



Facultad de Ciencias

Grado en Enología

**“Estudio de levaduras de velo de flor procedentes de diferentes
bodegas del Marco de Jerez”**



- Departamento: Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública
- Director del Trabajo Fin de Grado: Jesús Manuel Cantoral Fernández
- Co-Directora del Trabajo Fin de Grado: Marina Ruiz Muñoz
- Autor del Trabajo Fin de Grado: Alfredo García Gómez

Puerto Real, 14 de julio de 2020

Fdo:

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Alfredo García Gómez'. The signature is written in a cursive style and is positioned to the right of the 'Fdo:' label.

Agradecimientos

Muchas gracias a mi familia por permitirme estudiar una carrera y ser flexibles conmigo respecto a mi manera de afrontar las cosas.

Muchas gracias a todos mis compañeros y amigos que me han ayudado a llegar hasta aquí.

Muchas gracias al Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública por permitirme realizar mi trabajo de Fin de Grado enfocado al área de Microbiología, me sentí muy integrado en el Departamento y gracias a ellos he tenido una aproximación al trabajo diario y funcionamiento de un laboratorio de Microbiología.

Muchas gracias a mi tutor Jesús Manuel Cantoral Fernández y especialmente, muchas gracias a mi co-tutora Marina Ruiz Muñoz, sin ella este trabajo de fin de grado no sería posible, gracias por tu increíble dedicación y profesionalidad en tu trabajo.

Finalmente gracias a las bodegas del Marco de Jerez que permitieron y colaboraron con la realización de este trabajo de Fin de Grado.

Índice

1. Resumen.....	7
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	9
3.1. Características del Marco de Jerez.....	9
3.2. Vinificación tradicional en el Marco de Jerez.....	10
3.3. Identificación y caracterización de las levaduras de velo de flor.....	14
4. Objetivos.....	17
5. Material y Métodos.....	18
6. Resultados y discusión.....	24
7. Conclusión.....	32
8. Perspectiva de futuro.....	33
9. Bibliografía.....	34
10. Apéndices.....	39

1. Resumen

El velo de flor es un *biofilm* que se forma en la superficie de los vinos llevando a cabo el proceso de crianza biológica. Este velo está compuesto mayoritariamente por levaduras con cierta hidrofobicidad capaces de formar agregados lo que les permite situarse en la superficie de los vinos como el Fino y la Manzanilla, fortificados con hasta 15.5% de alcohol y en presencia de oxígeno. El sistema de crianza biológica puede ser gestionado en el Marco de Jerez de varias formas, el sistema de envejecimiento dinámico de “criaderas y soleras” y el sistema de envejecimiento biológico en estático de “añadas”.

El velo de flor ha sido sujeto a numerosos estudios, pero su composición no está del todo clara. Mayoritariamente se compone de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* las cuales han sido clasificadas tradicionalmente basándose pruebas fisiológicas y bioquímicas en cuatro razas: beticus, cheresiensis, montuliensis y rouxii. Utilizando técnicas moleculares que permiten la distinción entre cepas de levaduras pertenecientes a *S. cerevisiae* se da lugar a otras clasificaciones más precisas que sustituyen las logradas por los métodos tradicionales.

En este trabajo se han amplificado tres regiones *loci* de gran polimorfismo mediante PCR en levaduras de velo de flor aisladas en un total de nueve botas distribuidas en dos bodegas diferentes del Marco de Jerez que utilizan diferentes sistemas de envejecimiento biológico, estático y dinámico, en las cuales se realizó un muestreo único. De esta forma, se ha encontrado un total de 5 genotipos de *S. cerevisiae* distribuidos de formas diferentes tanto en las botas como en las bodegas muestreadas. Estas diferencias se han evidenciado en la diversidad de genotipos y en su proporción relativa, encontrando que en la bodega que sigue el sistema dinámico se encuentra una mayor diversidad de genotipos y una mayor variabilidad de distribución en las botas. Por otro lado en el sistema estático se da la posibilidad de la proliferación de velos de flor de genotipos puros.

2. Abstract

The veil of flor is a biofilm which grown on the wine surface, carrying out the biological aging process in these wines. This velum consists of different microorganisms which are able to grow up over wines with 15-15.5% alcohol and in the presence of oxygen, in wines such as Manzanilla or Fino. There are two different systems to apply the biological aging, by following the “criaderas y soleras” dynamic system or using the static “añada” system.

The veil of flor has been studied in many cases but its composition is still unknown at all. *Saccharomyces cerevisiae* is the most found yeast in the veil of flor and it has traditionally been classified into four different races based on their physiological behavior.

In order to improve these identifications, the molecular methods, based on DNA, were started to apply to flor strains. In this work, three polymorphic loci were simultaneously amplified by PCR on flor yeast from two different wine cellars in the Marco de Jerez. The analyzed wineries have different management about the biological aging, the wine cellar A follow the dynamic system called “criaderas y soleras” and the wine cellar B follow the static “añada” system. Nine different casks were analyzed from the wine cellars, four from the winery A and five from the winery B. Thus, we could identify and compare different *S. cerevisiae* strains with each other. As a result of this work we found a variety of 5 genotypes, different for each wine cellar and how they were distributed in the casks, concluding that in the dynamic system a bigger biodiversity is found compared to the static system. In addition, the static system is possible to find genotype pure flor velum in some cask.

3. Introducción

La historia de la civilización es paralela a la de la vinificación. Según los historiadores, ya preparaban vino en el Cáucaso y Mesopotamia en el año 6000 a.C. También se registraron rastros en Egipto y Fenicia datados en el 5000 a.C., y por el 2000 a.C. el vino ya estaba siendo producido en Grecia y Creta. La colonización romana esparció la viticultura por todo el mediterráneo, así en el año 500 a.C. el vino ya se producía en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y el norte de África (Pretorius, 2000).

Respecto al Marco de Jerez, la historia data desde Xera, el nombre fenicio de la región, donde ya era bien conocido su vino en el Mediterráneo, atribuyéndole el nombre de “vino viajero”. Jerez era un pueblo de comerciantes que producía vinos para distribuirlos por todo el Mediterráneo, llegando hasta Roma. Griegos y cartagineses también escribieron páginas importantes en la historia de la región, que hunde así sus raíces en lo más profundo de la cultura mediterránea, la cultura del vino y de la moderación (Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen ‘Jerez-Xérès-Sherry’ - ‘Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda’ - ‘Vinagre de Jerez’, 2015)

3.1 Características del Marco de Jerez

El suelo del Marco de Jerez está compuesto de forma mayoritaria por albarizas. La albariza es una marga blanca compuesta principalmente por montmorillonita y carbonato cálcico, además podemos encontrar cuerpos silíceos de algas diatomeas entre sus componentes característicos, debido a su origen en las eras Mesozoica y Cenozoica, en la cual esta región formaba parte del fondo marino. Tiene una elevada retención de la humedad y aumenta la insolación sobre el fruto gracias a su color blanco (García Ramos & González García, 1970).

El clima del Marco de Jerez es templado con veranos secos y calurosos, denominado con la abreviatura “Csa”, según la clasificación de climas de Köppen para la Península Ibérica. El clima templado se denomina como Tipo C, donde la temperatura media del mes más frío está comprendida entre 0 y 18 °C. “Cs”, para

aquellos climas templados con un período marcadamente seco en verano. Y finalmente “Csa” si la temperatura media del mes más cálido es superior a 22 °C (AEMET & IPMA, 2011). Las precipitaciones se concentran en los meses de octubre, noviembre, diciembre y enero, con tan solo 52 días de media con precipitaciones al año. El verano es seco y caluroso, casi sin días de precipitaciones y con humedad relativa de entre 50 y 60 % (AEMET, 2010).

Desde antes de la llegada de la filoxera en el año 1878 a España, la variedad Palomino Fino de *Vitis vinífera*, ya era la mayoritaria en el Marco de Jerez, no es de extrañar que esta variedad autóctona fuese la elección predilecta a la hora de elaborar los injertos que reestablecerían los viñedos perdidos. Así, aún a día de hoy la variedad Palomino Fino cubre un 90% del viñedo de albarizas Jerezano (Piqueras Haba, 2005). La Variedad Palomino Fino es una variedad blanca, medianamente vigorosa, con producción media y racimos medianos y grandes. Sus hojas son grandes, pentagonales y de cinco lóbulos. La cepa es resistente a la sequía y está adaptada a terrenos muy calizos, como la albariza. La poda tradicional en el Marco de Jerez es la de vara y pulgar. Esta variedad produce vino de una graduación media, color amarillo pálido, con aromas neutros y baja acidez, predispuestos a la producción de vinos generosos y de crianza biológica (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2010).

3.2 Vinificación tradicional en el Marco de Jerez

Durante el transcurso de la historia el vino de Jerez ha sido exportado en múltiples ocasiones al extranjero. En el siglo XII ya era bien conocido en Inglaterra el nombre árabe de Jerez, “Sherish”, y en el siglo XV el vino de Jerez acompañaba a los marineros en las largas travesías a lo largo del mundo. Para estos viajes el vino era “encabezado”, es decir, se le añadía alcohol para asegurar su conservación durante los largos viajes. Esta práctica, junto al mecer de las olas, lograba que el vino envejeciera, se oxidase y mejorase con el tiempo (Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen ‘Jerez-Xérès-Sherry’ - ‘Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda’ - ‘Vinagre de Jerez’, 2015).

Estos aspectos históricos, y las influencias de los compradores extranjeros, han moldeado las técnicas de vinificación del marco, manteniendo la tradición y adecuándose a los gustos de los consumidores.

El vino joven producido por fermentación espontánea a partir de mosto de la variedad Palomino Fino en el Marco de Jerez hoy día es pálido, seco y con aromas neutros, siendo conocido como “mosto”. Este vino se utilizará como materia prima en los procesos de envejecimiento y crianza. El sistema de criaderas y soleras es el sistema predilecto que se utiliza en el Marco de Jerez y consiste en un ensamblaje de diferentes añadas en las criaderas que terminan por conformar la solera, siendo la solera el ensamblaje con más envejecimiento. La producción del vino de Jerez mediante este sistema ya se llevaba a cabo desde hacía mucho tiempo, pero no fue hasta después de las guerras napoleónicas en 1814 cuando su utilización empezó a ser realmente importante. Tras esto se convirtió en el método predominante en la fabricación del Jerez, vinculándose directamente al aumento de las exportaciones de fino a Gran Bretaña (Simpson, 1985).

El sistema de criaderas y soleras (Fig.1) se trata de un proceso dinámico de crianza basado en las sacas y rocíos, de forma que el vino es renovado con añadas anteriores en la parte proporcional al que realiza la “saca” o extracción. Por otro lado, el sistema de envejecimiento estático o por “añadas” no mezcla el vino de diferentes años para conseguir un resultado final homogéneo, sino que por el contrario envejece esa añada en una bodega en solitario resaltando y diferenciando sus características propias. En primera instancia, el vino que pertenece a las “sobretablas” se trata del primer eslabón en este sistema de vinificación del Marco de Jerez que deriva en los múltiples tipos de vinos conocidos de esta elaboración y que se utiliza para discernir y separar los vinos según sus cualidades.

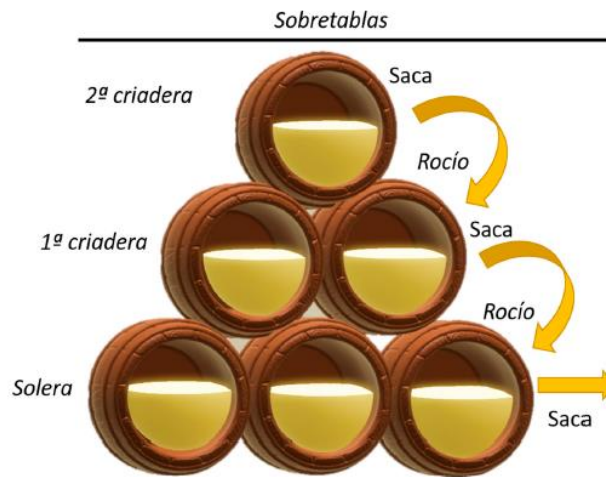


Figura 1. Esquema explicativo del funcionamiento del sistema dinámico de criaderas y soleras. Figura extraída de (Cordero-Bueso et al., 2018).

En la crianza biológica, el vino base o mosto es alcoholizado hasta 15.5° (v/v) con alcohol vínico conformando un vino de partida para la crianza biológica llamado sobretablas (Ruiz-Muñoz et al., 2020). Con el vino sobretablas se renueva el sistema dinámico de criaderas y soleras y mediante las sacas y rocíos este vino se desplazará por el sistema dinámico hasta la solera, homogeneizándose con el resto de añadas en el proceso. El sistema inicia con sacas realizadas a la solera, es decir, extracciones de vino en las botas con mayor envejecimiento biológico, seguidamente está perdida es compensada con vino del eslabón anterior en envejecimiento, realizando “rocíos”, y así consecutivamente hasta renovar las botas con el sobretablas, como se observa en la Figura 1. En el caso del sistema estático, el vino de fermentación espontánea resultará en barricas que no serán renovadas más en el tiempo hasta la finalización del proceso de envejecimiento biológico. En el interior de las botas en las cuales se pretende realizar la crianza biológica, se mantiene un pequeño vacío de aproximadamente de 1/6 de la capacidad de la vasija, que permite el crecimiento del velo de flor, el cual se trata de un *biofilm* compuesto de agregados multicelulares donde se pueden encontrar bacterias, hongos y levaduras, aunque mayoritariamente está compuesto por levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El velo de flor se desarrolla en la superficie del vino, consumiendo y transformando sus compuestos durante la crianza biológica. Durante este proceso el vino adquiere aromas a panadería, frutos secos, curry

y sotolón, entre otros, además de tonalidades de amarillos paja, y salinidad y finura en boca (Medina et al., 2003).

Las levaduras del velo de flor realizan metabolismo oxidativo consumiendo el oxígeno disuelto en el vino e impidiendo la entrada del mismo al medio. Este velo se forma debido a la elevada hidrofobicidad de algunas cepas de levaduras y su capacidad de formar agregados. La capacidad para formar estos agregados se regula por la expresión del gen *FLO11*. La expresión de este gen se ve fomentada durante el metabolismo anaeróbico, las levaduras se agregan y atrapan burbujas de CO₂ alcanzando la superficie y comenzando a metabolizar oxígeno (Alexandre, 2013).

El velo de flor utiliza como fuentes de carbono glicerol, ácido acético, etanol y acetato de etilo para su crecimiento. Existen diversos factores que afectarán al desarrollo del velo de flor. Su crecimiento está limitado por la presencia de ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, acetaldehído y etanol. No soporta las altas temperaturas (por encima de 22 °C) y necesita un mínimo de micronutrientes en el vino para su formación (Cordero-Bueso et al., 2018). Estos micronutrientes son renovados con el sistema de criaderas y soleras, con los nuevos rocíos a las botas de la escala inmediatamente inferior en envejecimiento. En Manzanillas y Finos de más de 15 años o en añadas sin aporte de rocíos, estos micronutrientes merman en cantidad y el velo tiene dificultades para su formación, llegando a formarse tan solo parcialmente (Cordero-Bueso et al., 2018). El sistema estático busca potenciar el vino de forma espontánea desde la fermentación hasta la crianza biológica donde, sin el aporte adicional de los rocíos, el velo de flor estará limitado a los recursos disponibles en la bodega.

Las levaduras mediante el metabolismo aerobio consumen compuestos alternativos a la glucosa como fuente de carbono, adaptándose a las condiciones del medio. El etanol es uno de estos compuestos consumido por las levaduras, debido a la ausencia de azúcares fermentables. La enzima alcohol deshidrogenasa forma acetaldehído y posteriormente acetil-CoA que pasa a formar parte del ciclo de Krebs para la producción de energía y aumento de la biomasa (Cordero-Bueso et al., 2018).

El glicerol al igual que el etanol es utilizado como fuente de carbono y es el principal componente indicador del grado de envejecimiento del vino en la crianza biológica, es decir, su consumo es proporcional al tiempo de crianza biológica. Por otro lado, el acetaldehído es uno de los subproductos producidos en el metabolismo del etanol y es característico de las crianzas bajo velo de flor. Su producción puede llegar hasta los 1000 mg/L, aportando cambios sensoriales importantes. Su formación no es regular en el tiempo, se centra en las etapas tempranas de formación del velo cuando las levaduras multiplican su biomasa y consumen más fuentes de carbono, tras eso, el acetaldehído se mantiene con pequeños cambios e incluso puede llegar a disminuir (Cordero-Bueso et al., 2018).

Las levaduras tienen una alta resistencia al ácido acético, de hasta 3 g/L, y lo consumen como fuente de carbono durante la crianza biológica. El acetato de etilo es uno de los derivados del ácido acético y ambos disminuyen su concentración bajo la actividad del velo de flor (Martínez Rodríguez, 1995).

Los aminoácidos son consumidos por las levaduras de forma lineal. Inicialmente la concentración más importante es del aminoácido prolina, llegando a un 50% del total. Durante el proceso de crianza biológica la prolina es el aminoácido más consumido descendiendo hasta un 20 % del total al final de la crianza biológica. El consumo de este aminoácido se explica como un posible uso por parte de la levadura en su etapa filmógena, por la activación del gen *FLO11*, como fuente de carbono al ser fácilmente transformable en intermediarios del ciclo de Krebs como ácido alfa-cetoglutarico (Botella et al., 1991).

3.3 Identificación y caracterización de las levaduras de velo de flor.

La composición del velo de flor no está del todo clara. Los métodos clásicos son complejos y en muchos casos ofrecen identificaciones incorrectas (Ruíz-Muñoz et al., 2017). Estos métodos se basan en la clasificación morfológica, fisiológica y bioquímica de las levaduras, evaluando sus rutas metabólicas y los compuestos consumidos. En un principio utilizando los métodos clásicos se describieron 4 razas de *S. cerevisiae* como las formadoras principales del velo de flor, *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. Posteriormente se descartó esta categorización reclasificando la cepa *montuliensis* como

la especie *Toluraspora delbrueckii*, y *rouxii* como *Zygosaccharomyces rouxii*. Las razas *beticus* y *cheresiensis* fueron consideradas como sinónimos de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman et al., 2011).

Hoy en día los métodos más utilizados son las técnicas moleculares. Estas técnicas permiten la identificación de levaduras de manera rápida y eficaz basándose en su ADN. La diferenciación entre especies en ocasiones no es suficiente para la utilización de las levaduras como herramientas enológicas, siendo necesario la identificación de levaduras al nivel de cepa (Palacios et al., 2009). Algunas de las técnicas más utilizadas son: electroforesis en campo pulsante (PFGE), polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Palacios et al., 2009).

En la electroforesis de campo pulsante o PFGE, el ADN completo es introducido en un gel de agarosa. El gel es sometido a un campo eléctrico que arrastrará el cariotipo completo hacia los puntos con carga positiva o cátodos, desde los puntos de carga negativa o ánodos, gracias al carácter polianiónico del material genético. EL ADN se dispondrá según su peso y este influirá en la distancia recorrida a través del gel, recorriendo más para las moléculas menos pesadas. A destacar la electroforesis en Campo Eléctrico homogéneo (CHEF), donde en un gel hexagonal con 24 electrodos periféricos se genera un campo pulsante homogéneo que nos permite separar cromosomas en diferentes tamaños y realizar una distinción a nivel de cepa (Marin-Menguiano et al., 2017).

La amplificación de polimorfismos en fragmentos de restricción (RFLP) se realiza en fragmentos de ARN ribosómico (rRFLP) (Prendes et al., 2018) y ADN mitocondrial (mtRFLP) (Viel et al., 2017). El método rRFLP compara zonas de restricción ribosomales y es útil para la identificación inter-especie, en cambio en mtRFLP se amplifican zonas de restricción en el ADN mitocondrial distinguiendo a nivel de cepa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido y accesible que efectuará un aumento o amplificación de una región concreta del genoma sentando la base para la aplicación de otros métodos. Los microsatélites son regiones conocidas

del ADN con una secuencia de pocos pares de bases que se repiten a lo largo del genoma y de gran polimorfismo, lo que permite comparar las diferencias existentes. Mediante PCR, los cebadores específicos aumentarán regiones o *loci* conocidos con gran cantidad de microsatélites lo que nos permite la distinción entre cepas de la misma especie, convirtiéndolo en un método muy utilizado en la identificación y caracterización de cepas de *S.cerevisiae* (Guillamón & Barrio, 2017).

Otras técnicas a destacar utilizadas en combinación con las anteriores son: ampliación polimórfica aleatoria (RAPD), amplificación de secuencias delta (δ), PCR a tiempo real y amplificación polimórfica en fragmentos de longitud (AFLP).

En RAPD se amplifican secuencias aleatorias del ADN de gran polimorfismo para cada cepa mediante PCR. Esta técnica tiene poca reproducibilidad y puede utilizarse para distinguir entre cepas en levaduras perteneciente a *S .cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Usualmente se utiliza en combinación con otros métodos como podrían ser secciones interdelta y RFLP como se observa en (Kállai et al., 2019) .

Las secuencias delta (δ) son 330 pares de bases distribuidas de manera frecuente en el genoma de las levaduras. Esta técnica se basa en amplificar las zonas del genoma comprendidas entre estos elementos. Se utilizan para la clasificación inter-cepa en *S.cerevisiae* (Pfliegler & Sipiczki, 2016).

4. Objetivos

Este trabajo de fin de grado se ha realizado en el Área de Microbiología del Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública bajo la dirección de Jesús Manuel Cantoral Fernández y Marina Ruiz Muñoz.

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es la identificación y comparación de diferentes cepas de levadura de velo de flor aisladas en nueve botas procedentes de dos bodegas del Marco de Jerez, en las cuales se mantienen diferentes prácticas enológicas en la gestión del envejecimiento biológico. Para poder abordarlo, se plantearon tres objetivos específicos:

- Aislamiento de levaduras formadoras de velo de flor de diferentes bodegas del Marco de Jerez.
- Caracterización molecular de las cepas aisladas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.
- Estudio de las diferencias entre sistemas estático y dinámico en las composiciones de los velos de flor.

5. Materiales y Métodos

Las muestras se tomaron de nueve botas distribuidas en dos bodegas del Marco de Jerez, cuatro de ellas pertenecen a la bodega A (ubicada en Jerez de la Frontera) y cinco botas pertenecen a la bodega B (ubicada en El Puerto de Santa María). Las dos bodegas objeto de estudio utilizan diferentes gestiones en la crianza biológica. La bodega A sigue un sistema dinámico, que consiste en diferentes añadas que se mezclan entre sí mediante el sistema de criaderas y soleras, conformando un sistema homogéneo en el tiempo. Por otro lado, la bodega B sigue un sistema estático donde las añadas no se mezclan entre sí, sino que se mantienen estancas destacando las diferencias entre ellas y consiguiendo que cada añada (e incluso, cada pago o cada bota) sea única.

Las muestras se obtuvieron siguiendo la misma práctica en las dos bodegas analizadas (A y B). Para la extracción del velo se utilizó una varilla con una pala con red al final capaz de atrapar el velo de la superficie del vino, y este fue depositado con 20 mL de vino en botellas de plástico estériles. Entre las tomas de muestras el material fue lavado con etanol al 70% (v/v) para evitar contaminaciones cruzadas. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en una nevera para así evitar los cambios bruscos de temperatura y que las condiciones externas afectaran a las levaduras. Una vez allí, las muestras se introdujeron en tubos estériles de rosca de 30 ml, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, obteniendo un pellet de levaduras. Se resuspendió en 10 ml de agua estéril volviendo a centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos para poder limpiar la muestra. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua estéril, en un Eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Se tomaron 500 μ L de muestra tras el proceso de lavado y se mezcló con 500 μ L de glicerol al 80% (v/v), conservándolas a -20°C . Esta metodología se repitió en todas las muestras tomadas directamente de las botas, las botas fueron muestreadas solo una vez cada una y las muestras se conservaron en el congelador para futuras prácticas.

Por otro lado, el sobrante de las muestras ya lavadas fue sembrado en placas de Petri con medio de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 2% agar). Para ello, se llevó a cabo el método de diluciones sucesivas y posterior siembra en césped. Estas metodologías se realizaron siempre bajo condiciones de esterilidad en

presencia de mechero bunsen de gas. Para las diluciones sucesivas se siguió la metodología expresada en (Sanz Cervera, 2011). Se prepararon una serie de eppendorfs en una gradilla, añadiéndole a todos 900 μL de agua estéril. En este caso en concreto se prepararon 5 tubos eppendorfs. Seguidamente se añadió 100 μL de muestra tras el proceso de lavado, obtenida en el apartado anterior tras la centrifugación, al primero de los eppendorf, cerramos y agitamos. En este momento se obtiene el primer eslabón con concentración 10^{-1} . Se repitió hasta el último tubo el mismo proceso. Se obtienen 100 μL del tubo anterior (n-1), se añaden al tubo actual (n), agitamos y cerramos, obteniendo una concentración 10^{-n} . Las diluciones sucesivas se realizaron en un entorno estéril conformando una serie de diluciones: $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ (Fig.2).

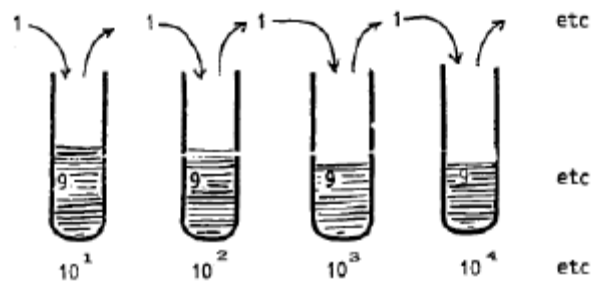


Figura 2. Esquema del proceso de diluciones sucesivas, foto extraída de (Sanz Cervera, 2011).

Tras las diluciones se sembró en YPD sólido por extensión con un asa de siembra de vidrio. Posteriormente, las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Las diluciones sucesivas y la siembra por extensión fueron aplicadas exclusivamente a las muestras de la bodega A, ya que estas se encontraban conservadas y no fueron sembradas en placa tras pocas horas desde su obtención.

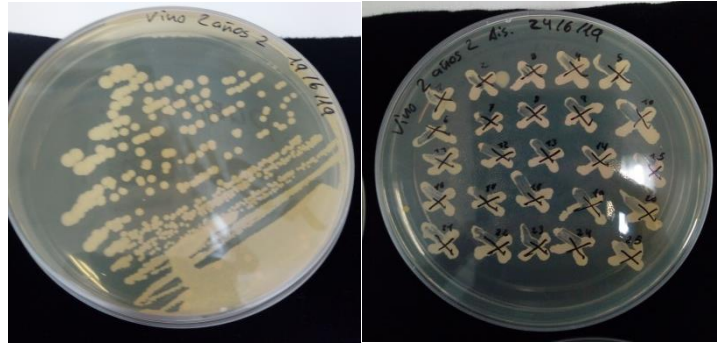


Figura 3. Fotos de Placas de Petri con medio YPD con siembra de muestra por agotamiento por estría (izquierda) y aislamiento de colonias puras (derecha).

Para el resto de muestras de la bodega B, se realizó aislamiento por agotamiento por estría, directamente de la muestra inicial. Se arrastró la muestra desde un extremo de la placa, concretamente 50 μ L, hasta el extremo opuesto, realizando estrías cada vez más separadas y sin levantar el asa de siembra. La finalidad es repartir los microorganismos y obtener distribuciones individuales, que originarán colonias separadas. Cada una de estas colonias individuales constituirá un cultivo puro.

En las placas cuyas unidades formadoras de colonias estaban entre 30 y 300 se seleccionaron ciertas colonias. El criterio de selección de las colonias, asumiendo su aislamiento, fue morfología y tamaño, para así seleccionar cepas que pudieran ser diferentes. Seleccionadas, estas cepas fueron trasladadas a placas con el fin de aumentar su biomasa e identificarlas.

Con puntas estériles utilizadas a modo de palillo se obtuvo la biomasa de cada colonia aislada y se resuspendió en tubos de 0.2 mL con 20 μ L de agua estéril. Estos fueron incubados a 95°C durante 15-20 minutos en un termociclador, en concreto para todas muestras fue utilizado SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems). Al terminar el termociclado las muestras se pasaron por el vórtex durante 1 minuto. Este protocolo de extracción de ADN seguido es el mismo que se expone en (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008).

Tabla 1

Primers de los loci para PCR (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008)

Locus	Primer
SC8132X	FW: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG RV: CCTCGTACTATCGTCTTCATCTTGC
YOR267C	FW: GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG RV: GGATCTACTTGCAGTATACGGG
SCPTSY7	FW: AAAAGCGTAAGCAATGGTG TAGAT RV: AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT

Para la identificación de estas colonias de levaduras de velo de flor se amplificaron zonas del genoma de gran polimorfismo llamados microsatélites, tándems de 1 a 6 bases que se repiten y forman patrones en el ADN eucariota (Field, 1998). Para la amplificación de los microsatélites fueron seguidos los procedimientos explicados en (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008). Al igual que se describe en la bibliografía, se amplificaron los *loci* de microsatélites SC8132X, YOR267C y SCPTSY7 utilizando las secuencias de los *primers* que se muestran en la Tabla 1.

Los microtubos con el contenido expuesto en la Tabla 2 además de 1 μ L del resultado de la extracción de ADN, realizaron un protocolo optimizado para la amplificación múltiple de tres *loci*. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 4 minutos a 94°C, 28 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C, 30 segundos a 72 °C y 10 minutos a 72 °C. Tras este proceso se desciende lentamente la temperatura hasta su conservación a 4°C para su posterior análisis.

Tabla 2

Reactivos de PCR y su volumen añadido a la mezcla, concentración inicial ([]°) y concentración final ([]f) respecto a 25 μ L

Componente	Volumen (μ L)	[]°	[]f
Buffer 10X PCR	5	5X	1X
MgCl ₂	2.5	25 mM	2.5 mM
dNTP	0.5	10 mM	0.2 mM
YOR267C (FW)	2	5 μ M	0.4 μ M
YOR267C (RV)	2	5 μ M	0.4 μ M
SCPTSY7 (FW)	2	20 μ M	1.6 μ M
SCPTSY7 (RV)	2	20 μ M	1.6 μ M
SC8132X (FW)	3	5 μ M	0.6 μ M
SC8132X (RV)	3	5 μ M	0.6 μ M
Taq ADN polimerasa	0.2	5 U/ μ L	1 U/ μ L
Agua	1.8	pura	/

Las muestras se corrieron en geles de agarosa. Los geles se prepararon al 2.5 % de agarosa con disolución TBE buffer al 1X. Para disolver la agarosa correcta y homogéneamente se calentó la disolución en matraces Erlenmeyer en microondas. Mediante agitación continuada la agarosa eventualmente se disolvería con la mínima presencia de burbujas, tras esto se dejaron enfriar brevemente antes de volcar sobre un molde para geles. El molde contiene un peine de electroforesis que conformará los pocillos del gel.

Una vez solidificado, el gel se depositó en una cubeta de electroforesis con medio TBE 1X y se sometieron a 120 voltios durante 120 minutos para los geles de 60 pocillos. En el caso de geles con 20 pocillos el voltaje fue reducido a 90 durante 90 minutos. En todos los casos se empleó como patrón de pesos moleculares GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

El gel es sometido a un campo eléctrico, arrastrando los fragmentos de ADN hacia el ánodo debido a su carga negativa, de esta forma se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse por una malla tridimensional de polímeros de agarosa, en la cual, los fragmentos más grandes y pesados avanzarán menos debido a la fricción y los más ligeros, en cambio, avanzarán más (Fierro, 2014).

Tras la electroforesis, los geles de agarosa fueron introducidos en una disolución con Bromuro de Etidio durante 15-20 minutos. Este compuesto reaccionó con los ácidos nucleicos haciéndolos visibles a la luz ultravioleta. Se utilizó un transluminador para observar el desplazamiento del ADN a través del gel y comprobar su posición respecto a los patrones, al igual que el tamaño de pares de bases de las bandas observadas.

6. Resultados y discusión

Se han analizado nueve botas distribuidas en dos bodegas diferentes del Marco de Jerez, de las cuales se tomaron muestras puntuales. Para la bodega A, la cual sigue un sistema dinámico corresponden cuatro botas (A1, A2, A3 y A4) muestreadas en otoño, y para la bodega B, con un sistema estático, son 5 botas (B1, B2, B3, B4 y B5) muestreadas en primavera.

Tras la toma de muestras se obtuvieron aislados de colonias puras de las bodegas A y B, Tabla 3. Estas colonias son estudiadas posteriormente mediante PCR-microsatélites con el fin de diferenciar las poblaciones existentes en ambas bodegas y comparar los sistemas estático y dinámico. En total fueron analizadas 216 colonias mediante PCR. En la bodega A, como se comenta anteriormente, se sigue un sistema dinámico tradicional de criaderas y soleras y las muestras proceden de botas en diferentes estadios dentro de este sistema. En la bodega B las botas muestreadas pertenecen a diferentes añadas y por lo tanto diferente envejecimiento.

Tabla 3

Datos de las colonias analizadas mediante PCR procedentes de las bodegas A y B

Bodega	Muestras tomadas	Colonias aisladas	Procedencia y vejez
A	4	96	Jerez de la Frontera
	A1	24	Primera criadera
	A2	24	Segunda criadera
	A3	24	Solera
	A4	24	Solera
B	5	120	El Puerto de Santa María
	B1	24	2 años
	B2	24	2 años
	B3	24	4 años
	B4	24	4 años
	B5	24	12 años

Para poder distinguir entre diferentes genotipos, se extrajo el ADN de las colonias previamente seleccionadas y aisladas y posteriormente se amplificó de forma simultánea mediante PCR 3 *loci* altamente polimórficos que contienen microsátelites, SC8132X, YOR267C y SCPTSY7, descritos en (Field, 1998) y posteriormente validados y optimizados por (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008).

Las regiones amplificadas son específicas para *Saccharomyces cerevisiae*, permitiéndonos diferenciar entre cepas pertenecientes a esta especie (Field, 1998). Los resultados se visualizaron con éxito, obteniendo amplificación para el 99% de las colonias analizadas (Fig. 4).

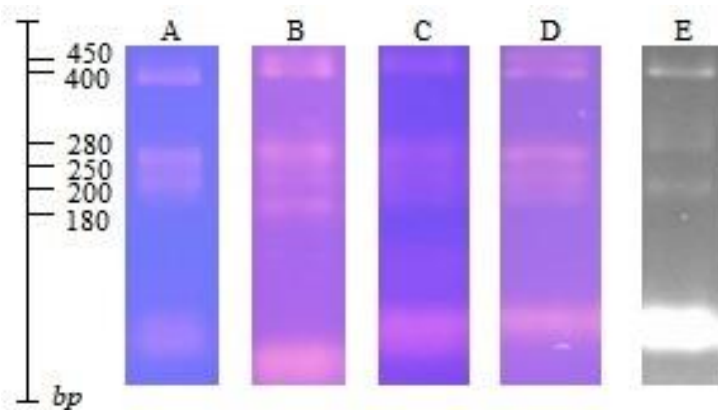


Figura 4. Distintos patrones obtenidos en electroforesis al 2.5% de agarosa tras la amplificación de los *loci* SC8132X, YOR267C y SCPTSY7 de las colonias aisladas de la Tabla 3.

En la Figura 4 se muestran los distintos patrones obtenidos como resultado de PCR en el total de las colonias analizadas. A la izquierda, una escala señala los tamaños aproximados en pares de bases (*bp*). Los patrones reciben el mismo nombre que el tipo de cepa que representan. Las bandas más cercanas al extremo inferior son los restos menos pesados y no coinciden por las diferencias de desplazamiento entre geles, ya que

los patrones proceden de geles diferentes. Este esquema pretende mostrar las diferencias de los patrones en ausencia de una foto de todos juntos regidos por el mismo patrón de pares de bases. Para observar mejor las diferencias entre los patrones es aconsejable observar las Figuras 6, 7, 8 y 9 incluidas en el apéndice.

Como se observa en la Figura 4 fueron encontrados 5 patrones diferentes. Describiendo la figura, el patrón A tiene 3 bandas en total a 400, 250 y 200 *bp*, el patrón B tiene 4 bandas en total a 400, 250, 200 y 180 *bp*, el patrón C tiene 4 bandas en total a 400, 280, 250 y 200, el patrón D tiene 5 bandas en total a 450, 400, 280, 250 y 200 y por último el patrón E se compone de 3 bandas a 400, 280 y 200 *bp*. Estas diferencias exponen una disparidad de genotipos encontrados pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*. Estos patrones fueron encontrados en diferentes distribuciones dependiendo de la bodega de procedencia (Fig. 5).

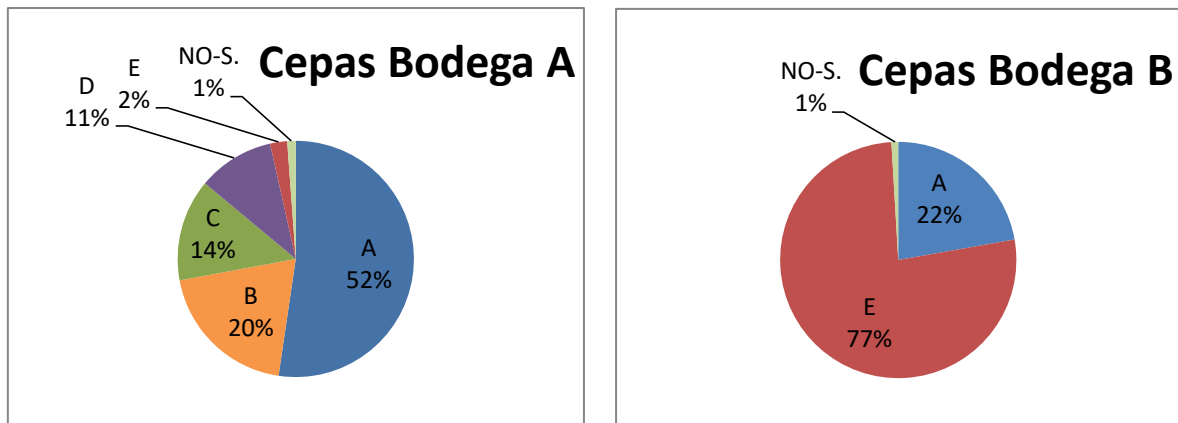


Figura 5. Frecuencias para los distintos patrones de *S. cerevisiae* obtenidos en las bodegas A y B.

Observando la Figura 5, se comprueba que los velos de flor analizados son diferentes, ya que se observa una composición de genotipos distinta en las cepas analizadas de los velos de flor de las bodegas A y B. En la bodega A, como se observa en la Figura 5, el 52% de la composición del velo de flor pertenece a levaduras con patrón A, siendo la mayoritaria en esta bodega, seguida de los patrones B (20%), C (14%), D (11%) y E (2%). En cambio en la bodega B el velo de flor no está compuesto por una gran diversidad de genotipos, ya que en contraposición con la bodega anterior donde encontramos hasta 5 patrones diferentes, en la bodega B se resalta la existencia

de solo 2 patrones, A (22%) y E (77%), además el patrón E en un porcentaje muy elevado y el patrón A disminuyendo respecto a la bodega A.

El sistema de envejecimiento biológico seguido en las bodegas A y B es diferente. Como se comenta anteriormente, la bodega A se sigue un sistema dinámico mientras que la bodega B sigue un sistema estático. Así, se ha observado que las bodegas muestran diferentes distribuciones de genotipos como se observa en la Figura 5. Además, la bodega A, con un sistema dinámico, muestra una mayor diversidad en los genotipos que la bodega B (con un sistema estático). Así, de estos resultados se podría extraer que los sistemas de envejecimiento influyen en la diversidad de genotipos de *S. cerevisiae*, de forma que el sistema de envejecimiento dinámico podría favorecer la diversidad de genotipos para las levaduras *S. cerevisiae* en los velos de flor en comparación con el sistema estático.

Tabla 4

Frecuencias de las cepas en cada muestra de las bodegas A y B.

Muestra	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E
A1	72 %	28 %			
A2	56 %	34 %			10 %
A3	35 %		60 %	5 %	
A4	41 %	11 %		47 %	
B1					100 %
B2	68 %				32 %
B3					100 %
B4	15 %				85 %
B5	32 %				68%

En la Tabla 4 se observa que en las botas analizadas de la bodega A también presentan mayor diversidad de genotipos individualmente respecto a las botas de la bodega B. En cambio, para la bodega B, muestras como B1 y B3 están compuestas totalmente por levaduras de genotipo E, por tanto son botas con solo un genotipo encontrado algo que no sucede en las botas de la bodega A donde como mínimo se encuentran dos patrones diferentes por bota. Las botas con el 100 % de genotipo E, como se observa en la Tabla 4, son para las muestras B1 y B3, botas con el menor

envejecimiento biológico del sistema estático. Por tanto, se observa que el sistema estático puede favorecer la formación de velos de flor con genotipos puros.

Por otro lado, las botas pertenecientes a la solera (A3 y A4) mantienen una mayor diversidad de genotipos aun siendo las botas con mayor envejecimiento respecto a botas de criaderas como A1. La existencia de mayor diversidad en las botas pertenecientes a la solera en el sistema dinámico se ha comprobado con anterioridad en estudios relacionados con el presente grupo de investigación (Ruiz-Muñoz et al., 2020).

La bodega A pertenece a Jerez de la Frontera donde se alcanzan a lo largo del año temperaturas más elevadas que en el Puerto de Santa María, ubicación de la bodega B. Estos factores, concentración de compuestos como acetaldehído y etanol, temperatura y prácticas propias en bodega pueden haber fomentado que el genotipo A predomine en el caso de la bodega A. Además de las diferencias de temperatura anuales en la bodega A y B, las muestras fueron tomadas en diferentes momentos del año. Las muestras de la bodega A fueron tomadas en otoño y las muestras de la bodega B fueron tomadas en primavera. Las diferencias entre el momento de la toma de muestras pueden explicar las diferencias en los genotipos encontrados para los diferentes velos de flor estudiados, ya que las estaciones influyen en la biodiversidad de genotipos presentes (Ruiz-Muñoz et al., 2020).

En este trabajo de fin de grado se han analizado botas con un 100 % de levaduras del mismo genotipo para las colonias seleccionadas y aisladas, que tras el aumento de envejecimiento en el vino disminuyen dejando paso a otros genotipos mejor adaptados a las modificaciones que han sucedido en el medio. Esto no solo se evidencia en este trabajo sino también en otros estudios como (Martínez et al., 1997; Ruiz-Muñoz et al., 2020). El acetaldehído y el etanol producen roturas simples y dobles de hebras de ADN en las levaduras de velo de flor (Ristow et al., 1995). Algunos genotipos podrían ser de aparición aleatoria en el vino bajo ciertas condiciones propiciadas por mutaciones y deleciones de las levaduras de velo de flor ya existentes, aunque este hecho no se estudia ni se demuestra en este trabajo de fin de grado, se intenta explicar la aparición de ciertos genotipos de levaduras en velos de flor en añadas procedentes de velos puros del mismo genotipo que con su envejecimiento dejan paso a otros genotipos, datos que si han sido analizados y ocurren en las muestras de la bodega B como podemos observar

en las tablas de frecuencias, Tabla 4, para las muestras B1 y B3 comparando con una añada B5.

Para ambos velos encontramos levaduras No-*Saccharomyces* en un 1 %. Estas levaduras no mostraban ningún tipo de amplificación tras PCR. Los resultados nos muestran que las levaduras No-*Saccharomyces* presentan porcentajes muy bajos en la composición del velo de flor, pero están adaptadas a las condiciones del envejecimiento biológico (Ruiz-Muñoz et al., 2020). Comparando el resultado de otros estudios como en (Mesa et al., 1999) y (Ruiz-Muñoz et al., 2020), el porcentaje de levaduras No-*Saccharomyces* en las botas estudiadas es muy bajo, para aquellas botas donde siquiera aparecen, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo de fin de grado.

En otros estudios previos se ha observado que las poblaciones totales en el velo de flor en vinos de crianza biológica en el Marco de Jerez son similares en el sistema estático y dinámico, sin embargo encuentran diferencias significativas entre las escalas durante las etapas del proceso (Martínez et al., 1997). En el presente trabajo sí que se encuentran diferencias en las distribuciones de cepas entre los velos de flor estudiados, comparando estático y dinámico, aunque estas diferencias no pueden atribuirse a los sistemas de envejecimiento plenamente, si no a un conjunto de factores que se discutirán a continuación.

Los diferentes genotipos y distribuciones de los mismos pueden estar influidos por los mostos de procedencia. En la bodega A se encuentra una mayor diversidad, siendo una bodega que se suministra por mostos de las cooperativas del Marco de Jerez por tanto es una mezcla de pagos y de diferentes características, por otro lado la bodega B vinifica sus propios caldos, al ser de solo una procedencia podría explicar la menor diversidad de genotipos. Esto son datos que diferencian al sistema dinámico y estático y que podrían explicar las diferencias encontradas en el presente trabajo de fin de grado, pero no son concluyentes y no han sido estudiadas con anterioridad. Para cerciorar esta discusión se debería realizar más muestreos entre bodegas que cumplan estas condiciones.

Se ha demostrado que compuestos como el etanol y el acetaldehído influyen directamente en las poblaciones del velo de flor (Castrejón et al., 2002; Martínez et al., 1997; Ristow et al., 1995). El acetaldehído ataca el ADN de las levaduras de velo de flor, siendo uno de los principales compuestos que alteran la variabilidad de la composición del velo de flor produciendo deleciones y mutaciones en el genoma de las levaduras (Ristow et al., 1995). El acetaldehído es producido por las levaduras y ciertas cepas son más productoras, además las levaduras presentan diferentes resistencias a este compuesto (Martínez et al., 1997). Teniendo en cuenta estos aspectos ciertas cepas de levaduras con alta resistencia y formación del acetaldehído desplazarán otras poblaciones en el velo de flor, ya sea dinámico o estático, ya que en un vino con más cantidad de micronutrientes, fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable y menor presencia de acetaldehído (o ausencia), cepas con alta formación de acetaldehído podrán actuar fomentando un medio donde ellas tienen ventaja adaptativa (Martínez et al., 1997).

En lo que respecta a la formación del velo de flor, ciertas cepas de levaduras expresan una mayor capacidad para formarlo (Ibeas et al., 1997; Martínez et al., 1997). Esta capacidad fomenta la proliferación de genotipos concretos en etapas tempranas cuando el velo está formándose. Además, estos genotipos también formarán velo cuando este se deteriora tras cambios de temperatura que lo hayan debilitado. Las muestras de la bodega B fueron extraídas en primavera, en esta época del año los velos de flor son más gruesos y tupidos debido a las temperaturas suaves por tanto las poblaciones dominantes podrían ser levaduras con genotipos formadores de velo, al menos para la muestra B1 procedente de una bota con poco envejecimiento respecto a las demás de la misma bodega.

Como se comenta anteriormente la temperatura influye directamente en las poblaciones de levaduras y en la aparición de velo de flor. Temperaturas por encima de 22.5 °C provocarán que el velo sufra alteraciones y llegue a caer, estas alteraciones de la temperatura se relacionan con el clima de cada ubicación y el reparto de las botas en la bodega (Ruiz-Muñoz et al., 2020). Por tanto, la temperatura y el clima afectarán a la dinámica de poblaciones tanto a escala micro y macro clima. Además altas concentraciones de acetaldehído en las botas con mayor envejecimiento inhiben la formación del velo de flor y debilitan el ya existente (Martínez et al., 1997).

Patrones similares han sido obtenidos en otros estudios sobre levaduras de velo de flor (Marin-Menguiano et al., 2017; Ruiz-Muñoz et al., 2020). En ambos estudios se amplifican los mismos *loci* que en el presente este trabajo. Los diferentes genotipos encontrados en este trabajo han sido descritos en ambos estudios como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Patrones de PCR microsatélites encontrados en (Ruiz-Muñoz et al., 2020) y (Marin-Menguiano et al., 2017) y su correspondencia con los patrones hallados en este trabajo de fin de grado

Patrones de este trabajo de fin de grado	A	B	C	D	E
Patrones de (Ruiz-Muñoz et al., 2020)	ScB	ScD	ScG	ScA	ScC
Patrones de (Marin-Menguiano et al., 2017)	<i>b</i>	<i>d</i>	/	<i>a</i>	<i>c</i>

En el caso de (Marin-Menguiano et al., 2017) los patrones fueron encontrados en muestras procedentes de velos de flor de Montilla-Moriles región de la provincia de Córdoba. Como se observa en la Tabla 5, los patrones A, B, D y E son semejantes a algunos de los encontrados en (Marin-Menguiano et al., 2017), correspondiendo a *b*, *d*, *a* y *c* respectivamente, en este caso todos los patrones están en (Marin-Menguiano et al., 2017) salvo el patrón C que se encuentra en este trabajo de fin de grado. Para el caso de (Ruiz-Muñoz et al., 2020) las muestras proceden del Marco de Jerez, concretamente de bodegas ubicadas en el Puerto de Santa María y Jerez de la Frontera, como en este trabajo de fin de grado. Todos los patrones de este trabajo de fin de grado parecen estar representados en (Ruiz-Muñoz et al., 2020), como se observa en la Tabla 5, concretamente A, B, C, D y E se corresponden con ScB, ScD, ScG, ScA y ScC respectivamente.

7. Conclusiones

El velo de flor es un biosistema donde conviven microorganismos adaptados a unas condiciones altamente estresantes. Con el fin de estudiar la composición del velo de flor, respecto a *S. cerevisiae*, en diferentes ambientes, se realizó PCR múltiple microsatélite como técnica molecular para la identificación de cepas de esta especie. Analizando los resultados de este trabajo de fin de grado se concluye lo siguiente:

- Se obtuvieron hasta 5 genotipos diferentes para levaduras *S. cerevisiae* de velo de flor.
- La bodega A presenta mayor variabilidad de genotipos encontrándose cinco genotipos distintos. En cambio, en la bodega B se encuentran solo dos genotipos diferentes en el total de las colonias analizadas. Además en la bodega B se encuentran botas con solo un genotipo para las colonias analizadas.
- La diversidad de genotipos varía según el sistema de envejecimiento biológico empleado en dicha bodega, de forma que se encuentra una mayor diversidad en el sistema dinámico que en el sistema estático. El sistema estático de añadas permite la proliferación de velos de flor de genotipos puros, algo que no ocurre en el sistema dinámico.
- En las botas de la bodega A se encuentran de 2 a 3 genotipos, en cambio en las botas de la bodega B se encuentran de 1 a 2 genotipos por bota. La diversidad de las bodegas se refleja en las botas individualmente.

8. Perspectiva de futuro

En numerosas ocasiones se ha intentado resolver la composición del velo de flor en el Marco de Jerez. La gran variabilidad de levaduras presentes bajo condiciones de estrés para las levaduras hace que el velo de flor sea sujeto a numerosos estudios por su capacidad de proporcionar herramientas enológicas de gran valor. Ya se han conseguido avances en el entendimiento de este *biofilm* pero aún quedan muchos que explicar y conocer.

En este Trabajo de Fin de Grado se realiza solo una toma de muestra para los sujetos de estudio. Para contrastar los datos y dotar de mayor validez y fiabilidad a los resultados y conclusiones se propone realizar más muestreos en las botas analizadas en diferentes momentos del año para poder sesgar los resultados y de esta forma resaltar las diferencias entre los sistemas estático y dinámico. De la misma forma sería ideal realizar comparaciones entre los sistemas estático y dinámico en otras bodegas y descartar que los resultados se adhieran a prácticas propias, localización y biodiversidad ya presente en la bodega o ligada a la procedencia de los caldos, de los sujetos de estudio presentes.

Por otro lado, durante este trabajo de fin de grado corroborando los resultados con la bibliografía, muchos datos sugieren el origen de algunas cepas de levaduras de velo de flor a causa de mutaciones de las ya existentes. Desde este trabajo de fin de grado se propone el estudio del efecto de diferentes concentraciones de acetaldehído sobre velos puros de genotipos formadores de velo.

9. Bibliografía

AEMET. (2010). Valores climatológicos normales. Jerez de la Frontera Aeropuerto.

Retrieved 7 May 2020, from

<http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=5960&k=and>

AEMET, & IPMA. (2011). *Atlas climático Ibérico. Temperatura do ar e precipitação (1971-2000)*. Agencia Estatal de Meteorología, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-Their ecology, genetics and metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 269–275.

Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>

Botella, M. A., Perez-Rodriguez, L., Domecq, B., & Valpuesta, V. (1991).

CONTENIDO Y EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN VINOS DE JEREZ DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN. In Universidad de Cádiz (Ed.), *V Jornadas Universitarias de Viticultura y Enología en Jerez* (pp. 214–223). Cádiz. Retrieved from

Retrieved from

<https://books.google.es/books?id=lwUkOWmwOrwC&pg=PA213&lpg=PA213&dq#v=onepage&q&f=false>

Castrejón, F., Codón, A. C., Cubero, B., & Benítez, T. (2002). Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(3), 462–467. Retrieved from <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00127>

Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., González-Moreno, M., Chirino, S., Bernal-

Grande, M. del C., & Cantoral, J. M. (2018). The microbial diversity of Sherry wines. *Fermentation*, 4 (1). Retrieved from

<https://doi.org/10.3390/fermentation4010019>

- Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen 'Jerez-Xérès-Sherry' - 'Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda' - 'Vinagre de Jerez'. (2015). Historia Del Jerez. Retrieved 2 May 2020, from <https://www.sherry.wine/es/marco-de-jerez/historia>
- Field, D. & W. C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *S. cerevisiae* and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(February), 1647–1652. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/95/4/1647.short>
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 27–52.
- García Ramos, G., & Gonzalez García, F. (1970). Arcillas cerámicas de Andalucía.
- Guillamón, J. M., & Barrio, E. (2017). Genetic polymorphism in wine yeasts: Mechanisms and methods for its detection. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–20. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00806>
- Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdigonés, F., & Jimenez, J. (1997). Dynamics of flor yeast populations during the biological aging of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1), 75–79.
- Kállai, Z., Pfliegler, W. P., Mitercsák, J., Szendei, G., & Sipiczki, M. (2019). Preservation of diversity and oenological properties of wine yeasts during long-term laboratory maintenance: A study of strains of a century-old Tokaj wine yeast collection. *Lwt*, 101(December 2018), 789–798. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.002>
- Kurtzman, C., J.W., F., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts 5th Edition A Taxonomic Study*.
- Marín Menguiano, M. (2014). *Caracterización y mejora de levaduras de flor aisladas en la Denominación de Origen Montilla-Moriles*. Universidad Pablo de Olavide.

- Marin-Menguiano, M., Romero-Sanchez, S., Barrales, R. R., & Ibeas, J. I. (2017). Population analysis of biofilm yeasts during fino sherry wine aging in the Montilla-Moriles D.O. region. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 67–73. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.019>
- Martínez Rodríguez, P. (1995). *EVOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DE LEVADURAS RESPONSABLES DE LA CRIANZA BIOLÓGICA DEL VINO DE JEREZ*. Universidad de Sevilla.
- Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., & Benítez, T. (1997). Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(2), 160–168.
- Medina, M., Moreno, J., Merida, J., Mayen, M., Zea, L., & Moyano, L. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Edition) - Sherry: Composition and Analysis*. (Benjamin Caballero, L. Trugo, & P. Finglas, Eds.). San Diego, California. Estados Unidos: Academic Press. Retrieved from <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/14301/Sherry.pdf?sequence=1>
- Mesa, J. J., Infante, J. J., Rebordinos, L., & Cantoral, J. M. (1999). Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *LWT - Food Science and Technology*, 32(2), 114–120. Retrieved from <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0514>
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2010). Material Vegetal Palomino. Retrieved 8 May 2020, from <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=494#>
- Palacios, A., Carrillo, D., Iruzubieta, J., Boutou, S., & Labadie, D. (2009). LAS EFICACES TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS ENOLÓGICAS. *ENÓLOGOS*, 60, 1–11. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4024249>

- Pfliegler, W. P., & Sipiczki, M. (2016). Does fingerprinting truly represent the diversity of wine yeasts? A case study with interdelta genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 63(6), 406–411. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/lam.12679>
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729. Retrieved from [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::aid-yea585>3.3.co;2-2)
- Prendes, L. P., Merín, M. G., Fontana, A. R., Bottini, R. A., Ramirez, M. L., & Morata de Ambrosini, V. I. (2018). Isolation, identification and selection of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 266(November 2017), 14–20. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.033>
- Ristow, H., Seyfarth, A., & Lochmann, E. R. (1995). Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 326(2), 165–170. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)00165-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)00165-2)
- Ruíz-Muñoz, M., Bernal-Grande, M. del C., Cordero-Bueso, G., González, M., Hughes-Herrera, D., & Manuel Cantoral, J. (2017). A microtiter plate assay as a reliable method to assure the identification and classification of the veil-forming yeasts during Sherry wines ageing. *Fermentation*, 3(4). Retrieved from <https://doi.org/10.3390/fermentation3040058>
- Ruiz-Muñoz, M., Cordero-bueso, G., Benítez-trujillo, F., Pérez, F., & Cantoral, J. M. (2020). Rethinking about flor yeast diversity and its dynamic in the “criaderas and soleras” biological aging system. *Food Microbiology*, 103553. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103553>
- Sanz Cervera, S. A. (2011). *PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA* (2ª edición). La Rioja: Universidad de La Rioja. Retrieved from <https://publicaciones.unirioja.es/catalogo/monografias/mdaa01.shtml>

- Simpson, J. (1985). La producción de vinos en jerez de la frontera, 1850-1900. *La Nueva Historia Económica de España*, 166–191.
- Vaudano, E., & Garcia-Moruno, E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25(1), 56–64. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.001>
- Viel, A., Legras, J. L., Nadai, C., Carlot, M., Lombardi, A., Crespan, M., ... Corich, V. (2017). The geographic distribution of *saccharomyces cerevisiae* isolates within three Italian neighboring winemaking regions reveals strong differences in yeast abundance, genetic diversity and industrial strain dissemination. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–15. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01595>

10. Apéndices

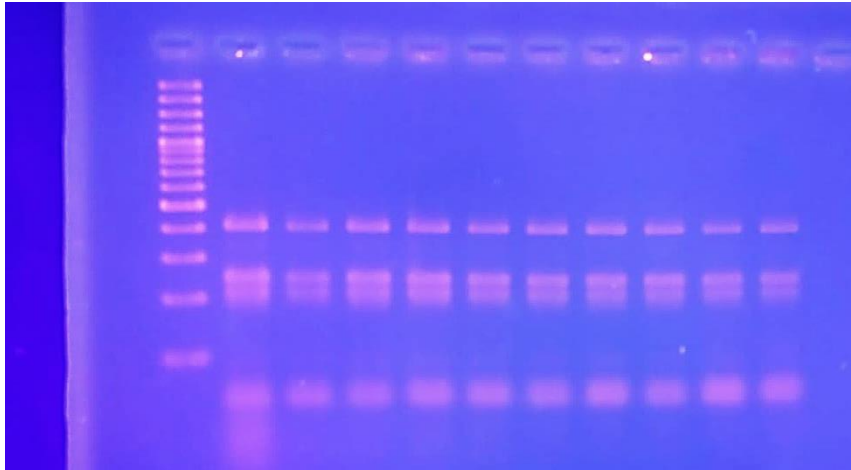


Figura 6. Resultados tras electroforesis en cepas de la bodega A. En la figura de distingue la cepa con patrón A.

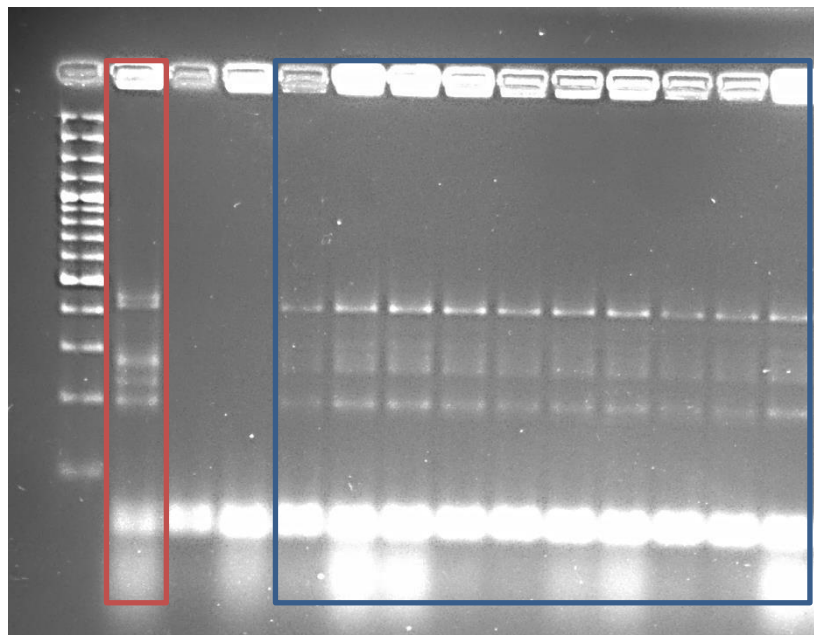


Figura 7. Resultados de electroforesis. Cepa con patrón D (en el primer rectángulo por la izquierda) de la bodega A, frente a cepas con patrón E (en el rectángulo grande) de la bodega B.

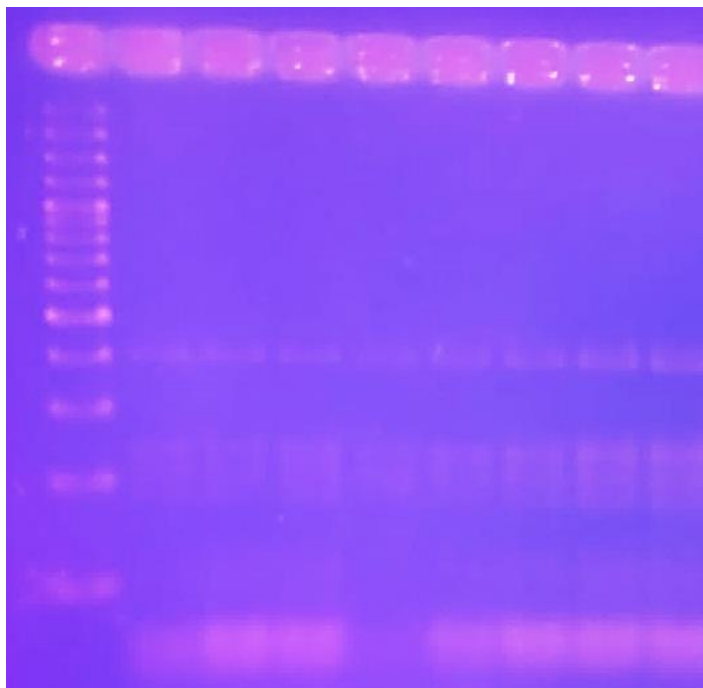


Figura 8. Resultados tras electroforesis de cepas de la bodega A con patrón B

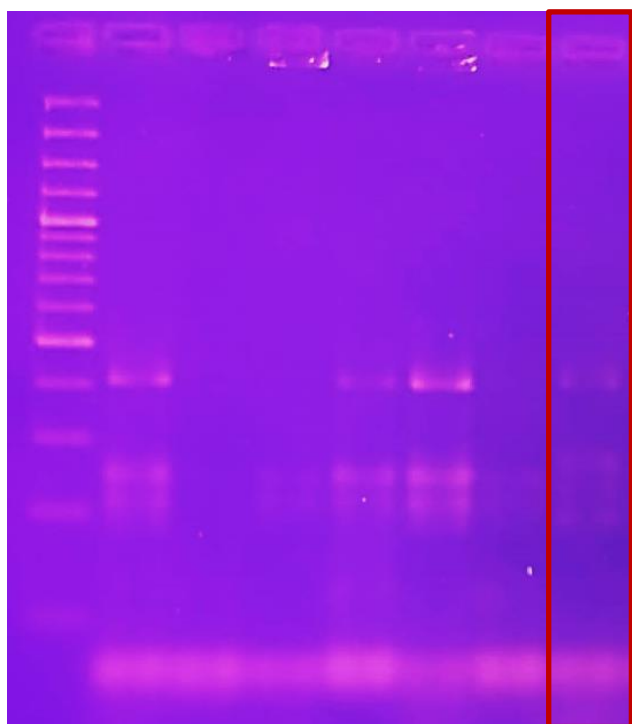


Figura 9. Resultados de electroforesis destacando en el rectángulo el patrón C de la bodega

