	72,0	1,70	0,10	0,84	5,00	15,90	3,76	7,20
GAR_DMO_MIT_20	63,0	1,70	0,10	1,05	5,70	14,40	3,63	7,40
GAR_DMO_FIN_13	63,0±7,1	2,00±0,00	0,15±0,07	0,54±0,00	5,40±0,00	14,44±0,01	3,66±0,01	8,80±0,00

Se muestran los valores de los parámetros analizados como promedio de las dos réplicas por muestra: Promedio \pm Desviación estándar. Ciertos valores no presentan desviación estándar debido a que se descartó el resultado de una de las réplicas o bien no se obtuvo por algún motivo. GAR_MO_FIN.1_2, GAR_DMO_MIT_9 y GAR_DMO_FIN_13 fueron estudiadas los últimos días de las microfermentaciones por mis compañeros Noelia Espligares y principalmente Ignasi Solé. Debido a un error de laboratorio, no se analizaron los análisis químicos finales de la muestra GAR_DMO_MIT_9.

3.3.2. Análisis estadístico de los resultados del análisis químico del vino

Tabla 11 | Análisis estadístico de los resultados de los análisis químicos finales de las microfermentaciones estudiadas en este trabajo.

		SO ₂ total (mg/L)	Ácido L- málico (g/L)	Ácido L- láctico (g/L)	AV FTIR (g/L)	ATT FTIR (g/L)	GAA FTIR (v/v)	pH FTIR	Glicerol (g/L)
Regresión	R ²	0,82	0,86	0,64	0,83	0,71	0,93	CAR: 0,50 GAR: 0,98	0,67
Análisis de varianza	F	4,04	5,40	1,63	4,37	2,17	12,38	CAR: 1,07 GAR: 31,43	1,82
	Pr > F	0,002	0,00	0,14	0,001	0,05	<0,000 1	CAR: 0,45 GAR: 0,01	0,10
Prueba hipótesis	W	0,99	0,92	0,36	0,77	0,76	0,83	CAR: 0,85 GAR: 0,90	0,700
	p- valor	0,892	0,005	<0,0001	<0,000 1	<0,000 1	<0,000 1	CAR: 0,00 GAR: 0,27	<0,0001
Significancia		Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	CAR: No GAR: Sí	No

AV: Acidez Volátil, ATT: Acidez Total Tartárica, GA: Grado Alcohólico Adquirido, Pr: Probabilidad.

A. CONCENTRACIÓN DE DIÓXIDO DE AZUFRE

Todas las microfermentaciones realizadas en este estudio presentaban una concentración de dióxido de azufre (SO₂) total de 58,0-84,0 mg/L (Tabla 10). Específicamente, las muestras de vino final de Cariñena presentaban una concentración de dióxido de azufre total de 58,0-83,5 mg/L. En cambio, la concentración de SO₂ total de las muestras de Garnacha es de 63,0-84,0 mg/L. El análisis estadístico de estos resultados muestra una diferencia significativa en la concentración de dióxido de azufre (SO₂) total entre las diferentes muestras estudiadas. Los niveles de dióxido de azufre total no se pueden comparar con el mosto inicial, ya que no es un parámetro determinado en el mosto inicial. El SO₂ se usa frecuentemente en la industria del vino como aditivo debido a su efecto antimicrobiano, antioxidante y antiséptico (Arapitsas *et al.* 2018). No obstante, la EU ha impuesto un límite para la concentración de SO₂ total presente en los vinos (150 mg/L para los vinos tintos y 200 mg/L para los blancos), de manera que este parámetro está dentro del límite en todas las muestras "EUR-Lex - 32019D0207(01) - EN - EUR-Lex" 2019).

B. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO

Todas las muestras de las microfermentaciones de mismo estudio (Tabla 10) presentaban una concentración de ácido L-málico de 1,60-2,05 g/L, y también presentan una diferencia significativa entre ellas (Tabla 11). En concreto, el vino de las muestras de Cariñena presenta una concentración de ácido L-málico de 1,50-2,05 g/L. y 1,70-2,00 g/L el caso de Garnacha. En comparación con la concentración de ácido L-málico en el mosto inicial, los niveles han disminuido en las microfermentaciones, debido al consumo de este compuesto por las cepas de levaduras presentes. La concentración de ácido L-málico en las uvas es de 1,00-10,00 g/L, dependiendo de factores, como el clima. La concentración de ácido L-málico en el mosto y vino tiene que ser controlada,

debido a su participación en la acidez y el pH como el segundo ácido más importante en la producción de vino. Además, el ácido L-málico es el sustrato de la fermentación maloláctica producida mayoritariamente por bacterias BAL, las cuales pueden proliferar sustancialmente a pH elevados (Ferreira y Mendes-Faia 2020). En este estudio, las concentraciones de ácido L-málico eran correctas, ya que se encuentran en el rango habitual de concentración de este ácido en el vino (1,00-6,50 g/L) (Volschenk, van Vuuren y Viljoen-Bloom 2006).

C. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO L-LÁCTICO

Por otra parte, todas las muestras obtenidas a partir de las microfermentaciones presentaban una concentración final de 0,10 g/L de ácido L-láctico, excepto las muestras GAR_DMO_MIT_7 y GAR_DMO_FIN_13, con 0,45 g/L y 0,15 g/L respectivamente (Tabla 10). Cabe destacar que las muestras no presentaban diferencias significativas en cuanto a la concentración de ácido L-láctico (Tabla 11). La concentración de ácido L-láctico no es un parámetro que se analiza en el mosto porque es un compuesto que se produce mayoritariamente como producto del metabolismo de los microorganismos implicados en la producción del vino. Aunque este ácido es producido mayoritariamente por bacterias ácido lácticas (BAL) en la fermentación maloláctica, también puede ser sintetizado por las levaduras en la fermentación alcohólica y/o maloláctica. Asimismo, los niveles de ácido L-láctico en los vinos suelen variar entre 100 y 500 mg/L (Ferreira y Mendes-Faia 2020). En este estudio, todas las muestras presentan una concentración final de ácido L-láctico dentro del rango de la referencia.

D. ACIDEZ VOLÁTIL

En cuanto a la acidez volátil, todas las muestras obtenidas en las microfermentaciones presentan unos valores entre 0,48 y 1,22 g/L, siendo 0,51-0,68 g/L los valores mayoritarios (Tabla 10). En concreto, las muestras de Cariñena presentan un rango de acidez volátil de 0,48-0,94 g/L. En cambio, el vino correspondiente las muestras de Garnacha presenta una acidez volátil de 0,54-1,22 g/L. Cabe destacar que las cepas con producción más baja de acidez son las cepas DMO_CAR_FIN_20 y DMO_CAR_FIN_24 en el caso de Cariñena con 0,51 y 0,52 g/L, respectivamente y GAR_DMO_FIN_13 con 0,54 g/L en el caso de Garnacha y por tanto, con gran interés enológico por su baja acidez volátil. La acidez volátil tampoco es un parámetro determinado en el análisis químico del mosto y por lo tanto, no se puede comparar el resultado del vino con el inicio. Esto se debe a que los productos volátiles se producen mayoritariamente a lo largo de la producción del vino gracias a la fermentación y a las reacciones químicas a partir del mosto (Kinzurik *et al.* 2015). Por otra parte, el análisis

estadístico de la acidez volátil en este estudio revela una diferencia significativa entre algunas muestras (Tabla 11). Se genera principalmente en la fase de crecimiento exponencial de estos microorganismos, alcanzando valores de entre 100 y 300 mg/L y su producción depende principalmente de la cepa de levadura o bacteria, temperatura de fermentación, y de la concentración de glucosa, nitrógeno y vitaminas. De este modo, niveles bajos de acidez volátil (inferior a 0,50 g/L) están relacionados con aromas afrutados y ligeramente ácidos del vino. Sin embargo, niveles más elevados se consideran que afectan negativamente al perfil sensorial del vino aportando aromas a vinagre, por ejemplo. Concentraciones elevadas de acidez volátil pueden llegar a inhibir el crecimiento de las levaduras en la fermentación del vino o incluso a producir fermentaciones lentas o paradas de fermentación. La concentración de acidez volátil expresada como ácido acético permitida en los vinos, es de 1,20 g/L y 1,40 g/L en la Unión Europea para los vinos blancos y tintos respectivamente ("EUR-Lex - 32019D0207(01) - EN - EUR-Lex" 2019). Todas las muestras analizadas presentan una concentración de acidez volátil expresada dentro de los máximos europeos. No obstante, la mayoría de las muestras presentan concentraciones de acidez volátil superiores a 0,50 g/L y, por lo tanto, tendrían aromas considerados negativos sensorialmente (Andorrà *et al.* 2019; Ferreira y Mendes-Faia 2020).

E. ACIDEZ TOTAL TARTÁRICA

La acidez total tartárica (ATT) de las muestras obtenidas a partir de las microfermentaciones realizadas en este estudio se encuentran globalmente entre 4,65 y 5,65 g/L en las muestras de Cariñena y 5,00–5,75 g/L en las muestras de Garnacha (Tabla 10). Varias muestras presentan el valor más bajo de acidez total tartárica. Sin embargo, sólo una muestra presenta el nivel más elevado, la cual coincide con la muestra GAR_MO_FIN.1_2 que también presenta el nivel más elevado de acidez volátil. Así, el análisis estadístico de la acidez total tartárica (ATT) de las muestras obtenidas en las microfermentaciones muestra que hay diferencia significativa entre algunos de estos valores (Tabla 11). El ácido L-tartárico se encuentra en una concentración de entre 4,50 y 10,00 g/L en las uvas, siendo el ácido mayoritario, que junto al ácido L-málico representan el 90% de los ácidos de la uva. La Unión Europea también regula la concentración de acidez total tartárica expresada como ácido tartárico, estableciendo el máximo en 7,50 g/L y 7,00 g/L para los vinos blancos y tintos respectivamente ("EUR-Lex - 32019R0934 - EN - EUR-Lex" 2019). De este modo, las concentraciones de acidez total tartárica de todas las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permitido por la UE y del rango de la referencia (4,50 y 10,00 g/L) (Andorrà *et al.* 2019; Ferreira y Mendes-Faia 2020). Asimismo, cabe destacar que se observa que este valor ha

aumentado tanto en las muestras de Cariñena como en las Garnacha, comparando la concentración de acidez total tartárica en el mosto inicial y en vino final en ambos casos. Este hecho es remarcable, ya que la acidez tartárica suele mantenerse constante durante la fermentación alcohólica, ya que es metabolizado en mucho menor grado que el ácido málico por las levaduras y microorganismos que realizan la fermentación (revisado por Andorrà *et al.* 2019). Sin embargo, se ha descrito que la ATT puede incrementar entre 1,00 y 2,00 g/L en la FAL debido a la producción por levaduras y bacterias de ácido L-málico, ácido succínico acético y láctico (Volschenk, van Vuuren y Viljoen-Bloom 2006).

F. GRADO ALCOHÓLICO ADQUIRIDO

Las muestras obtenidas al finalizar las microfermentaciones presentan un grado alcohólico adquirido de entre el 12,86% (v/v) y el 13,95% (v/v) para los vinos inoculados con levaduras aisladas de uva Cariñena y entre 14,40-15,90% (v/v) para los vinos que se habían inoculado con levaduras aisladas de uva Garnacha (Tabla 10). Se observa a partir del análisis estadístico de los resultados de grado alcohólico adquirido de las muestras estudiadas que no hay diferencias significativas entre las muestras de Cariñena, pero sí entre las muestras de Garnacha (Tabla 11). Generalmente, los vinos de mesa presentan un grado alcohólico de 9,00-15,00% (v/v). No obstante, existen vinos actualmente con grados alcohólicos superiores a 15,00 o 16,00% (v/v). El incremento de la concentración de etanol en los vinos también es consecuencia de un grado de madurez elevado de las uvas, ya que contienen concentraciones de azúcares elevadas. De manera que uvas maduras con concentración de azúcares superiores a 240 g/L pueden originar vinos con un grado alcohólico superior a 13,50%. Sin embargo, se ha observado que concentraciones elevadas de etanol pueden enmascarar algunos compuestos volátiles aromáticos (Goold *et al.* 2017). Al comparar el GAP del mosto y del vino, se observa que el valor ha disminuido ligeramente tanto en las muestras de Cariñena como de Garnacha.

G. pH

Como se observa en la Tabla 10, las muestras obtenidas en las microfermentaciones presentan en conjunto un pH entre 3,46 y 3,74, siendo mayoritario en rango 3,56-3,63. En las muestras de Cariñena el rango de pH del análisis químico final es de 3,46-3,63 y de 3,63-3,75 en caso de Garnacha. En concreto, la muestra con el pH más ácido es CAR_DMO_FIN_20 (3,46) y la muestra con el pH más básico es GAR_DMO_MIT_14 (3,74). En este caso, el análisis estadístico también muestra que hay diferencia significativa entre las muestras estudiadas (Tabla 11). Al comparar los valores de pH del mosto con los valores del vino, se observa que el pH ha aumentado tanto en las

muestras de Cariñena como las de Garnacha, siendo los vinos menos ácidos que el mosto. El pH, junto con la acidez, es el responsable de conferir a los vinos una estabilidad microbiana. Por esto son dos parámetros que se suelen ajustar en el vino siendo factores clave para la fermentación alcohólica. Vinos con pH inferiores a 3,50 tienen menos probabilidad de crecimiento de bacterias y levaduras denominadas de “deterioro”, mientras que pH elevados están relacionados con mayor diversidad de población de bacterias BAL, cosa que supone un riesgo para la calidad del vino por la producción de ciertos ácidos como el ácido acético mediante la FML. Para prevenir la FML se recomienda controlar el pH por debajo de 3,30 (revisado por Andorrà *et al.* 2019; Ferreira y Mendes-Faia 2020).

H. GLICEROL

La concentración de glicerol en las muestras de las microfermentaciones estudiadas varía entre 4,50 y 8,80 g/L (Tabla 10). Sin embargo, la mayoría de las muestras (16 de las 22 muestras) presentan una concentración de glicerol de 6,10-7,10 g/L. En concreto, las muestras de Cariñena presentan un rango de concentración de glicerol de entre 6,10-7,05 g/L, descartando el valor de 4,50 g/L de la muestra de CAR_MO_FIN_2 que no sigue la tendencia. En cambio, las muestras de Garnacha presentan un rango de concentración de glicerol de 7,20-8,70 g/L si se descarta la muestra GAR_DMO_MIT_7, la cual no sigue la tendencia. Asimismo, no hay diferencias significativas en la concentración de glicerol de las muestras estudiadas (Tabla 11). Como se observa en la Tabla 10, los niveles de glicerol obtenidos en todas las muestras estudiadas se encuentran dentro del rango reportado en la bibliografía para los vinos (4,00 a 15,00 g/L) (Zhao *et al.* 2015). En concreto, algunos estudios han demostrado que la concentración de glicerol que *S. cerevisiae* es capaz de producir en la fermentación del vino varía entre 1 y 15,00 g/L, siendo 7,00 g/L el valor promedio. Finalmente, no se puede comparar la concentración de glicerol del mosto con los valores del vino, ya que no es un parámetro que se analiza en el análisis químico del mosto inicial. Esto se debe a que el glicerol es un subproducto formado durante la FAL y por lo tanto, no es un compuesto que debería estar presente en el mosto de la uva (Andorrà *et al.* 2019; Bokulich *et al.* 2016).

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se han analizado las levaduras autóctonas aisladas de variedad de uva Cariñena y Garnacha de la DO Montsant 2019, según el momento óptimo de vendimia (antes, durante o después) y según el punto de la fermentación alcohólica espontánea. En este estudio también se han tipificado las cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* y evaluado su capacidad fermentativa. Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, en estas muestras se han identificado 422 colonias de diferentes especies (teniendo en cuenta levaduras, hongos y bacterias), de las cuales 302 corresponden a especies de levaduras y 121 a especies diferentes a levaduras. En concreto, se han identificado 7 especies diferentes de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* x *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora sp.*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Candida zemplinina*. Asimismo, se han identificado y tipificado en principio 22 cepas con perfiles diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, en muestras obtenidas Después del Momento Óptimo de vendimia y en el final de la fermentación alcohólica en la variedad Cariñena y en el Momento Óptimo (final de la FAL) y Después del Momento Óptimo (tanto a mitad como final de la FAL) de vendimia en uva Garnacha. Los resultados obtenidos muestran cambios destacables en la biodiversidad de levaduras autóctonas en los factores de tiempo de vendimia y tiempo de la fermentación alcohólica. Se ha observado que levaduras no-*Saccharomyces* (como *H. uvarum*, *H. opuntiae* y *T. delbrueckii*), son en general más abundantes antes del momento óptimo y en el momento óptimo de vendimia y en el inicio y mitad de la fermentación alcohólica en ambos tipos de variedades de uva. En cambio, la levadura que se impone después del momento óptimo de vendimia (solo en Garnacha) y en el final de la FAL es en general *S. cerevisiae*, en ambos tipos de variedad de uva estudiadas. Las microfermentaciones realizadas para evaluar la capacidad fermentativa de las diferentes cepas reveló que de las 22 cepas diferentes de *S. cerevisiae* identificadas, 2 presentan una cinética fermentativa lenta, 3 una cinética intermedia (todas de las muestras de Cariñena) y 15 una cinética fermentativa relativamente rápida. Al comparar las capacidades fermentativas de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas con una cepa de *T. delbrueckii* y *H. opuntiae*, se observa que *S. cerevisiae* presenta una mayor capacidad fermentativa que otras especies no-*Saccharomyces* como son *T. delbrueckii* y *H. opuntiae*.

De este modo, se confirma el uso potencial de las levaduras autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas en variedad de uva Cariñena y Garnacha DO Montsant 2019 para la producción de vino, debido a sus propiedades positivas en la

capacidad fermentativa y en la calidad del vino obtenido, tal y como se observan en los parámetros analizados en los análisis químicos del vino final. Por lo tanto, estos resultados son prometedores para que los enólogos creen diferentes estilos de vino asociados a un “terroir” en particular como es la DO Montsant utilizando levaduras autóctonas.

12. PERSPECTIVAS DE FUTURO

No obstante, sería necesario realizar más estudios con estas cepas porque no se ha realizado el estudio en las mismas condiciones con una cepa comercial, por ejemplo, como control. Por este motivo, se podría realizar una microfermentación con una cepa comercial de *S. cerevisiae* para estudiar su capacidad fermentativa en las mismas condiciones de este estudio y poder comparar los resultados. También se podría estudiar la capacidad fermentativa de un inóculo masivo con todas las cepas de *S. cerevisiae* aisladas e identificadas y evaluar el porcentaje de imposición de cada una. A escala laboratorio se podrían realizar otros análisis con las cepas con mayor capacidad fermentativa como, por ejemplo, un test de tolerancia a etanol, a la temperatura, un test de floculación, de producción de ácido sulfhídrico, estudiar la evolución según la fuente de nitrógeno o bien estudiar el impacto de cada cepa en los taninos y la composición de polisacáridos. Una vez obtenidos los resultados de los análisis anteriores, se podría realizar un estudio de fermentación de los monocultivos a escala semi-industrial en tanques de acero inoxidable de 100L, por ejemplo. Este estudio permitiría evaluar si las levaduras presentan la misma capacidad fermentativa a escala laboratorio (en Erlenmeyers de 200-250mL) que a escala semi-industrial (tanques de 100L). Este análisis a gran escala permitiría también realizar un análisis sensorial, ya que se dispondría de suficiente volumen para coger diferentes muestras para las catas. El cuello de botella de la selección de cepas de levaduras para la producción de vino es la validación de los resultados con las levaduras a escala industrial. Por este motivo, un estudio a nivel industrial sería necesario para corroborar que las levaduras estudiadas son capaces de producir vino a gran escala.

Me gustaría concluir este trabajo con una reflexión que hizo Galileo Galilei, con la frase:

” *Today's sunshine is tomorrow's wine*

En ciertas culturas se considera el vino en una comida es tan esencial como un día con sol. Científicamente se ha demostrado que pequeñas cantidades diarias de vino (una copa) reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Goold *et al.* 2017; Haseeb, Alexander y Baranchuk 2017).

13. AUTOEVALUACIÓN

Este apartado recoge la autoevaluación tanto del período de prácticas en VITEC, en primer lugar, y también de la elaboración del presente trabajo de final de grado en Biotecnología. Me gustaría agradecer que VITEC y especialmente la Dra. Imma Andorrà me diera la oportunidad de realizar las prácticas para basar el trabajo de final de grado en su departamento de microbiología enológica, en especial ante una situación excepcional de pandemia mundial. Estoy muy satisfecha con estas prácticas, ya que me han permitido realizar técnicas que en la universidad ya había realizado puntualmente (como extracción de DNA, PCR o electroforesis en gel de agarosa y transiluminación) o bien aprender otras de nuevas, como por ejemplo cuantificación de DNA, o evaluar la capacidad fermentativa mediante microfermentaciones. Aunque siempre he tenido la ayuda y soporte de Imma y Noelia principalmente, estas prácticas también me han servido para desenvolverme autónomamente con el trabajo de día a día en un laboratorio, desde la preparación de reactivos, hasta el autoclavaje, entre otros aspectos. También he asentado las bases de trabajo en equipo y comunicación entre los trabajadores de un laboratorio, ya que es indispensable para un buen trabajo y unos buenos resultados. También he aprendido a interpretar los resultados y adaptar el siguiente paso en el proceso según los resultados previos, como en la identificación de especies de levaduras al realizar la primera amplificación mediante PCR ITS-5,8S y según el resultado, realizar o no, digestión enzimática. No obstante, las decisiones se tomaban bajo la supervisión de Imma. Evaluándome desde una perspectiva objetiva me he visto desenvuelta, no solamente a la hora de practicar técnicas de biología molecular y microbiología enológica, que ya había aprendido y aplicado en la universidad, sino que también aprendiendo rápidamente las nuevas técnicas o procedimientos. Asimismo, el trabajo de final de grado me ha permitido adentrarme aun más en el mundo de la enología y microbiología enológica sobretodo gracias a la lectura de artículos científicos de este ámbito. Además, al redactar la metodología realizada he analizado y asentado la secuencia temporal del origen de las muestras (porque no había sido realizado por mi sino por el equipo de VITEC, Noelia Espligares principalmente), y el procedimiento llevado a cabo, así como el motivo por el cual se aplicaba una técnica u otra. Finalmente, este trabajo ha permitido que organizara, tratara y analizara los resultados para poder discutir y sacar una conclusión de este estudio PECT (2019 en mi caso). En resumen, las prácticas en VITEC han sido muy gratificantes a nivel profesional, por haber aprendido mucho y descubierto un área que no sabía que me gustara tanto, y a nivel personal, por haber conocido y compartido tiempo y trabajo con un gran equipo e incluso por llevarme alguna amistad.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. "Alcoholic beverage solution guide a collection of essential analyses". 2021. *Mt.Com*. https://www.mt.com/dam/LabDiv/Campaigns/food_2014/downloads/Alcoholic_Beverage_Solution_Guide_EN.pdf.
2. Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L.U.L. y Webb, A.D. 1982. *The technology of wine making*. 4th ed. AVI Publishing Company, Westport, Conn.
3. Amerine, M. A., y Kunkee, R. E. 1968. "Microbiology of winemaking". *Annual Review Of Microbiology* 22 (1): 323-358.
4. Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., y Esteve-Zarzoso, B. 2010. "Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations". *European Food Research And Technology* 231 (2): 215-224.
5. Andorrà, I., Miró, G., Espligares, N., Mislata, A. M., Puxeu, M., y Ferrer-Gallego., R. 2019. "Wild yeast and lactic acid bacteria of wine". *Yeasts in biotechnology*.
6. Arapitsas, P., Guella, G., y Mattivi, F. 2018. "The impact of SO₂ on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age". *Scientific Reports* 8 (1): 858.
7. Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., y Duarte., F.L. 2005. "Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-saccharomyces yeasts present during red wine fermentations". *International Journal Of Food Microbiology* 102 (1): 49-56.
8. Binati, R. L., Wilson, J.F. Junior, L., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., y Torriani, S. 2020. "Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine volatile y sensory diversity: a study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia spp.* y *Starmarella bacillaris* strains isolated in Italy". *International Journal of Food Microbiology* 318: 108470.
9. Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, R.G., Heymann, H., Ebeler, S. E., y Mills, D. A. 2016. "Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics". *Mbio* 7 (3): e00631-16.
10. Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., y Mills, D. A. 2013. "PNAS Plus: From the cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate". *Proceedings of The National Academy of Sciences* 111 (1): E139-E148.
11. "OIV". 2021. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos (2 vol.). *Oiv.Int*. <https://www.oiv.int/es/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>.
12. "DO Montsant". 2020. DO Montsant. <https://www.domontsant.com/en/>. "Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación". 2021. Mapa.Gob.Es. <https://www.mapa.gob.es/en/>.
13. Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C., y Rauhut, D. 2019. "Effect of sequential inoculation with non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts on riesling wine chemical composition". *Fermentation* 5 (3): 79.
14. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. 1999. "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal

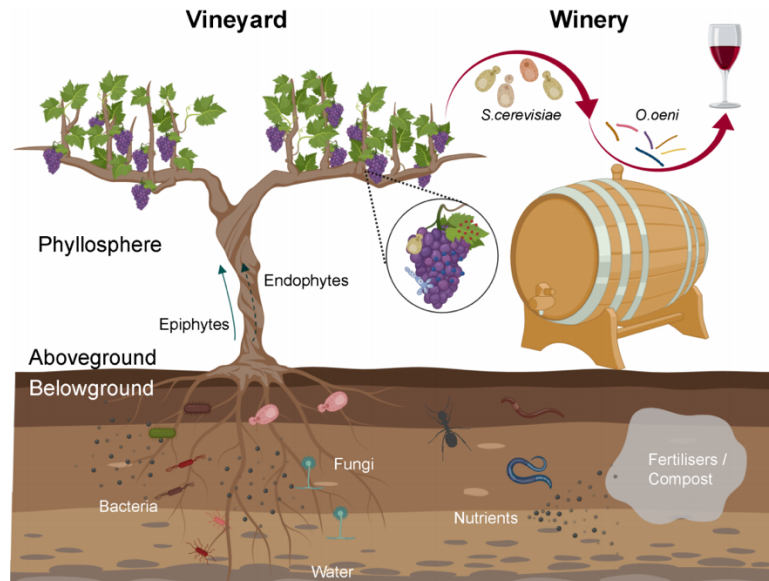
- transcribed spacers". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49 (1): 329-337.
15. "EUR-Lex - 32019D0207(01) - EN - EUR-Lex". 2021. *Eur-Lex.Europa.Eu*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32019D0207%2801%29>.
 16. "EUR-Lex - 32019R0934 - EN - EUR-Lex". 2019. *Eur-Lex.Europa.Eu*. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2019/934/oj.
 17. Fleet, G.H. y Heard, G.M. 1993. Yeasts: growth during fermentation. Ed., Harwood Academic. *Wine, Microbiology and Biotechnology*, 27–54. Lausanne.
 18. González-Arenzana, L., López, R., Santamaría, P., Tenorio, C., y López-Alfaro, I. 2011. "Dynamics of indigenous lactic acid bacteria populations in wine fermentations from la rioja (spain) during three vintages". *Microbial Ecology* 63 (1): 12-19.
 19. Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., y Pretorius. I. S. 2017. "Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines". *Microbial Biotechnology* 10 (2): 264-278.
 20. Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T., y Querol, A. 1994. "Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns". *International Journal Of Systematic Bacteriology* 44 (4): 708-714.
 21. Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., y Querol, A. 1998. "Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region". *Archives of Microbiology* 169 (5): 387-392.
 22. Gutiérrez-Gamboa, G., y Moreno-Simunovic, Y. 2018. "Location effects on ripening and grape phenolic composition of eight 'Carignan' vineyards from Maule Valley (Chile)". *Chilean journal of agricultural research* 78 (1): 139-149.
 23. "Icumsa". 2021. *Icumsa.Org*. <https://www.icumsa.org/index.php?id=102>.
 24. Ivey, Melissa L., y Trevor G. Phister. 2011. "Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques". *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (10): 1619-1634.
 25. Jacobson, J. L. 2010. *Introduction to wine laboratory practices and procedures*. 6th ed. New York: Springer.
 26. Kim, J. M., Vanguri, S., Boeke, J. D., Gabriel, A., y Voytas, D. F. 1998. "Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence". *Genome Research* 8 (5): 464-478.
 27. Kurtzman y Robnett. 1998. "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences". *Antonie Van Leeuwenhoek*. 73 (4): 331-71.
 28. Legras, J., y Karst, F. 2003. "Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation". *FEMS Microbiology Letters* 221 (2): 249-255.
 29. Legras, J., Ruh, O., Merdinoglu, D., y Karst, F. 2005. "Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains". *International Journal Of Food Microbiology* 102 (1): 73-83.
 30. "Ley 6/2015, de 12 de mayo, de Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas de ámbito territorial supraautonómico". 2015. *BOE.es* <https://boe.es/buscar/pdf/2015/BOE-A-2015-5288-consolidado.pdf>.
 31. "Listado de denominaciones de origen protegidas e indicaciones geográficas protegidas de vinos registradas en la Unión Europea". 2021. *Mapa.Gob.Es*.

- https://www.mapa.gob.es/ca/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/web-listadodops-igpsvinosporcaa-sinresum31052020_tcm34-426473.pdf.
32. Liu, D., Zhang, P., Chen, D. y Howell, K. 2019. "From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine". *Frontiers in Microbiology* 10:2679.
 33. López, V., Querol, A., Ramón, D., y Fernández-Espinar, M. T. 2001. "A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts". *International Journal Of Food Microbiology* 68 (1-2): 75-81.
 34. Massera, A., Assof, M., Sturm, M. E., Sari, S., Jofré, V., Cordero-Otero, R., y Combina, M. 2011. "Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains to ferment red musts at low temperature". *Annals of Microbiology* 62 (1): 367-380.
 35. "Mapa De Las Denominaciones De Origen Protegidas De Vinos De España". 2020. *Mapa.Gob.Es*. https://www.mapa.gob.es/es/cartografia-y-sig/publicaciones/alimentacion/mapa_dop_vinos.aspx.
 36. Mendes Ferreira, A., y Mendes-Faia, A. 2020. "The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking". *Foods* 9 (9): 1231.
 37. Ni, L., y Snyder, M. 2001. "A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular Biology of The Cell* 12 (7): 2147-2170.
 38. Pramateftaki, P.V., P. Lanaridis, y M.A. Typas. 2000. "Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of greece". *Journal Of Applied Microbiology* 89 (2): 236-248.
 39. Querol, Amparo, Eladio Barrio, Tomás Huerta, y Daniel Ramón. 1992a. "Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains". *Applied And Environmental Microbiology* 58 (9): 2948-2953.
 40. Querol, A., Barrio, E., y Ramón, D. 1992b. "A comparative study of different methods of yeast strain characterization". *Systematic and Applied Microbiology* 15 (3): 439-446.
 41. Robinson, J. 2015. *The Oxford Companion to Wine*. 4th ed. Corby: Oxford University Press.
 42. "Términos tradicionales y términos facultativos". 2021. *Mapa.Gob.Es*. <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/terminos/>.
 43. Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Donèche, B., Alain Maujean, G., y Lonvaud, A. 2006. *Handbook of Enology*. 2nd ed. Chichester: John Wiley.
 44. Volschenk, H., van Vuuren, H.J.J., y Viljoen-Bloom, M. 2006. "Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification". *South African Journal of Enology and Viticulture* 27 (2).
 45. Zanol, G., Baleiras-Couto, M.M., y Duarte, F.L. 2010. "Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification". *Ciência e Técnica Vitivinícola* 25 (2): 75-85.
 46. Zhao, X., Procopio, S., y Becker, T. 2015. "Flavor Impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review". *Journal of Food Science and Technology* 52 (12): 7588-7598.

ANEXOS

1. Ejemplo de la microbiota que participa en la producción del vino

Figura 18 | Representación de la microbiota involucrada en todo el proceso de producción del vino desde el viñedo hasta la bodega. Específicamente, la microbiota asociada a la vid (a la uva en concreto) puede introducirse en los mostos y crear un ambiente microbiano vitivinícola, en el que las levaduras fermentativas y las LAB realizan la fermentación alcohólica y maloláctica, respectivamente. Las prácticas de viticultura, como la adición de fertilizantes, pueden modificar la microbiota del suelo mediante la modificación de las reservas de nutrientes o la adición de microorganismos transmitidos por el estiércol. Extraído de: (Liu *et al.* 2019).



2. Fermentación alcohólica espontánea de la vendimia de 2019 DO Montsant

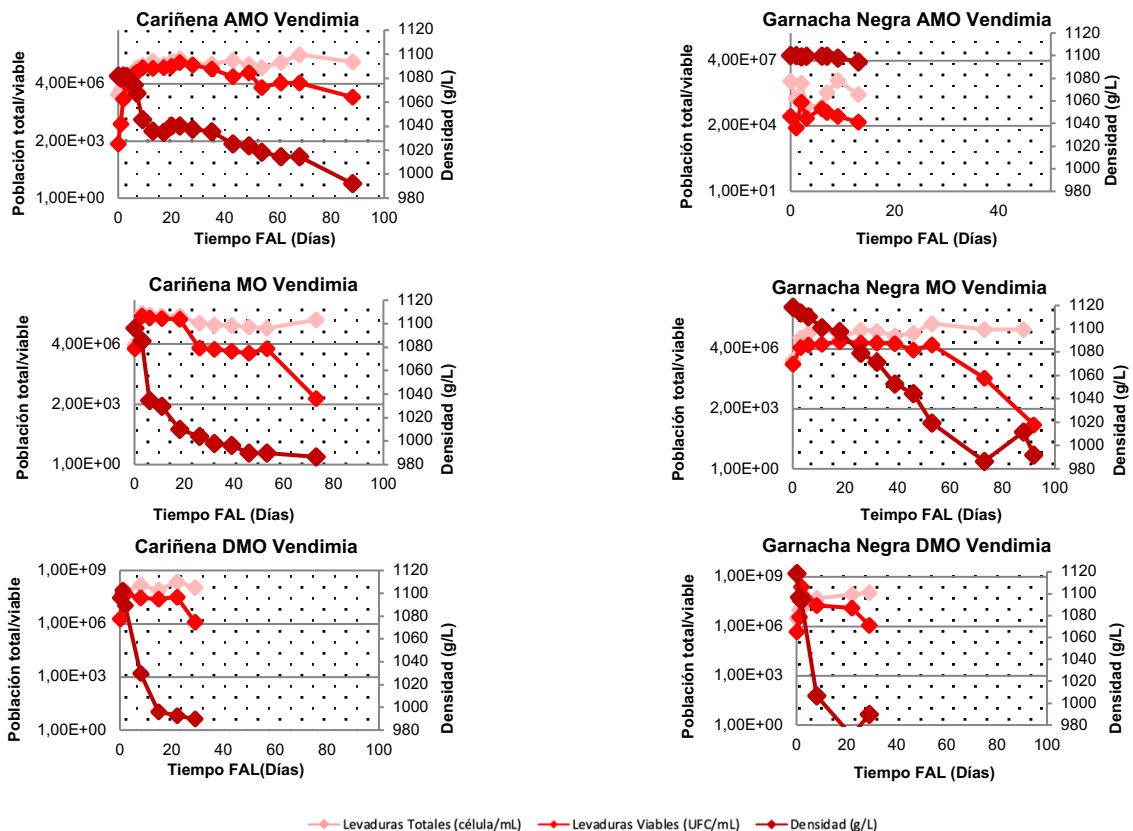


Figura 19 | Evolución de la densidad (g/L), levaduras totales (células/mL) y viables (UFC/mL) de las fermentaciones espontáneas del mosto de uva obtenidos en diferentes momentos de vendimia del 2019 de variedad de uva Cariñena y Garnacha negra, por el equipo de VITEC.

3. Concentraciones iniciales, volúmenes iniciales y finales

Tabla 12 | Concentración inicial del inóculo, volumen aspirado del inóculo para la concentración y volumen final deseado para tener en los Erlenmeyers del estudio de las microfermentaciones, según cada muestra

Muestra	C ₀ (cél/mL)	V ₀ (mL)	V _f (mL)	C _f (cél/mL)
CAR_MO_FIN_1.1	1,07·10 ⁸	3,521	250	1,50·10 ⁶
CAR_MO_FIN_1.2	1,06·10 ⁸	3,555	250	1,50·10 ⁶
CAR_MO_FIN_2.1	1,29·10 ⁸	2,918	250	1,50·10 ⁶
CAR_MO_FIN_2.1	1,15·10 ⁸	3,261	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_2.1	1,38·10 ⁸	2,727	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_2.2	8,40·10 ⁷	4,464	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_4.1	6,75·10 ⁷	4,444	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_4.2	8,75·10 ⁷	4,296	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_5.1	7,75·10 ⁷	4,839	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_5.2	7,50·10 ⁷	4,000	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_6.1	1,08·10 ⁸	3,488	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_6.2	5,05·10 ⁷	3,96	200	1,00·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_10.1	7,35·10 ⁷	4,082	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_10.2	8,20·10 ⁷	4,573	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_11.1	7,00·10 ⁷	4,286	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_11.2	5,00·10 ⁷	4,000	200	1,00·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_12.1	6,30·10 ⁷	4,762	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_12.2	1,29·10 ⁸	2,918	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_13.1	1,50·10 ⁸	2,508	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_13.2	8,95·10 ⁷	4,19	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_15.1	8,40·10 ⁷	4,348	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_15.2	7,70·10 ⁷	5,000	200	1,00·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_18.1	5,00·10 ⁷	4,000	200	1,00·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_18.2	9,95·10 ⁷	3,681	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_20.1	9,85·10 ⁷	2,899	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_20.2	7,60·10 ⁷	3,158	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_22.1	7,30·10 ⁷	2,956	200	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_22.2	1,27·10 ⁸	2,964	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_23.1	1,34·10 ⁸	2,799	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_23.2	1,01·10 ⁸	3,731	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_24.1	1,74·10 ⁸	2,161	250	1,50·10 ⁶
CAR_DMO_FIN_24.2	4,30·10 ⁷	4,651	200	1,00·10 ⁶
GTX_MO_FIN.1_2.1	6,65·10 ⁷	4,511	200	1,50·10 ⁶
GTX_MO_FIN.1_2.2	7,55·10 ⁸	3,974	200	1,50·10 ⁶
GTX_MO_FIN.2_3.1	7,45·10 ⁷	4,027	200	1,50·10 ⁶
GTX_MO_FIN.2_3.2	6,80·10 ⁷	4,412	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_7.1	8,45·10 ⁷	3,55	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_7.2	8,35·10 ⁷	3,593	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_9.1	5,20·10 ⁷	5,769	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_9.2	9,10·10 ⁷	3,297	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_14.1	4,25·10 ⁷	7,059	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_14.2	6,40·10 ⁷	4,688	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_20.1	5,45·10 ⁷	5,505	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_MIT_20.2	2,65·10 ⁷	7,547	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_FIN_13.1	1,15·10 ⁸	2,609	200	1,50·10 ⁶
GTX_DMO_FIN_13.2	1,28·10 ⁸	2,344	200	1,50·10 ⁶

4. Gel de electroforesis de la digestión mediante enzimas de restricción

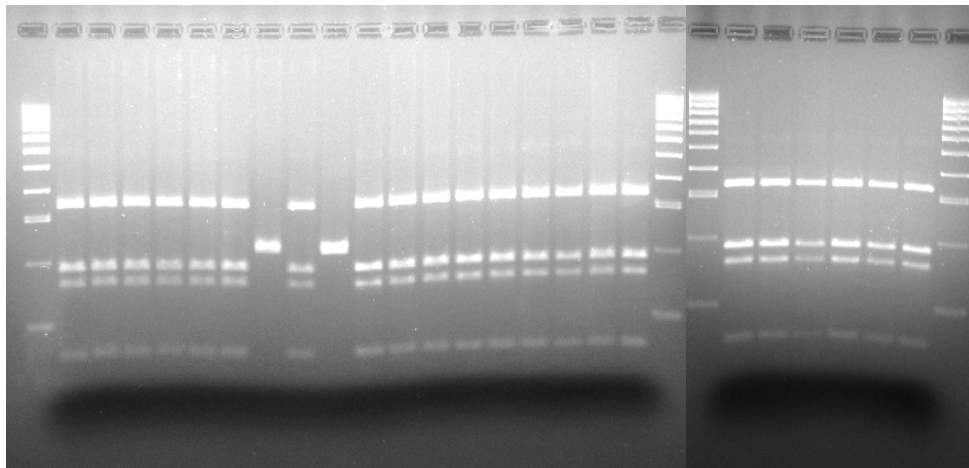


Figura 20 | Resultado gel electroforesis después de realizar digestión enzimática con *HinfI* a las 24 colonias de las muestras CAR_DMO_INI, donde: Carril 1-6, 8, 10-24 con un perfil de pares de bases (pb) de 50+180+200+350 corresponde a *Hansienespaora uvarum* (secuenciada la colonia 1 con un 96,21% de similitud) y Carril 7, 9 con un perfil de 230 pb representa *Candida zempilina* (secuenciada colonia 7 con un 99,49% de similitud). No se muestra en este trabajo, pero el perfil obtenido de la amplificación mediante PCR con primers ITS1-4 es de 780 pb para las colonias 1-6, 8, 10-24 y de 480 pb para las colonias 7 y 9.

5. Ejemplo de secuencia de la muestra CAR_AMO_MIT_1



Figura 21 | Secuencia de la muestra CAR_AMO_MIT_1 obtenida por la empresa Macrogen Spain, Madrid. El BLAST ha permitido determinar que esta muestra corresponde a la especie *Hansienespaora uvarum* con un 98,74% de similitud.