

El singular mundo de las levaduras enológicas

Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Esther Rodríguez Jiménez

Laboratorio de Microbiología Enológica. Facultades de Ciencias.

Universidad de Cádiz. 11.510 Puerto Real (Cádiz)

jesusmanuel.cantoral@uca.es

mariaesther.rodriguez@uca.es

UN POCO DE HISTORIA

Las levaduras han formado parte de la civilización humana desde tiempos remotos. Las evidencias más antiguas datan del Neolítico; se han encontrado restos de hace 7400-7000 años correspondientes a sales tartáricas y resinas en algunos ejemplares de cerámica de aquella época. El ácido tartárico sólo está presente en las uvas en grandes cantidades y se ha postulado que la resina, concretamente del árbol *Pistacia*, se añadía como un conservante antibacteriano, suponiendo este hecho una fuerte evidencia sobre procesos de vinificación en aquel periodo prehistórico.

También se han descubierto evidencias de vinos hechos en Egipto y Fenicia hacia el año 5000 a.C. Investigadores actuales han demostrado que el ADN aislado de un supuesto jarro de vino de Abydos (3150 a.C.), tenía una secuencia estrechamente relacionada con el genoma de levadura modernas (*Sacharomyces cerevisiae*). La revelación del proceso de elaboración se atribuye a Osiris, entre los egipcios, y a Dionisios, entre los griegos. Los hebreos afirman que fue Noé el primero en cultivar la vid, y el vino siempre ha ocupado un lugar preeminente entre sus ritos y costumbres, así como en las fiestas de los primitivos griegos y romanos.

A su vez, los chinos fueron expertos conocedores del arte de fermentar el mosto de la uva y los primeros en reglamentarlo. En el año 2285 a.C. un hombre fue castigado severamente por mezclar vino de uva con licor de arroz. Hacia el año 2000 a.C. el vino empezó a producirse en Grecia y Creta. Más tarde, los romanos extendieron la vinificación por todo el Mediterráneo y en el 500 a.C. el vino empezó a producirse en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y norte de África. Los cultivos de vides también se extendieron por los Balcanes y los romanos los extendieron hacia Alemania y otras partes del norte de Europa hasta alcanzar la Bretaña.

Ya en el siglo XVI, la viticultura se practicaba ampliamente en Francia, siendo uno de los mayores productores mundiales. Pero surgieron problemas: había que buscar la forma de evitar que la fermentación secundaria, producida en el vino de champagne después de embotellado, explotara. El tapón hasta entonces utilizado estaba formado por tejido de lana y lacre. Fue el monje Dom Perignon (1638-1715) quien introdujo la utilización del corcho, técnica que había aprendido de los españoles, junto con una botella de mayor grosor. Con eso, la segunda fermentación pudo desarrollarse normalmente, dando origen al champagne. Fue entonces cuando el monje pronunció

su conocida exclamación: “¡Venid rápido hermanos, estoy bebiendo estrellas!”

Durante el siglo XVI, los exploradores europeos introdujeron la vid en el Nuevo Mundo y en el siglo XVII, los colonizadores alemanes lo implantaron en el sur de África. Posteriormente, en 1697, se extendió la vinificación a California, y más de un siglo después a Australia y Nueva Zelanda. En España, no sabemos con seguridad en qué lugar comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid, ni quienes fueron los introductores de las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral sudoccidental andaluz, constituyendo el punto de entrada y la zona geográfica de las viñas españolas más antiguas.

Esta teoría está avalada por la presencia de los fenicios en la Península hace unos 3000 años aproximadamente. Este pueblo comerciante fundó un puerto en el sudoeste al que llamaron Gades (Cádiz, en la actualidad). Después, se trasladaron hacia el interior, plantando vides en las montañas circundantes. Concretamente, en las Ruinas del Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María) se han encontrado restos de lo que podrían haber sido lagares de elaboración de vino, que datan del siglo IV a.C.

El vino que se producía en esta región llamada de Ceret (Jerez) se elaboraba cociendo el mosto recién fermentado para obtener altas graduaciones alcohólicas y poder así resistir el transporte hacia el Mediterráneo. A estos vinos se les añadía agua para su consumo y presentaban muchas impurezas porque la fermentación era imperfecta, razón por la que se les añadía ámbar, pez, resinas, etc. Hacia el año 138 a.C. comenzó la dominación romana, iniciándose una corriente comercial muy importante de productos de esta región hacia la metrópoli. En el año 711 da comienzo la dominación árabe, que en el sur de España duró más de cinco siglos. Durante todo ese tiempo, la zona sudoccidental siguió siendo un importante centro de elaboración de vinos, a pesar de la prohibición coránica. La producción de pasas y la obtención de alcohol con fines medicinales actuaban en cierta forma como excusas para el mantenimiento del cultivo de la vid y de la elaboración de vinos, hasta que la conquista por Alfonso X el Sabio en 1264 supuso un gran cambio para los vinos de esta región.

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras. Aquellos primitivos viticultores se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y luego dejar el zumo (llamado mosto) fermentar, ya que

Jesús Manuel Cantoral Fernández

(Vega de Monasterio, León, 1955) es licenciado en Biología por la Universidad de León. Realizó la Tesis Doctoral (1988) con el Dr. Juan Francisco Martín en distintos aspectos moleculares del hongo *Penicillium chrysogenum*, completando su formación en las Universidades de Bristol (U.K.), Berlín (Alemania) y Washington (Seattle, EEUU). En el año 1991 se incorpora a la Universidad de Cádiz creando el grupo de "Microbiología Aplicada" centrando sus trabajos en levaduras enológicas, tanto de vinos jóvenes como sometidos a "crianza biológica", así como en hongos fitopatógenos. En el año 2003 obtiene una cátedra de Microbiología en la Universidad de León y posteriormente en el 2007 en la de Cádiz, donde continúa dirigiendo el grupo de investigación. Desde el año 2008 es Director del Departamento de "Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública", siendo nombrado en el año 2009 Académico Correspondiente de Mérito de la Real Academia de Medicina de Cádiz.



la superficie de las uvas contiene células de levadura preparadas para llevar a cabo la fermentación: **"Me gustaría imaginar el momento, perdido en la noche de los tiempos, cuando un desconocido morador de cuevas, quizás un oscuro benefactor del fructífero reino de Mesopotamia, felizmente descubrió que los zumos de frutas son mucho más sabrosos si se dejan reposar un tiempo. Quizás al mismo tiempo, algunos ancestros fermentadores desconocidos de *Saccharomyces cerevisiae* hicieron que su fortuita supervivencia fuera mejorada por la asociación con el hombre, y decidieron dejar al inseguro medioambiente y convertirse en el primer microorganismo domesticado"** (A. Vaughan y A. Martini, 1995).

Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación, no fue desarrollado hasta 7000 años más tarde, gracias a los trabajos de Pasteur (1872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana. Al saber que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los vinificadores pudieron controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta de embotellamiento.

Con el posterior desarrollo de las técnicas microbiológicas, las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de "fermentación inoculada" empleando cultivos puros de levaduras. Como resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros análisis genéticos de levaduras comenzaron a mediados de la década 1930-1940, con la introducción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos con fines investigadores, ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas estándar (o de referencia) de laboratorio. La gran mayoría deriva de un aislamiento realizado por Emil Mrak a partir de higos en descomposición en Merced, (California, 1938). Dicho aislamiento, conocido como EM93, corresponde a una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C, secuenciado en el año 1996.

BIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetos y levaduras basidiomicetos (en ambos casos se dan las formas teleomórfica y anamórfica). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca.

Saccharomyces cerevisiae posee un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse en estadios haploides o diploides, con la formación de cigotos entre células haploides compatibles. El tipo de reproducción es normalmente por brote o gemación mediante mitosis (asexual). Sin embargo, bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, una célula diploide genera cuatro esporas haploides encapsuladas en el asca (ascosporas). A su vez, las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un cigoto diploide mediante conjugación.

Existen tres tipos de células vegetativas en función del tipo sexual, llamadas *a*, α (ambas haploides) y *a*/ α (diploides). Las células del tipo *a* y α se conjugan entre sí para dar lugar a cigotos de tipo *a*/ α , cuya eficiencia de apareamiento es mucho más alta que entre las del mismo tipo (que es muy baja o no se da). Los tipos sexuales en *S. cerevisiae* están controlados por un locus en el cromosoma III, llamado MAT (del inglés *mating type*, apareamiento) pudiendo aparecer dos alelos, *a* y α . Las cepas que pueden mantenerse estables durante muchas generaciones como haploides, siendo *a* ó α se llaman heterotálicas. Las cepas homotálicas son aquellas en las que se induce el cambio en el tipo (*a* cambia a α y viceversa) y la unión, para formar un cigoto, se realiza entre células que proceden de una misma espورا, de manera que la célula madre es la que cambia el tipo y se une con una célula hija de tipo opuesto para dar un diploide *a*/ α . La mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son por lo general diploides y homotálicas y resulta difícil que en ellas se induzca la esporulación y por tanto la reproducción sexual.

El material genético de las levaduras se reparte entre el genoma nuclear, genoma mitocondrial y plásmidos citoplasmáticos. Además, el citoplasma puede contener dos moléculas de ARN bicatenario, que confieren a la levadura el llamado "factor killer". El ADN cromosómico en una célula diploide de *S. cerevisiae* constituye alrededor del 80% del total, con un tamaño estimado de 2×10^4 kilobases (kb) que se reparte entre 32 cromosomas lineales (16 pares de cromosomas), cuyos tamaños oscilan entre 200-2200 kb, aproximadamente. El cromosoma más grande es el XII, siendo además el más variable debido a que contiene el ADN ribosómico; es decir, genes que codifican para las distintas subunidades de ARN ribosómico: 25S, 18S, 5.8S y 5S, que forman parte estructural de los ribosomas. Estos genes ribosómicos, se encuentran repetidos en tándem alrededor de 100 veces en el cromosoma XII.

El ADN mitocondrial está constituido por un sólo cromosoma circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 75-85 kb. Como ocurre con la mayor parte de las mitocondrias, en el caso de las levaduras existen muy pocas proteínas necesarias para las mitocondrias y que sean codificadas por ellas. Existe una clase de mutantes mitocondriales denominados *petite*, en los que la

mayor parte de la síntesis de proteínas mitocondriales está abolida debido a largas delecciones en el ADN mitocondrial. Tales mitocondrias no son funcionales y las levaduras que las contienen son incapaces de realizar la respiración aunque pueden crecer anaeróbicamente (fermentación). En la especie *S. cerevisiae* se ha puesto de manifiesto la existencia de un plásmido de ADN bicatenario circular de 2 μm de tamaño que contiene aproximadamente 6,3 kb y que se presenta en un número de entre 60 y 100 copias en el citoplasma.

Además, en el citoplasma, pueden aparecer dos moléculas lineales de doble cadena de ARN que están relacionadas con una toxina o “factor killer”. Estas dos moléculas de ARN son de diferente peso molecular y se denominan L y M. El tamaño del genoma de L es de 4.5 kb, mientras que el segmento M varía entre 1.3 y 2 kb. M codifica para dos tipos de proteínas, una toxina y un factor inmunitario, y L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas.

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K_1 , K_2 , K_3 , K_{28} y K_{3GR1} , siendo K_1 la de mayor agresividad, aunque no se considera importante en vinificación porque su óptimo de actividad se encuentra a un pH de 4.6-4.8. En cuanto a K_3 y K_{3GR1} , parece ser que son variantes del tipo K_2 . Las cepas killer aisladas de la fermentación son generalmente del tipo K_2 y K_{28} , debido probablemente a que el bajo pH óptimo para la actividad de estas toxinas se encuentra en el mosto (pH 2.8-3.8). Las levaduras vínicas silvestres (indígenas) con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo. La presencia de estas levaduras en el mosto y posteriormente en la fermentación puede significar un problema en las fermentaciones que son inoculadas con levaduras seleccionadas, ya que si el inóculo está preparado con levaduras sensibles, como son muchas de las levaduras comerciales, pueden llegar a ser suprimidas por las cepas killer durante la fermentación. Como consecuencia se pueden producir fermentaciones lentas o incluso paradas, y aumentar la acidez volátil, la producción de H_2S y aromas indeseables.

PROCESOS DE VINIFICACIÓN. SELECCIÓN DE LEVADURAS

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto, obtenido tras el prensado de las uvas, se clarifica y se corrige adicionando ácido tartárico. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas distintas especies de levaduras, las cuales metabolizan el azúcar del mosto generando etanol y dióxido de carbono. La reacción química más simple de la fermentación fue la propuesta por Gay-Lussac, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están implicadas al menos 12 reacciones distintas y diversos productos secundarios. Tras la fermentación se obtienen vinos con una graduación de 11° en grado alcohólico (v/v).

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de las distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En la primera fase cuando el grado alcohólico es bajo predominan levaduras de diversos géneros como *Kloeckera*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Rodotorula*, *Kluyveromyces*, etc. Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación pero a medida que ésta avanza y aumenta el grado alcohólico son desplazadas por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo las cepas de la especie *S. cerevisiae* las principales responsables de la fermentación. Es esa diversidad de cepas de levaduras la que aporta al vino la complejidad y tipicidad en las características sensoriales.

María Esther Rodríguez Jiménez

(Puerto de Santa María, Cádiz, 1971) es licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz. Realizó la Tesis Doctoral con los Drs. Jesús Manuel Cantoral y Laureana Rebordinos con el título “Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas” (2007). Sus trabajos se han centrado en la caracterización de levaduras enológicas mediante el uso de técnicas moleculares y posterior selección para el uso como levaduras iniciadoras de la fermentación, así como su seguimiento e implantación en el proceso de vinificación, mejorando sustancialmente las propiedades organolépticas del vino y garantizando sus peculiaridades de producción. En la actualidad se encuentra realizando una estancia postdoctoral en el CSIC-IATA de Valencia bajo la supervisión de los Drs. Emilia Matallana y Agustín Aranda.



Las fermentaciones espontáneas pueden aportar alta calidad a los vinos con un carácter típico de la región donde se producen, proporcionándoles así diferenciación y un valor comercial añadido (Fleet, 2008). El inconveniente de estos procesos naturales es que son impredecibles, pudiéndose producir inicios tardíos, paradas o fermentaciones lentas o proliferación de levaduras contaminantes u otras indígenas que no aporten al vino las características deseadas. Aún así, en numerosas bodegas tradicionales europeas se siguen realizando fermentaciones espontáneas utilizando una adecuada combinación de conocimientos artesanales y tecnológicos que aseguran el éxito del proceso. Una alternativa a las fermentaciones espontáneas son las fermentaciones inoculadas a partir de cultivos iniciadores preparados con levaduras seleccionadas. Normalmente estas levaduras están disponibles en el mercado en forma de concentrados secos activos (levaduras secas activas, LSA) y su uso en la mayoría de las bodegas se ha convertido en una práctica habitual para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año. Sin embargo, la utilización de estas levaduras, normalmente foráneas de la zona productora, presenta algunos inconvenientes como es la pérdida en la tipicidad de los vinos.

Todos estos aspectos están proporcionando nuevos retos para mejorar las cualidades y valor de los vinos obtenidos con fermentaciones inoculadas. Uno de estos retos es la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) en una zona productora determinada, y otro es la utilización de cultivos iniciadores mixtos como alternativa al uso de cultivos puros.

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo la selección de levaduras autóctonas para la mejora de un vino blanco elaborado por Bodegas Barbadillo S.L. en Sanlúcar de Barrameda. El estudio implicó, primero caracterizar la diversidad de cepas presentes en la fermentación espontánea, para tener un mayor conocimiento de las cepas más representativas del proceso y posteriormente evaluar las características enológicas de esas cepas en condiciones de laboratorio.

Las técnicas moleculares que permiten la caracterización de levaduras industriales y discriminan entre las distintas cepas son habitualmente la electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Figura 1) y el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (Figura 2).

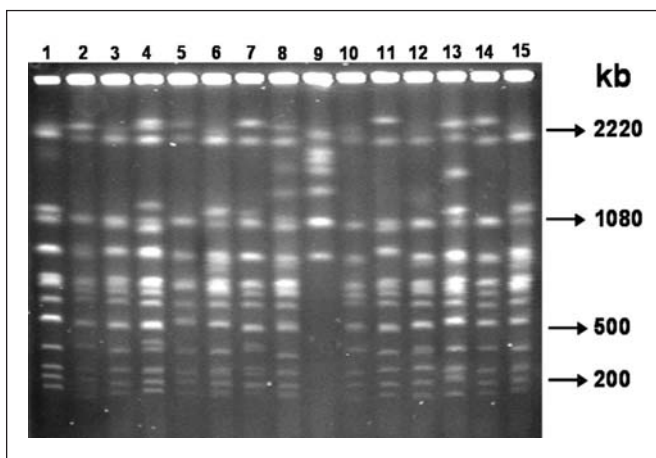


Figura 1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE). Cariotipo electroforético de 15 cepas de levaduras autóctonas aisladas de la fermentación espontánea en la cosecha del año 1999. El aislamiento 9 corresponde a una levadura no-*Saccharomyces*, detectada por no presentar las cuatro bandas típicas de *S. cerevisiae* presentes por debajo de 500 kb en el gel de electroforesis.

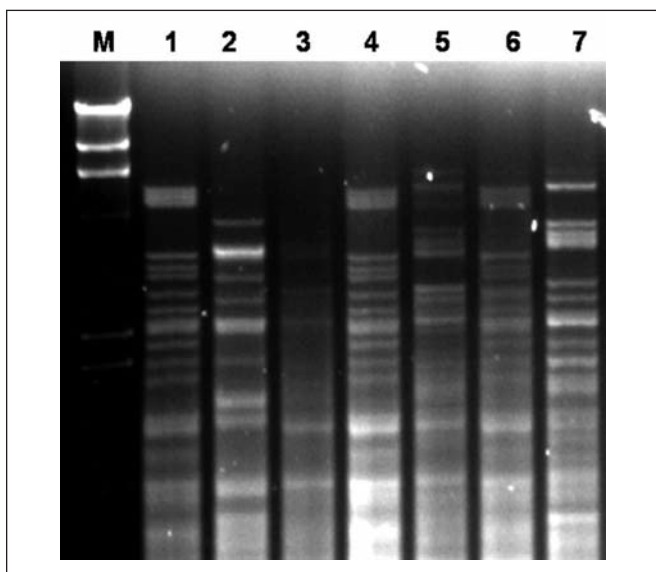


Figura 2. Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial. Perfiles de restricción del ADN mitocondrial de distintos aislamientos de levaduras (1-7) para la enzima de restricción *HinfI*. M corresponde al marcador λ -*HindIII*.

La primera técnica analiza el número y tamaño de los cromosomas de las levaduras y la segunda mide variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial afectado por los sitios de corte de determinadas endonucleasas de restricción.

Tras seleccionar tres levaduras autóctonas y probarlas en condiciones industriales en varias campañas, comprobamos, mediante cariotipo electroforético, que no todas fueron buenas competidoras en las fermentaciones y sólo una de ellas se encontraba de forma mayoritaria en las fermentaciones, de manera que posteriormente sólo utilizamos esta levadura para inocular las fermentaciones. En los años en los que esta levadura fue predominante, los vinos obtenidos fueron de mejor calidad.

En nuestra opinión, para asegurar el buen desarrollo de la levadura inoculada durante el proceso, es necesario que el cultivo iniciador esté bien adaptado a las condiciones finales de fermentación. Uno de los criterios a tener en cuenta en la preparación del inóculo iniciador sería por ejemplo esperar a que tuviese un contenido en azúcar bajo, de esta forma al adicionarlo al mosto, el medio quedaría parcialmente alcoholizado evitando así el desarrollo de levaduras no deseadas que normalmente están presentes en el mosto (Rodríguez *et al.*, 2010).

LAS LEVADURAS DE “VELO DE FLOR” DE LOS VINOS DE “CRIANZA BIOLÓGICA” (FINOS Y MANZANILLAS)

Las levaduras de “velo de flor” son las responsables del proceso de “crianza biológica” (Figura 3) de los vinos producidos en el marco de Jerez y Sanlúcar de Barrameda en la provincia de Cádiz y de Montilla-Moriles en la de Córdoba, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo, como Sudáfrica, California, Cerdeña o Hungría. Estas singulares levaduras, constituyen un caso especial de levaduras vínicas que aparecen al final de la fermentación alcohólica del vino, formando una biopelícula en la superficie que se denomina “velo de flor” ya que aparecen de manera especial en primavera (periodo de la floración). El “velo de flor” surge de forma espontánea como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras desarrollarse en un medio en el que están obligadas a asimilar etanol y glicerol mediante respiración, que son las principales fuentes de carbono una vez agotados los azúcares fermentables. Estas levaduras son las únicas capaces de desarrollarse en el vino tras el proceso de encabezado (adición de alcohol vínico hasta llegar a una concentración de etanol del 15-15,5 %).

La crianza del fino en el Marco de Jerez, tiene un primer periodo de envejecimiento estático en botas o depósitos (sobretablas), a continuación se somete al proceso de envejecimiento dinámico mediante el sistema de criaderas y solera. Este sistema consiste en una serie de filas de botas de roble (600 litros de capacidad), cada una de las cuales contiene vino del mismo tipo y con el mismo grado de crianza (escala). Las botas no se llenan por completo, se deja vacía una sexta parte de su capacidad, lo que genera una amplia superficie y una cámara de aire que permite el desarrollo de estas levaduras filmógenas en dicha superficie. En la fila más próxima al suelo está el vino más viejo (1ª escala o solera), de donde se extrae el vino (saca) para el embotellado. Las botas de la solera se rellenan (rocío) con vino de la fila superior (2ª escala o 1ª criadera), que se rocían a su vez con vino de la siguiente (3ª escala) y así sucesivamente con una serie de escalas hasta llegar a las sobretablas, que se rellenan con vino nuevo (15 % etanol) (Figura 4). Entre las diversas transformaciones de interés enológico que las levaduras de flor producen sobre la composición del vino destaca la liberación de acetaldehído, que es producido directamente mediante oxidación de etanol como primer paso para su asimilación. El acetaldehído aporta al vino el olor punzante y característico del fino, por lo que se considera su concentración en el vino como un índice del grado de crianza. Además, el acetaldehído es punto de partida de numerosas reacciones que se producen durante el envejecimiento y que contribuirán decisivamente al buqué y color que definen a los finos.

Se han realizado múltiples trabajos para caracterizar las levaduras de velo de flor, en los cuales se pone de manifiesto que en las barricas de crianza aparecen casi exclusivamente levaduras de la especie *S. cerevisiae*, aunque se pueden diferenciar cuatro grupos según pruebas de asimilación y fermentación de azúcares

Figura 3. Proceso de Vinificación. Proceso de vinificación representando el conjunto de operaciones que se realizan desde la recogida de la uva en el viñedo hasta la obtención de los distintos tipos de vinos. Tras la fermentación alcohólica, se obtienen vinos jóvenes con 11° alcohólico (v/v). La adición de alcohol a estos vinos hasta obtener 18° permite obtener los vinos olorosos bajo crianza físico-química; mientras que la adición de alcohol hasta 14-15° permite la obtención de finos y manzanillas bajo crianza biológica.

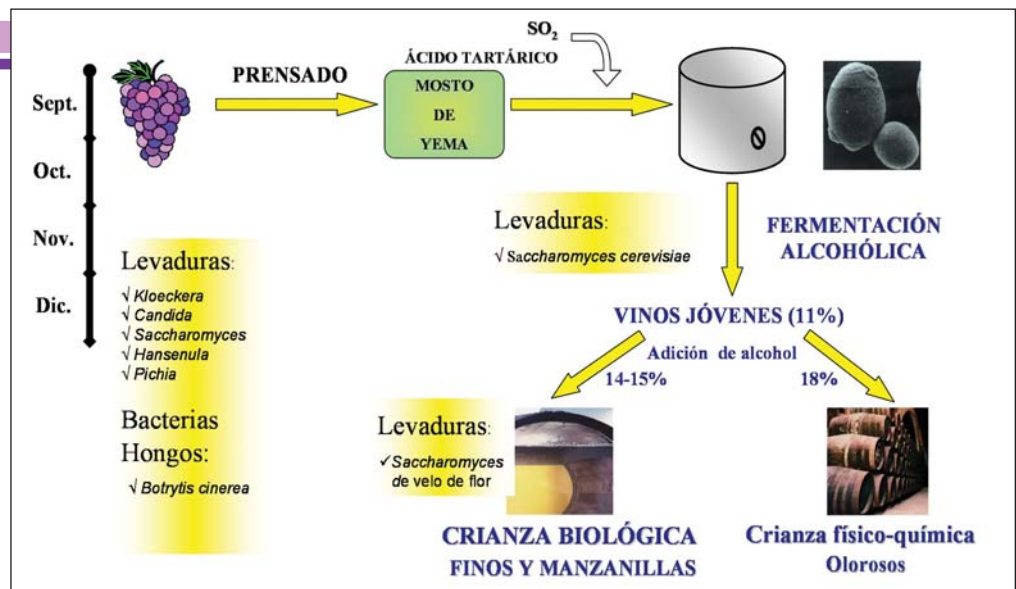


Figura 4. Crianza Biológica
 Izquierda: Dinámica del proceso de envejecimiento del vino fino mediante criaderas y solera (la más cercana al suelo). Derecha: Aspecto de la película (biofilme) de levaduras de velo de flor formada en la superficie del vino durante la crianza biológica. Estas levaduras tienen dos funciones principales: i) contribuir con su metabolismo a las características organolépticas de los finos y manzanillas y ii) aislar al vino del aire evitando así que se oxide.



que se catalogan como razas fisiológicas: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras, concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estos organismos a condiciones industriales tan específicas. Nuestro grupo ha llevado a cabo una amplia caracterización de estas levaduras en un sistema dinámico de envejecimiento del vino de “criaderas y solera” utilizando las técnicas moleculares de PFGE y los RFLP-ADNmt, descritas en el apartado anterior, llegándose a establecer una correspondencia entre un determinado tipo de levaduras presentes en el velo y el estado de envejecimiento del vino (Mesa et al., 1999, 2000)

Las levaduras de velo de flor tienen una presencia constante en la bodega (desde que se comenzó la crianza biológica de vinos hace unos 200 años) y se encuentran sometidas a una fortísima presión de selección que incluye su crecimiento en presencia de grandes cantidades de etanol (15-15,5%) y acetaldehído (200-800 mg/L), dos inhibidores del crecimiento celular con demostrada actividad mutagénica. Por ello, estas levaduras son de especial interés para la realización de estudios de evolución cromosómica. En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio novedoso del polimorfismo cromosómico al comparar dos cepas de levaduras industriales mediante el uso de “chips” de ADN (*microarrays* o *micromatrices*) de *S. cerevisiae*, que ha puesto de manifiesto los mecanismos específicos de recombinación y las secuencias afectadas por éstos, que posibilitan la evolución de estas cepas indus-

triales y su adaptación al ambiente (Infante et al., 2001). La hibridación comparativa del genoma entre estas dos cepas de velo de flor puso de manifiesto que ambas poseen amplificaciones de grandes regiones genómicas. Las amplificaciones responden a fenómenos de reorganización cromosómica mediados por puntos calientes de recombinación estratégicamente situados en el genoma. Además, los “amplicones” contienen genes clave para la adaptación de las levaduras de flor al ambiente extremo en el que se desarrollan, y muchos de ellos se encontraron sobreexpresados al comparar el transcriptoma de dichas cepas con cepas de laboratorio no adaptadas al ambiente industrial.

Estos resultados proporcionaron evidencias de que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como un mecanismo general de evolución adaptativa para las levaduras que crecen en ambientes muy selectivos. De manera que los agentes químicos como el etanol y el acetaldehído, presentes en altas concentraciones en el medio, provocan roturas de la doble hélice de ADN en puntos sensibles del genoma de las levaduras. La reparación de dichas roturas por mecanismos alternativos a la recombinación homóloga genera grandes reorganizaciones cromosómicas que dan lugar, tras la división mitótica, a cambios en el genoma que permiten la aparición de cepas mejor adaptadas al ambiente. La caracterización de los mecanismos de evolución adaptativa del genoma de estas levaduras de velo de flor fue la primera vez que se realiza en levaduras industriales y ha proporcionado un modelo de evolución genómico global íntimamente ligado a la influencia ambiental que puede ayudar a comprender los modelos de evolución actuales (Infante et al., 2003).

LEVADURAS ENOLÓGICAS, VINO Y SALUD

Hablar de levaduras enológicas conlleva tratar, al menos escuetamente, algunos aspectos más interesantes sobre el vino y la salud. A fin de cuentas como ya dijera el Dr. Gregorio Marañón **“Vivir, es defenderse de la vida que nos va matando. En esta lucha, la eficacia del vino es incalculable”**.

Se podría definir el vino, de manera sencilla, como una solución hidroalcohólica ácida (3, 4 unidades de pH), conteniendo una dispersión coloidal acuosa con más de 500 sustancias, minerales, orgánicas, en estado sólido, líquido y gaseoso, de las cuales más de un centenar son volátiles y olorosas. El contenido de etanol en el vino oscila entre 90 y 150 mL por litro, dependiendo de la variedad de uva, tipo de vinificación y zona de producción, principalmente.

Aunque los beneficios saludables del vino han sido experimentados y reconocidos desde hace siglos, muchas de sus propiedades sólo han sido estudiadas con rigor y desveladas hace relativamente poco tiempo. Cada vez se conocen más efectos beneficiosos del vino en materia de nutrición y salud, especialmente los relacionados con el sistema cardiovascular. Esta actividad de prevención biológica del vino está justificada por su contenido, en concentraciones significativas, de diversos compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, resveratrol, etc.) que tienen una gran capacidad protectora de las lipoproteínas LDL frente a la oxidación.

En 1991 los Drs. Curt Ellison (Boston) y Serge Renaud (Lyon) presentaron un llamativo informe sobre lo que se ha venido llamando **“la paradoja francesa”**. Así, concluyeron que la menor mortalidad cardiovascular de los franceses se debía a su consumo diario de 300 a 400 mL de vino. En efecto, a pesar de tener iguales niveles de colesterol en sangre, la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares en Francia supone un tercio de la observada en EEUU. Esta revelación desencadenó gran interés en todo el mundo por confirmar el papel beneficioso del vino consumido regularmente y con moderación, y por describir su modo de acción en el organismo, por ejemplo, contribuyendo a evitar la aglutinación de las plaquetas sanguíneas. El consumo moderado reduce en un 20% el riesgo de cáncer, infarto de miocardio y accidentes vasculares cerebrales.

La mayoría de las sustancias beneficiosas se acumulan en el hollejo de la uva. El vino tinto es más conveniente que el vino blanco debido a su proceso de elaboración, ya que el mosto se maceira con la piel y las pepitas, permitiendo que las sustancias saludables que contiene la piel de la uva pasen al vino. Además, la uva negra es más rica en taninos. La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles.

En los últimos años, estudios científicos muestran que la ingesta comedida de vino es beneficiosa para nuestra salud, en especial para la prevención de enfermedades coronarias. Por supuesto, los beneficios para la salud derivados del consumo de vino en la dieta sólo se producen si hay un consumo prudente. Hábito que corresponde a un estilo de vida y a una cantidad recomendable por persona.

Asimismo, las bebidas alcohólicas elevan los niveles sanguíneos de colesterol HDL, conocido como “colesterol bueno”, porque remueve el exceso de colesterol del organismo, y disminuyen la tendencia de la sangre a coagular evitando la formación de trombos. Como ya se ha dicho, los compuestos antioxidantes del vino, son los responsables de disminuir la oxidación de las LDL (partículas de lipoproteínas de baja densidad o “colesterol malo”).

Este conjunto de observaciones, implica el redescubrimiento del valor medicinal de las bebidas alcohólicas que existía en la antigüedad, lo que no es una sorpresa para los estudiosos de

la historia del uso de alcohol. Antecedentes históricos y culturales, relacionan vino con salud y longevidad y existen numerosos testimonios que señalan que el vino, en especial en la cultura mediterránea, ha estado siempre asociado con efectos provechosos para la salud.

Recientemente, ha surgido un nuevo término asociado al vino: **“el enoturismo”**. El vino no se vende sólo, sino que, en gran medida, está asociado a la imagen del país o zona que lo produce. El beneficio del turismo se ha comprobado en varias experiencias internacionales, como es el caso del Napa Valley, situado en la costa de California en EEUU. Este valle es conocido mundialmente, no sólo por la excelente calidad de sus vinos, sino por la gran industria paralela dedicada al ocio que se mueve en torno a sus viñedos, no en vano recibe cerca de 8 millones de visitantes cada año. Otro ejemplo ilustrativo proviene de Australia que, gracias a una acertada campaña de promoción turística del país, evoca un ambiente de sol, playas, y ocio. Aquí, en España, numerosas bodegas han recuperado antiguas mansiones, palacios, castillos y edificios históricos, o bien modernos arquitectos diseñan bodegas llamativas por su arquitectura vanguardista, convirtiendo el mundo del vino en un foco de turismo, ocio y bienestar. A fin de cuentas y como certeramente afirmara el ilustre sir Alexander Fleming **“Es la penicilina la que cura a los humanos, pero el vino es el que los hace felices”**. Frase ligeramente modificada con motivo de su visita a las bodegas jerezanas en el año 1948, cuando después de degustar las bondades de estos vinos generosos dijo: **“Si la penicilina salva a los enfermos, el oloroso resucita a los moribundos”**.

AGRADECIMIENTO

A los compañeros que con su trabajo han forjado la pequeña historia del grupo de Microbiología Enológica de la UCA: Laureana Rebordinos, Juan José Mesa, Juan José Infante, Paco Deben, M^a Luisa Espinazo y a las últimas incorporaciones: Eugenia Muñoz y Paula Arместo. También a los Proyectos que lo han sostenido: 1FD97-0820-C04-04, J.A. ATT-03-2003, PETRI 95-0855 OP, así como la valiosa colaboración (OTRI) con las Bodegas Sandeman-Copri-mar y Barbadillo S.L.

BIBLIOGRAFÍA

- Fleet GH. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, **8**: 979-995.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2001. Whole genome characterization of flor vellum wine yeast variants of *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarrays. *Yeast*, **18**-S1 (16-09). XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology: Biotechnology and Industrial Applications.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, **165**: 1745-1759.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L y Cantoral JM 1999. Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *Food Science and Technology*, **32**: 114-120.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA y Cantoral JM. 2000. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **5**: 15-21.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Reboordinos L y Cantoral JM. 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J Appl Microbiol*, **108**: 1292-1302.
- Vaughan-Martini A y Martini A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol*, **14**:514-522.