

Trabajo Fin de Grado

Crecimiento del hongo *Aureobasidium pullulans* en condiciones enológicas y caracterización aromática del medio

Growth of fungi *Aureobasidium pullulans* in enological
conditions and aromatic characterization of the medium

Noelia Ruiz Paredes

Directores:

Ana Escudero Carra

Departamento de Química Analítica, Laboratorio de Análisis de Aroma y
Enología (LAAE), Facultad de Ciencias

José Antonio Aínsa Claver

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Área
de Microbiología, Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza, 2018-2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1. El vino: proceso de vinificación y características.....	2
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y fermentación alcohólica.....	2
3. <i>Aureobasidium pullulans</i> : características y aplicaciones.....	3
4. El aroma en el vino.....	4
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
1. Cepas de hongos y levaduras, condiciones de cultivo y conservación.....	6
2. Preparación del mosto sintético e inóculo de levadura y hongo.....	6
3. Test triangular.....	7
4. Obtención de un extracto concentrado del aroma de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE).....	7
5. Cromatografía de Gases – Olfatometría (GC-O).....	8
6. Caracterización microbiológica de <i>Aureobasidium pullulans</i>	9
6.1 Estudio de la tolerancia a etanol.....	9
6.2 Estudio de la tolerancia a sulfito mediante ensayo con MTT.....	9
6.3 Ensayo del factor <i>killer</i>	10
7. Genotipado de cepas por métodos moleculares.....	10
7.1 Extracción de DNA.....	10
7.2 Amplificación por PCR para la identificación de género y especie.....	11
7.3 Purificación de los productos de PCR y secuenciación.....	12
8. Digestión enzimática.....	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
1. Fermentaciones con <i>Aureobasidium pullulans</i>	13
2. Resultados de los test triangulares.....	15
3. Resultados de la olfatometría (GC-O).....	15

4. Caracterización microbiológica de <i>Aureobasidium pullulans</i>	17
4.1 Determinación de la relación entre DO y ufc/mL.....	17
4.2 Resultados del estudio de la tolerancia a etanol.....	17
4.3 Resultados del estudio de la tolerancia a sulfito.....	18
4.4 Resultados de factor <i>killer</i>	19
5. Resultados de secuenciación e identificación.....	20
6. Resultados del gel de digestión enzimática.....	21
 V. CONCLUSIONES	 23
 IV. BIBLIOGRAFÍA	 24

RESUMEN

En las Bodegas Matarromera (Valladolid) detectaron un defecto aromático desagradable, similar al olor del espárrago, en algunos lotes de vino. El análisis del DNA microbiano presente en dichos vinos determinó que, además de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, más del 50% del DNA de levaduras pertenecía al hongo *Aureobasidium pullulans*. Tras este resultado se pensó que este pudiera haber sido el microorganismo productor de los compuestos aromáticos asociados a dicho olor.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si es posible que el hongo *A. pullulans* proliferare en las condiciones dadas durante la fermentación alcohólica del mosto de la uva y si es capaz de producir compuestos que pudieran haber generado el defecto aromático en el vino. Para ello, se lanzaron fermentaciones alcohólicas con *S. cerevisiae* en mosto sintético, tanto por separado como junto con *A. pullulans*, y se realizó el seguimiento y control del crecimiento microbiológico. Además, se obtuvo un extracto concentrado de la muestra para evaluarlo mediante Cromatografía de Gases – Olfatometría (GC-O). También se ha intentado desarrollar un método de rápida detección de la presencia de *A. pullulans* en vinos.

Se ha observado una pérdida de viabilidad de *A. pullulans* transcurridas 48 horas desde el comienzo de la fermentación alcohólica, asociada al aumento de etanol en el medio, pues este hongo ha demostrado ser resistente a sulfito y factor killer. En el análisis olfatométrico de la muestra no se ha encontrado ningún compuesto volátil que pudiera haber sido causante del olor a espárrago.

ABSTRACT

Some batches of wine coming from Matarromera Wineries (Valladolid) were reported to have an unpleasant aromatic defect, similar to asparagus' smell. The analysis of microbial DNA from that wines showed that about 50% of yeast DNA belonged to the yeast-like-fungi *Aureobasidium pullulans*. The rest of DNA belonged to *Saccharomyces* and no-*Saccharomyces* yeasts. For this reason, it was proposed that these fungi could have produced some aromatic compounds related to this odor.

The objective of the present project is to study if it is possible for *A. pullulans* to proliferate in the conditions given during the alcoholic fermentation of grape juice and if this specie of fungus is able to produce compounds causing the aromatic defect. To this aim, there were launched some alcoholic fermentations with *S. cerevisiae* in synthetic must, individual and also along with *A. pullulans*, and the proliferation of microorganisms was continuously tracked. In addition, an extract from the fermented sample was analyzed by Gas Chromatography – Olfactometry (GC-O). An attempt has also been made to develop a method to quickly distinguish the presence of *A. pullulans* in wine.

A decrease in *A. pullulans* viability was observed during the first 48 hours of the alcoholic fermentation. This fact may be associated to the increase of ethanol concentration in the must, since the fungi has been tested to be sulfite and killer toxin resistant. In the olfactometric analysis of the sample there have not been found any volatile compound which could be responsible for the asparagus' smell.

I. INTRODUCCIÓN

1. El vino: proceso de vinificación y principales características

La transformación del mosto procedente de la uva en vino es el resultado de una serie de reacciones bioquímicas llevadas a cabo por diferentes microorganismos, como levaduras y bacterias, que se desarrollan de manera secuencial. La principal reacción es la fermentación alcohólica, mediante la cual los azúcares presentes en el mosto son transformados en etanol y dióxido de carbono. Las levaduras son las responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica del mosto, proceso que suele ir seguido de otra fermentación, la maloláctica, llevada a cabo por bacterias lácticas para disminuir la acidez del vino, transformando ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono ^[1,2].

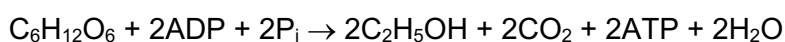
Las levaduras endógenas propias de la uva son sustituidas, conforme la fermentación avanza y el grado alcohólico aumenta, por levaduras del género *Saccharomyces*, con mayor capacidad para llevar a cabo la fermentación alcohólica y mayor resistencia al etanol. Esta sucesión de poblaciones también se debe a las condiciones de anaerobiosis y a los procesos de sulfitado del mosto ^[3,4]. Una de las levaduras principales de este género y responsable de la fermentación alcohólica de los vinos es *Saccharomyces cerevisiae* ^[5].

Las especies predominantes de levaduras y bacterias, así como el grado de crecimiento que alcancen y las interacciones que se establecen entre ellas, determinan en parte el tipo de compuestos producidos y la concentración de éstos, lo que tiene un impacto directo en el aroma, características sensoriales y calidad del vino ^[1]. Otros factores como la variedad de la uva, su estado de maduración en el momento de la vendimia, la zona geográfica y las condiciones meteorológicas o las prácticas de vinificación propias de cada bodega también tienen una amplia influencia en las características finales de los vinos ^[4,6].

2. *Saccharomyces cerevisiae* y fermentación alcohólica

S. cerevisiae es una especie de levadura ampliamente utilizada en la producción de vino, cerveza y pan, principalmente, desde la antigüedad. Se trata de un hongo unicelular que se encuentra de manera habitual en la superficie de las uvas, siendo el microorganismo más importante a lo largo de la fermentación, ya que es capaz de crecer en concentraciones muy elevadas de azúcar (entre 200 y 250 g/L) y bajo pH (en torno a 3.5). Además, tiene una alta tolerancia a la concentración de etanol, lo que le aporta una gran ventaja competitiva frente a otros microorganismos ^[7].

S. cerevisiae lleva a cabo la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en el mosto, principalmente glucosa y fructosa, para convertirlos en etanol y dióxido de carbono ^[7]. La reacción global de la fermentación alcohólica se puede expresar como:



Además de etanol, las levaduras también producen una pequeña cantidad de compuestos aromáticos volátiles, como ésteres, alcoholes superiores, compuestos carbonílicos y ácidos y fenoles volátiles ^[4,7]. El etanol producido ayuda a extraer compuestos de las pieles de las uvas que serán los responsables del color del vino ^[6].

No obstante, no solo las levaduras son responsables de las características finales del vino, sino que también influyen el resto de microorganismos presentes en las uvas, como bacterias y hongos filamentosos. El crecimiento de levaduras propias de la vid en estadios prematuros puede causar un consumo de nutrientes desfavorable a la posterior fermentación alcohólica. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que muchas de las levaduras que han crecido en el mosto van a morir y sufrir autólisis, liberando al medio aminoácidos y vitaminas que van a favorecer el crecimiento de otras especies, además de liberar enzimas que van a ayudar a digerir y utilizar los nutrientes presentes en el mosto ^[6,9].

Por otra parte, *S. cerevisiae* es productora de toxina *killer*, que puede inhibir el crecimiento de otros microorganismos. El “factor *killer*” se asocia con un RNA de doble cadena relacionado con la producción de dos virus: el virus *helper*, que proporciona la maquinaria necesaria para la formación de la toxina; y el virus *killer*, una preproteína que al madurar da lugar a la toxina *killer*. Existen tres tipos mayoritarios de toxina *killer*, K₁, K₂ y K₂₈, con distinta letalidad, pero con un modo de actuación similar. Así, las cepas productoras de toxina *killer*, y resistentes a ella, son interesantes por su uso en enología para evitar el crecimiento de microorganismos que pudieran estropear el producto ^[10].

3. *Aureobasidium pullulans*: características y aplicaciones

A. pullulans es un hongo dimórfico, que se puede presentar como fase levadura (células individualizadas) o como fase micelial, en la cual abundan los filamentos que forman el micelio. Es un saprobio ubicuo, de distribución mundial, que se encuentra sobretodo en suelos de bosques, agua corriente, en la filosfera de las plantas y en sus semillas ^[13]. Se ha encontrado en un amplio rango de climas, desde 2 a 35°C, y también en ambientes con alto estrés osmótico, como en salinas o rocas. Además, se ha visto que crece sobre frutas causando un gran deterioro en las mismas y provocando fisuras en su superficie ^[11-13,16]. *A. pullulans* es una de las especies predominantes que se han aislado de la superficie de las uvas en todos los estados de madurez ^[15].

Existen dos variedades principales: *A. pullulans* var. *pullulans*, con colonias blancas y cremosas; y *A. pullulans* var. *melanogenum*, cuyas colonias son inicialmente blancas, para rápidamente tornarse de color negruzco o gris oscuro, debido a la producción de clamidosporas ^[12,13].

A. pullulans produce una gran cantidad de compuestos de interés para su utilización en biotecnología, y su uso es seguro para el medioambiente. A pesar de ello, se trata de un hongo patógeno oportunista en humanos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos ^[14].

Entre sus productos se encuentran enzimas como amilasas, celulasas o lipasas. Al encontrarse este hongo en ambientes extremos, estas enzimas van a tener características extremófilas que pueden ser de utilidad en las condiciones a las que se llevan a cabo muchos procesos industriales ^[11,13]. Se ha visto que *A. pullulans* tiene actividad antimicrobiana, influyendo en la ecología de la superficie de la uva, destacando sobretodo la disminución del crecimiento de *Botrytis cinerea*, uno de los principales hongos patógenos de la vid, por lo que podría tener interés como agente de control biológico ^[13,16]. Cabe destacar que este hongo también es conocido por producir

pululano, un polisacárido formado a partir de almidón, ampliamente utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética ^[11,13].

En cuanto al impacto de *A. pullulans* en los vinos, se ha propuesto el uso de preparados de β -glucosidasas procedentes de este hongo para mejorar la extracción de compuestos aromáticos procedentes de la uva, como monoterpenos ^[17]. Por otra parte, Merín et al. ^[18] han realizado estudios sobre el efecto de *A. pullulans* en vinos de la variedad Malbec, realizando una maceración en frío y la posterior fermentación del mosto con *S. cerevisiae* y *A. pullulans*. Observaron que la presencia de este hongo incrementaba y resaltaba el aroma floral y dulce (a violeta y ciruela) del vino. Así, este podría tener un potencial uso en fermentaciones a baja temperatura, si bien falta por comprobar este efecto en microvinificaciones sobre mosto sin pasteurizar. Hasta la fecha, nunca se ha descrito que *A. pullulans* esté asociado con el deterioro de vinos.

4. El aroma en el vino

El aroma y sabor característico de cada vino es lo que hace que se diferencien unos de otros entre la gran cantidad de vinos que son producidos en todo el mundo ^[8]. El aroma comprende un gran número de compuestos químicos en diferentes concentraciones, tanto propios de la variedad de uva como resultado de los procesos bioquímicos que ocurren durante la fermentación. Así, el aroma del vino se puede clasificar según el origen de los diferentes compuestos que contribuyen al mismo ^[19]:

- Aroma varietal (compuestos que proceden directamente de las uvas).
- Aroma pre-fermentativo (compuestos formados durante la producción del mosto).
- Aroma de fermentación (producido por las levaduras y bacterias lácticas).
- Aroma post-fermentativo (compuestos que aparecen durante el proceso de envejecimiento o almacenamiento en barricas de madera).

Estos compuestos son recibidos por los receptores olfativos de la nariz, viajando hasta el bulbo olfatorio, que procesa la información y la convierte en estímulo neuronal. Muchos de estos compuestos se encuentran en concentraciones muy pequeñas, y solamente algunos de ellos se encuentran en cantidad suficiente para superar el umbral de percepción y ejercer una influencia sobre las características aromáticas del vino ^[20], y, por tanto, sobre la opinión y percepción final del consumidor sobre el producto.

La técnica más utilizada para determinar la composición aromática del vino es la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O). Este método utiliza la nariz humana para detectar e identificar los compuestos eluidos de la columna de cromatografía de manera individual, y clasificarlos en función de la intensidad con la que son percibidos, lo que está relacionado con su importancia en el impacto aromático final del producto ^[21,22].

Existen varios métodos de jerarquización mediante GC-O destacando entre ellos ^[23]:

- Método AEDA: se determina, para cada odorante, un factor de dilución (FD) que corresponde con la última dilución del extracto en la que se percibió. Los compuestos con mayor FD son los que mayor impacto tienen en el aroma.
- Método de las frecuencias de detección: los jueces indican la presencia o ausencia del olor. El número de veces que el olor ha sido detectado se relaciona con la intensidad del mismo, normalizando el número de veces que este es percibido. Este valor se expresa como valor NIF (*Nasal Impact Frequency*).

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Este trabajo surge a raíz del descubrimiento de un defecto aromático en algunos lotes de vino elaborado en las bodegas Matarromera, en Valbuena de Duero (Valladolid). Este defecto consistía en un aroma desagradable a espárrago, por lo que el vino fue analizado en busca de los microorganismos que pudieran haber provocado este olor, mediante la secuenciación del DNA microbiano presente en la muestra.

Los resultados de la secuenciación, disponibles en el portal WineSeq®, mostraron que un 99.7% del DNA bacteriano analizado pertenecía a *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentación maloláctica, y un 0.2% correspondía a bacterias acéticas del género *Acetobacter*, lo que en principio se ajusta a lo esperado en un vino terminado.

Sin embargo, el análisis de DNA de levaduras mostró que solo un 26% pertenecía a levaduras del género *Saccharomyces* (con presencia de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*) y un 16% pertenecía a levaduras no-*Saccharomyces*, entre las que destaca *Kluyveromyces thermotolerans*, mientras que más del 50% del DNA encontrado pertenecía al hongo *Aureobasidium pullulans* (un hongo que forma parte de la microbiota normal de la uva), por lo que la hipótesis de partida fue que el responsable de la producción de los compuestos aromáticos asociados al olor a espárrago hubiera sido este microorganismo.

Así, los **objetivos** de este trabajo van encaminados en tres direcciones:

1. Determinar si es posible que *A. pullulans* prolifere durante la fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras *Saccharomyces*
2. Estudiar si *A. pullulans* es capaz de producir por sí mismo compuestos que aporten defectos aromáticos a los vinos.
3. También se plantea, como objetivo adicional, el desarrollo de un método de detección, de manera rápida y sencilla, de la presencia de *A. pullulans* en el mosto o vino terminado.

Para los dos primeros objetivos se van a someter a varias cepas de *A. pullulans* a diferentes condiciones similares a las que se pueden encontrar en el vino, como diferentes concentraciones de etanol y sulfito o presencia de toxina *killer* producida por algunas levaduras. Además, se va a realizar un seguimiento de la proliferación de este hongo en fermentaciones llevadas a cabo sobre mosto sintético. Las fermentaciones se van a controlar sensorial y molecularmente.

Para el tercer objetivo, las dos cepas de *A. pullulans* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) junto con varias cepas del mismo hongo aisladas de uvas de la Denominación de Origen Campo de Borja, se someterán a análisis genéticos para tratar de encontrar diferencias detectables respecto a *S. cerevisiae*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de hongos y levaduras, condiciones de cultivo y conservación

La cepa de levadura *S. cerevisiae* QA23 se adquirió de la casa comercial Lalvin en forma de levadura deshidratada. Para preparar las fermentaciones, se pesó 1 g de levadura seca y se hidrató durante 20 minutos en 10 mL de agua milliQ, y a continuación se añadieron 10 mL de mosto sintético.

Las cepas de *A. pullulans* 2660 y 20905 fueron adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo en forma de liófilos, que fueron reconstituidos en medio de cultivo líquido YPD (extracto de levadura 10 g/L; agua de peptona 20 g/L; glucosa 20 g/L) y cultivados en YPD líquido o YPD sólido (suplementado con 25g/L de agar). Los cultivos se incubaron a 25°C hasta que se observó crecimiento visible. En los cultivos líquidos, el número de células se estimó a partir de la densidad óptica medida a 600 nm, e interpolando en una recta de calibrado realizada a partir de la relación de DO_{600} con las unidades formadoras de colonias (ufc). Para preparar los inóculos de las fermentaciones, los cultivos se centrifugaron a 1400 x g a 4°C y las células se resuspendieron en mosto sintético.

En algunos experimentos se han utilizado las cepas de *A. pullulans* YBU 38, YBU 40, YBU 41, YBU 43 e YBU 46, disponibles en la colección de cultivos del Departamento de Microbiología, que fueron aisladas a partir de uvas de la D. O. Campo de Borja.

Para conservar a largo plazo las cepas de *S. cerevisiae* y *A. pullulans*, a cultivos crecidos en YPD se añadió glicerol hasta una concentración final de 15% y se conservaron a -80°C.

2. Preparación del mosto sintético e inóculo de levadura y hongo

El mosto sintético utilizado para llevar a cabo la fermentación pretende simular las características del mosto procedente de la uva. Se ha realizado con la composición propuesta por Hernandez-Orte *et al.* ^[24] con algunas modificaciones: 105 g/L glucosa, 105 g/L fructosa, 5 g/L ácido L-tartárico, 0.3 g/L ácido cítrico, 0.3 g/L ácido L-málico; sales minerales (mg/L): KH_2PO_4 (2000), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (200), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (155); oligoelementos (mg/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (4.7), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0.49), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.19), $CuCl_2$ (0.54), KIO_3 (1.29), H_3BO_3 (1), Cl_2Zn (2); vitaminas (mg/L): piridoxina HCl (1), ácido nicotínico (1), pantotenato de calcio (1), tiamina HCl (1), ácido p-aminobenzoico (1), riboflavina (0.2), ácido fólico (0.2); biotina (0.04); mio-inositol (300); y factores de crecimiento en anaerobiosis (mg/L): ergosterol (15), 0.53 g de Tween 80 en etanol 0.05% (v/v). La cantidad de amonio en el mosto corresponde a 219.9 mg/L de $(NH_4)_2HPO_4$, además de 10 mL de un stock de aminoácidos básicos y de 5 mL de aminoácidos específicos 200 mg/L (composición de stocks de aminoácidos en anexo, tablas 1 y 2). Tras añadir todos los componentes, el mosto sintético se debe ajustar a pH igual a 3.5 añadiendo NaOH 1M en agitación suave. Se enrasa con agua milliQ hasta un volumen final de 1 litro.

El volumen final de mosto se filtró de forma abiótica y se repartió en 10 botellas Pyrex estériles de 250 mL, conteniendo cada una de ellas 100 mL de mosto.

En estas botellas se llevaron a cabo, por duplicado, distintos procesos fermentativos:

- Fermentación tras la inoculación de *S. cerevisiae* QA23.
- Fermentación tras la inoculación de *S. cerevisiae* QA23 y *A. pullulans* 2660.
- Fermentación tras la inoculación de *S. cerevisiae* QA23 y *A. pullulans* 20905.
- Incubación de *A. pullulans* 20905 en el mosto sintético.

En todas las botellas en las que se iba a llevar a cabo la fermentación se añadió 1 mL del preparado de levadura, lo que corresponde a aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL. En algunas botellas se añadió el hongo, en una concentración de $8 \cdot 10^5$ ufc/mL.

Tras la inoculación, las botellas se cerraron con válvulas Müller para impedir la entrada de oxígeno y permitir la salida de CO₂ producido durante la fermentación alcohólica. Las botellas se incubaron a una temperatura entre 20 y 21°C.

El seguimiento de la fermentación se llevó a cabo pesando las botellas cada 24 horas aproximadamente, ya que la pérdida de peso se puede relacionar directamente con la producción de CO₂. El seguimiento del crecimiento y viabilidad de los microorganismos se realizó plaqueando diferentes diluciones procedentes de las botellas en medio YPD sólido y contando el número de colonias.

3. Test triangular

El test triangular para análisis sensorial es una prueba que permite discriminar entre muestras con características ligeramente diferentes, en este caso fermentaciones realizadas tan solo con *S. cerevisiae* o fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* y *A. pullulans*. Se enfrentan tres muestras entre sí, siendo dos iguales y una de ellas diferente. Los jueces del panel, miembros del Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE), han de seleccionar la muestra que es diferente respecto a las otras dos, describiendo brevemente el por qué de la diferencia ^[25].

El test se llevó a cabo en copas de color negro opaco, las cuales contenían 10 mL de la muestra correspondiente. Se identificaron con un número aleatorio, de modo que el juez no tuviera ningún indicativo de cuál era la copa cuyo contenido es diferente. Tras la prueba, se contabilizaron los aciertos y se compararon con el número mínimo de respuestas correctas para establecer significancia a diferentes niveles de probabilidad según distribución binomial, teniendo en cuenta el número de jueces.

El objetivo de esta prueba es la selección de las muestras diferentes al control (mosto fermentado con *S. cerevisiae*) para su posterior análisis mediante olfatometría.

4. Obtención de un extracto concentrado del aroma de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE)

La SPE permite concentrar compuestos que en la matriz de la muestra se encuentran en una proporción menor al 0.01%, como los compuestos aromáticos de interés en este caso. La obtención del extracto se realizó mediante las siguientes etapas:

1. Preparación de un cartucho con 65 mg de resina LiChrolut EN.

2. Acondicionamiento de la resina, pasando a través de ella 2 mL de diclorometano, 2 mL de metanol y 2 mL de agua milliQ, empleando vacío.
3. Quince mililitros de nuestra se trasvasaron al reservorio colocado sobre el cartucho de resina y se percolaron a una velocidad aproximada de 2 mL/min, con el sistema de vacío.
4. Lavado con 1.5 mL de disolución agua/metanol al 30% v/v y 1% en peso de NaHCO₃.
5. Secado de los cartuchos empleando vacío para eliminar el agua de la resina.
6. Elución gota a gota con 600 µL de diclorometano con un 5% v/v de metanol.
7. Recogida del eluato en viales de 2 mL para su análisis por GC-O.

5. Cromatografía de Gases – Olfatometría (GC-O)

La olfatometría consiste en poner la nariz a la salida de la columna cromatográfica, como detector. El *sniffer* apunta el tiempo al que sale el olor y la descripción del mismo.

El tiempo al que sale el olor debe compararse con los tiempos de retención de los alcanos inyectados en las mismas condiciones que las muestras. De esta forma, usando la siguiente fórmula se calcula el índice de retención lineal de cada zona de olor, para compararlo con las bases de datos.

$$\text{Índice de retención (IR)} = 100 \cdot Z + 100 \cdot \frac{\log(t_{Rx}) - \log(t_{RZ})}{\log(t_{Ry}) - \log(t_{RZ})}$$

Ecuación 1. Z representa el número de carbonos del alcano anterior al compuesto de interés, t_{Rx} el tiempo de retención del analito de interés (x), t_{RZ} el tiempo de retención del alcano anterior a x, y t_{Ry} el del posterior. Los tiempos de retención se miden en escala centesimal.

Los análisis de GC-O se realizaron utilizando dos cromatógrafos de gases:

Cromatógrafo I (columna polar): Trace GC (ThermoQuest) con un detector de ionización de llama (FID) y un puerto olfatométrico ODO-I (SGE,). La columna capilar es una DB-WAX (polietilenglicol) de J&W (Folsom), de 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.5 µm. Como fase móvil se utilizó hidrógeno a un flujo constante de 3.5 mL min⁻¹. La inyección se realizó en modo “*splitless*” (tiempo de “*splitless*” 60 s), inyectando un volumen de 1 µL de muestra, con el inyector y el detector a 250°C [21].

El programa utilizado para el análisis de la muestra fue de 40°C durante 2 min, aumentando 10°C min⁻¹ hasta 80°C, 4°C min⁻¹ hasta 112°C y a continuación 6°C min⁻¹ hasta 220°C, manteniendo esta temperatura 10 minutos. La olfatometría se llevó a cabo entre los minutos 2 y 30.

Cromatógrafo II (columna apolar): GC8000 series (Fisons Instruments) con detector de ionización de llama (FID) y puerto de *sniffing* ODO-I (SGE). La columna de capilaridad es VF-5ms (J&W), de 30 m x 0.32 mm i.d. x 1 µm. El gas portador fue hidrógeno a 3 mL min⁻¹. Se inyectó 1 µL de muestra en modo “*splitless*” (tiempo de “*splitless*” 60 s). La temperatura de inyector y detector fue de 250°C.

El programa de temperaturas fue 50°C durante 3 minutos, seguido de aumento de 10°C min⁻¹ hasta alcanzar los 100°C, 8°C min⁻¹ hasta 250, manteniéndose durante 10 minutos. La olfatometría se realizó entre los minutos 2 y 28.

La jerarquización de las zonas de olor se ha llevado a cabo por el método AEDA (*Aroma Extraction Dilution Analysis*), diluyendo el extracto en factores 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 hasta percibir muy pocas zonas de olor (las más importantes). Para la identificación de los compuestos responsables de las zonas de olor se ha usado la descripción de los aromas de cada zona y los índices de retención lineales tanto en DB-WAX como en DB-5, comparándolos con las bases de datos.

6. Caracterización microbiológica de *Aureobasidium pullulans*

6.1 Estudio de la tolerancia a etanol

1. A partir de un cultivo de la cepa a estudiar previamente crecido en medio YPD líquido se realiza un recuento de células midiendo la densidad óptica de 600 nm e interpolando en una recta de calibrado realizada a partir de la relación de DO_{600} con las unidades formadores de colonias (ufc).
2. Se realiza una dilución adecuada de modo que la concentración de células en el volumen final utilizado para el ensayo de tolerancia sea de aproximadamente 10^5 ufc/mL en el caso de la levadura y algo mayor para ambas cepas de hongo.
3. A continuación, se inoculan tubos de YPD líquido con distintas concentraciones de etanol absoluto:

0%, 3%, 6%, 9% y 12% v/v en el caso de *S. cerevisiae*.

0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% v/v en el caso de *A. pullulans*.

4. Estos tubos se incuban durante el tiempo necesario para observar crecimiento en estufa a una temperatura de 25°C (48 horas para la levadura, 144h para el hongo). Transcurrido ese tiempo se medirá la densidad óptica a 600 nm, lo que va a permitir determinar el número de ufc/mL con la recta de calibrado mencionada en el apartado 1 de estos Materiales y Métodos.
5. El número de ufc/mL permite calcular la tasa de crecimiento celular (μ), mediante la expresión:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$

Donde N_0 es el número inicial de ufc inoculadas; N el número de ufc obtenido tras la incubación; μ la tasa de crecimiento; y t el tiempo transcurrido.

6. A partir de la tasa de crecimiento se obtiene el porcentaje de inhibición para las diferentes concentraciones de etanol, a partir de la fórmula:

$$\% \text{ inhibición [EtOH]} = [1 - (\mu \text{ YPD}_{\text{EtOH}} / \mu \text{ YPD})] \cdot 100$$

Los valores de % inhibición aumentarán conforme aumenta la concentración de etanol en la muestra, pudiendo llegar a superar el 100% de inhibición, lo que indica que esa cantidad de etanol es letal para el microorganismo.

6.2 Estudio de la tolerancia a sulfito mediante ensayo con MTT

1. Sobre una placa de 96 pocillos, añadir 100 μ L de medio YPD líquido a todos los pocillos.
2. Añadir 100 μ L de metabisulfito potásico ($K_2S_2O_5$) de una dilución de concentración 12.8 g/L de metabisulfito, es decir, 6.4 g/L de sulfuroso libre, a los pocillos de la primera fila.

3. Mezclar y transferir 100 μ L de la primera fila a la segunda, y así sucesivamente hasta la penúltima fila, de la cual se retiran 100 μ L y se desechan. La última fila no contendrá metabisulfito.
4. A continuación, inocular los pocillos de cada columna con 100 μ L de cultivo líquido de las cepas seleccionadas (*A. pullulans* 2660, YBU 38 e YBU 40) por duplicado.
5. La placa se deja incubar el tiempo necesario hasta que se observe crecimiento.
6. Transcurrido ese tiempo añadir 30 μ L por pocillo de MTT 5 mg/mL (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) e incubar a 25°C aproximadamente 48 horas. El MTT es un compuesto soluble de color amarillo que se reduce a formazán, un compuesto insoluble de color morado, por acción de las deshidrogenasas mitocondriales, de modo que el cambio de color solamente se observará en aquellos pocillos en los que haya habido crecimiento celular.
7. Cubrir las placas con film transparente adhesivo y medir la absorbancia a 580 nm para, posteriormente, calcular el porcentaje de viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad se determina tomando como referencia el pocillo que no tiene sulfuroso.

6.3 Ensayo del factor *killer*

El factor *killer* es una toxina producida por algunas levaduras, y que es letal para otras levaduras y otros microorganismos. Así, se puede establecer una clasificación en función del fenotipo: las cepas productoras se denominan *killer* (K), las no productoras pero susceptibles a ella se denominan sensibles (S) y las no productoras y no sensibles se denominan neutras (N).

Para evaluar la sensibilidad de *A. pullulans* a la toxina *killer* se realizó un ensayo sobre placas con medio *killer* (glucosa (20 g/L), peptona (10 g/L), extracto de levadura (10 g/L), agar (20 g/L) y pH 4.2). Se emplearon como referencia una cepa matadora (K^+R^+), una cepa sensible (K^-R^-), y para el ensayo se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* QA23 y las cepas de *A. pullulans* 2660 y 20905. En diferentes placas se han extendido las cepas de *S. cerevisiae* K^+R^+ , K^-R^- y QA23 como un césped, y sobre ellas se depositó una alícuota de ambas cepas de hongo, además de las propias cepas utilizadas de césped a modo de control. En el caso de que *A. pullulans* sea sensible al factor *killer* crecerá solamente sobre la placa con el césped de la cepa K^-R^- , mientras que si es resistente crecerá tanto en el césped K^+R^+ como en el K^-R^- .

7. Genotipado de cepas por métodos moleculares

7.1 Extracción de DNA

El procedimiento está basado en el método propuesto por Park S. *et al.* ^[26], sobre el cual se han realizado algunas modificaciones:

1. Tomar aproximadamente 50 mg de micelio de una placa de YPD y mezclar con 500 μ L del buffer de extracción (KCl 1M, Tris 0.1M, EDTA 10mM) en tubos con matriz para Fast-Prep®. Realizar 2 ciclos de 40 segundos a 6 m/s para romper las células de forma mecánica.
2. Centrifugar a 1700 x g 10 minutos y decantar el sobrenadante a un eppendorf con 0.3 mL de isopropanol.

3. Mezclar y centrifugar a 10000 x g 10 minutos y eliminar el sobrenadante. Añadir 500 μ L de etanol absoluto sobre el pellet y despegarlo del fondo del tubo.
4. Centrifugar a 10000 x g 10 minutos. Decantar la máxima cantidad de etanol posible y secar a 37°C durante 15 min.
5. Añadir 50 μ L de agua y 1 μ L de RNAsa a cada eppendorf seco y resuspender para disolver.
6. Realizar una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico, añadiendo 500 μ L de Tris-EDTA y 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Mezclar bien las dos fases.
7. Centrifugar a 6700 x g 5 minutos y trasvasar el sobrenadante (fase acuosa) a un eppendorf limpio. La fase orgánica se desecha.
8. Añadir a la fase acuosa 40 μ L de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol absoluto. Mezclar bien y llevar a -20°C mínimo 30 minutos.
9. Centrifugar a 6700 x g 5 minutos. Decantar el sobrenadante y secar a 37°C.
10. Añadir 50 μ L de Tris-EDTA y determinar la concentración de ácidos nucleicos utilizando el espectrofotómetro NanoDrop®. Tomar 1.5 μ L de DNA y se mide la absorbancia a 260 nm. Mediante un factor de conversión se obtiene la concentración de DNA en ng/ μ L.

7.2 Amplificación por PCR para la identificación de género y especie

El método elegido para la identificación se basa en la amplificación y secuenciación de la región que comprende los dominios D1 y D2, en el extremo 5' del gen del RNA ribosómico 26S (entre los nucleótidos 63 y 642 de *S. cerevisiae*). La amplificación se ha llevado a cabo mediante una PCR utilizando los *primers* **NL1** (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y **NL4** (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') descritos por Kurtzman y Robnett en 1998^[27].



Figura 1. Dominios D1 y D2 en el gen 26S.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L, con la siguiente composición: 10 μ L de buffer de reacción 5X MyTaq™ (contiene dNTPs 5 mM, MgCl₂ 15 mM, estabilizantes y *enhancers*), 1 μ L de NL1 (20 μ M), 1 μ L de NL4 (20 μ M), 1 μ L de DNA polimerasa MyTaq™, 1 μ L de la muestra de DNA y 36 μ L de agua milliQ.

Las condiciones del termociclador para la PCR fueron las siguientes: 1 min de desnaturalización a 95°C; 35 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 15 segundos a 52°C (*annealing*) y 10 segundos a 72°C (extensión).

Para la visualización de los productos de amplificación se corrió una electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 0.1 mM EDTA) con bromuro de etidio. En uno de los pocillos se cargaron 4 μ L del marcador de peso molecular de 100 pb y en los pocillos restantes 10 μ L de la muestra junto con

tampón de carga. La electroforesis se dejó correr a 90 voltios durante aproximadamente 40 minutos. El resultado se visualizó al colocar el gel bajo luz UV.

7.3 Purificación de los productos de PCR y secuenciación

Para la purificación de los productos se utilizó el kit ExoSAP-IT™, añadiendo 2 µL del reactivo (exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba) a 5 µL del producto de PCR. A continuación, se incubó en el termociclador durante 45 minutos a 37°C para eliminar los primers, y 15 minutos a 80°C para inactivar el reactivo.

La muestra tratada se envió al servicio de secuenciación del Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Los resultados de la secuenciación se compararon con la base de datos GeneBank a través del programa BLAST del NCBI.

8. Digestión enzimática

Con el objetivo adicional de desarrollar un método para identificar la presencia de *A. pullulans* en un vino con rapidez, y sin necesidad de realizar cultivos ni reacciones de secuenciación, hemos planteado el uso de enzimas que tengan un único sitio de corte dentro de la región D1/D2 que hemos amplificado en *A. pullulans* y que no lo tengan en *S. cerevisiae*. Para ello se emplearon las enzimas AatII, DraI y DpnI.

La digestión enzimática se realizó en un volumen final de 20 µL, de los cuales 10 µL corresponde al producto de PCR, 2 µL al buffer correspondiente a la enzima, 1 µL de enzima (10 U/µL) y 7 µL de agua estéril. La digestión tuvo lugar durante 1 hora en un baño de agua a 37°C. Las enzimas AatII y DpnI y el buffer Tango 1X (33 mM Tris-acetato, 10 mM Mg-acetato, 66 mM K-acetato y 0.1 mg/mL BSA) son de Thermo Fischer Scientific y la enzima DraI y buffer M 1X (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTE) son de la casa comercial Roche.

Para la visualización de los productos de digestión se ha utilizado un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5x (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 0.1 mM EDTA) añadiendo 10 µL de muestra en cada uno de los pocillos, además del marcador de peso molecular de 100 pb junto con el tampón de carga. Se dejó correr la electroforesis durante 1 hora a 60 voltios. El resultado se visualizó utilizando un transiluminador.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Fermentaciones con *Aureobasidium pullulans*

Las botellas en las que se ha llevado a cabo la fermentación por duplicado, tanto con *S. cerevisiae* como las fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* y *A. pullulans*, permanecieron durante 22 días en incubador a 21°C. Cada día se pesan en una báscula anotando el peso y la hora a la que se realiza la pesada, de modo que se obtiene una gráfica que representa la pérdida de peso promedio de los duplicados en función del tiempo transcurrido. Así, se genera un gráfico que representa la pérdida de peso (producción de CO₂) y que permite saber si la fermentación está sucediendo a una velocidad adecuada. Además, se puede conocer el momento en el que la fermentación ha terminado, ya que el peso de las botellas se estabiliza (figura 2).

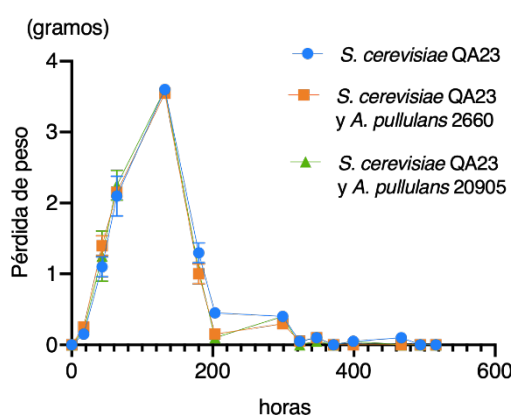


Figura 2. Pérdida de peso promedio por horas.

En la curva de pérdida de peso (figura 2) no se observan diferencias significativas entre la fermentación con solamente levadura y las fermentaciones mixtas: ambas siguen una cinética normal, independientemente de la presencia del hongo, con la mayor pérdida de peso y, por tanto, de producción de CO₂, durante aproximadamente las 200 primeras horas (5 días) de fermentación, para después continuar perdiendo peso gradualmente hasta estabilizarse en el momento en que no quedan más azúcares por fermentar, momento en el que se da por terminada la fermentación.

La pérdida de peso total promedio es de 9.4 g en la fermentación con *S. cerevisiae*, y 8.95 g en cada una de las fermentaciones con *S. cerevisiae* y *A. pullulans*. Como control, se preparó una fermentación que contenía únicamente *A. pullulans* y la pérdida de peso fue de aproximadamente 0.1 g cada tres días, con una pérdida total de peso de 0.5 gramos. La realización de una prueba t de Student para estos valores, comparando la fermentación con solo *S. cerevisiae* con la mixta de cada una de las cepas, determina que la diferencia de peso no es significativa (con una confianza del 95%), de modo que la presencia de *A. pullulans* no afecta a la cinética de la fermentación.

Por otra parte, de una de las botellas de cada duplicado se tomaron 500 µL cada día, para inocular 50 µL de diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ en placas de YPD sólido y contar el número de colonias crecidas a diferentes tiempos. El recuento de cada microorganismo por separado es posible porque las colonias de levadura y hongo presentan una morfología diferente: las levaduras tienen forma de botón y son de color

blanco, mientras que los hongos presentan alrededor del botón central un micelio de aspecto más algodonoso (anexo, figura 1). Para observar la capacidad de crecimiento de los microorganismos se representa en ufc por mL del mosto con respecto a las horas transcurridas desde el comienzo de la fermentación (figuras 3, 4, 5 y 6).

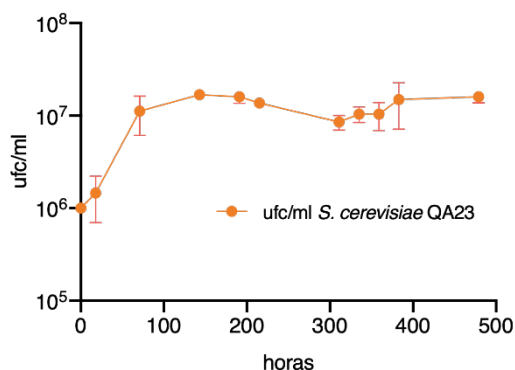


Figura 3. Crecimiento de *S. cerevisiae* QA23.

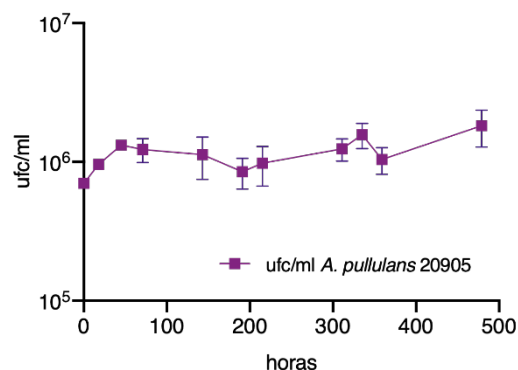


Figura 4. Crecimiento de *A. pullulans* 20905.

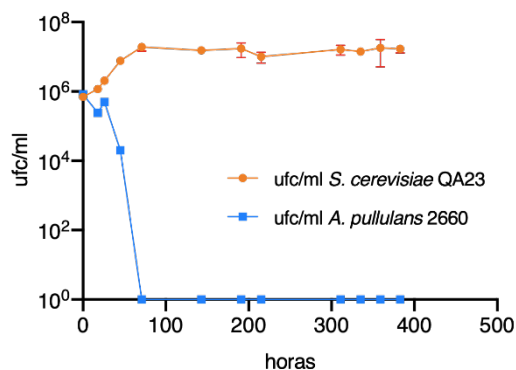


Figura 5. Crecimiento en la fermentación con *S. cerevisiae* QA23 y *A. pullulans* 2660.

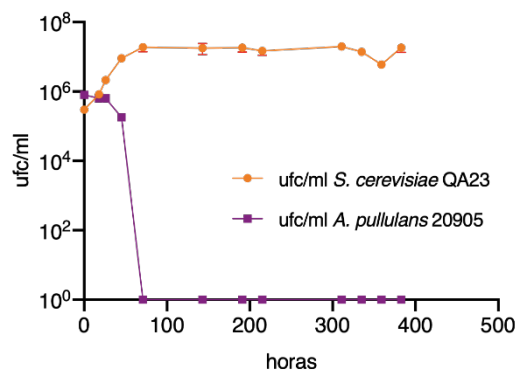


Figura 6. Crecimiento en la fermentación con *S. cerevisiae* QA23 y *A. pullulans* 20905.

En cuanto al desarrollo de *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación se observa que tanto en la fermentación individual (figura 3) como en las mixtas (figuras 5, 6) sufre una primera fase de crecimiento exponencial, que se corresponde en tiempo con la máxima pérdida de peso, para entrar posteriormente en fase estacionaria.

En cambio, *A. pullulans* 20905 no muestra crecimiento exponencial cuando es inoculado en el mosto en ausencia de levadura (figura 4), puesto que mantiene su población, aumentándola ligeramente los últimos días de seguimiento. Va desde $7 \cdot 10^5$ ucf/mL hasta $1.8 \cdot 10^6$ ucf/mL. Se inoculó de manera individual solo esta cepa, y no *A. pullulans* 2660, porque con el test triangular (ver apartado 2: resultados de los test triangulares) se vio que no había diferencias sensoriales significativas entre la fermentación con *S. cerevisiae* y la fermentación con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 2660, pero sí que las había entre la fermentación con *S. cerevisiae* y la fermentación con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905.

Sin embargo, en las fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* (figuras 5 y 6) desde el primer momento la población de hongo comienza a descender, hasta que pasadas las 48h no se detectan las colonias de *A. pullulans*. Esto se podría deber

a competencia por nutrientes entre ambas especies, a la producción de etanol por la fermentación alcohólica de *S. cerevisiae* que inhibiría el crecimiento del hongo, a la sensibilidad a factores *killer* producidos por las levaduras, a la combinación de estos factores, o a otras condiciones del mosto en fermentación que maten o impidan el crecimiento de *A. pullulans*.

2. Resultados de los test triangulares

Se han realizado cuatro test triangulares: en los primeros se han comparado las fermentaciones realizadas en mosto sintético, con solo *S. cerevisiae* y las fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* y *A. pullulans*. En el tercer test se han comparado las dos fermentaciones mixtas entre sí. Y en el cuarto test triangular se ha comparado la fermentación mixta de *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905 con el mosto sintético incubado solamente con *A. pullulans* 20905 (tabla 1).

Tabla 1. Resultados test triangular.

Test	C – m2660	C – m20905	m2660 – m20905	m20905 – 20905
Nº total de juicios	34	34	34	36
Aciertos	15	24	21	34
Significancia (<i>p</i>)	No significativo	0.001	0.001	0.001

C – m2660 representa fermentación con *S. cerevisiae* frente a fermentación con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 2660. **C – m20905** representa fermentación con *S. cerevisiae* frente a fermentación con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905. **m2660 – m20905** representa fermentación de *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 2660 frente a *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905. **m20905 – 20905** representa fermentación mixta con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905 frente a mosto incubado con *A. pullulans* 20905.

Del número de aciertos se puede deducir que entre el control y la fermentación mixta con *A. pullulans* 2660 no se aprecian diferencias aromáticas, por lo que se pueden tratar como si fueran la misma muestra. Sin embargo, el control con solo *S. cerevisiae* QA23 es diferente significativamente con un 99.9% de probabilidad frente a la fermentación mixta con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905, apreciando que la muestra fermentada junto con la cepa de hongo tenía aromas frutales más intensos.

La comparación entre la fermentación mixta con *S. cerevisiae* QA23 y *A. pullulans* 20905 y la incubación del mosto solamente con el hongo *A. pullulans* 20905 muestra unas diferencias olfativas muy claras (significativo al 99.9%), con un alto número de aciertos. En cierta medida es lógico, ya que en la muestra m-20905 se ha producido una fermentación del mosto sintético y, por tanto, producción de compuestos aromáticos a partir de sus precursores, y sin embargo en la muestra 20905 no se produjo fermentación. Esta muestra presentaba un aroma más sucio y menos frutal. Así, la muestra elegida para realizar la olfatometría es aquella con solamente *A. pullulans* 20905, para evaluar los compuestos aromáticos producidos únicamente por esa cepa.

3. Resultados de la olfatometría (GC-O)

Los compuestos aromáticos del mosto sintético incubado en presencia del hongo *A. pullulans* 20905, tras haber sido extraídos mediante el método de extracción en fase sólida, se han analizado mediante AEDA y GC-O. Los resultados aparecen en la tabla 2. En total se han encontrado 22 zonas aromáticas producidas por esta cepa, de las cuales tan solo una no ha podido ser identificado su compuesto responsable (tabla 2).

Tabla 2. *Compuestos aromáticos producidos por el hongo A. pullulans 20905.*

RI		Descriptor	Compuesto	FD
DB-WAX	DB-5			
933		Miel, dulce, frutal, plátano	Metilpropanoato de metilo	1:16
962		Floral, polen	Isobutirato de etilo	1:32
979		Dulce	Pentanona	1:1
1035		Floral, miel	Butirato de etilo	1:2
1106		Patata cocida, podrido	1-hexen-3-ona	1:2
1128		Plátano	Acetato de isoamilo	1:4
1215		Hongo, agar, tostado	Trans-2-hexenal	1:32
1240	1035	Dulce, fresa, cítrico	Cis- β -ocimeno	1:2
1312	949	Champiñón	1-octen-3-ona	1:1
1415	1052	Champiñón, tierra	3-metoxi-2,5-dimetilpirazina	1:2
1443	1098	Floral, polen, fruta tropical	Hexanoato de propilo	1:8
1464	916	Patata cocida	Metional	1:32
1544	1081	Gas, químico	Octanol	1:2
1653	1160	Floral	Benzoato de etilo	1:1
1735		Patata cocida, podrido	Metionol	1:2
1832	1268	Floral, colonia	Acetato de 2-feniletilo	1:2
1864	1228	Desinfectante, disolvente	Geraniol	1:4
1928		Floral, polen, vainilla	2-feniletanol	1:32
1985		Químico	o-cresol	1:4
2166	1483	Gominola	γ -decalactona	1:1
2215		Mantequilla, palomitas	δ -decalactona	1:2
2240		Dulce	<i>no identificado</i>	1:2

RI = índice de retención en columna de capilaridad polar (DB-WAX) y apolar (DB-5), descripción del aroma, identificación del compuesto químico, factor de dilución (FD).

Entre los compuestos identificados la mitad de ellos corresponden a ésteres y alcoholes, destacando metilpropanoato de metilo, isobutirato de etilo, hexanoato de propilo y acetato de 2-feniletilo como los compuestos con mayor importancia aromática, ya que aparecen en las muestras que más diluidas estaban. Estos compuestos pueden aportar aromas dulces y frutales. También cabe destacar la presencia e importancia de

dos aldehídos, 2-hexenal y metional, con aromas más singulares. Sin embargo, entre los compuestos producidos por *A. pullulans* 20905 no se ha encontrado ninguno cuyo descriptor esté asociado al aroma del espárrago, tal como se había detectado en el vino de Bodegas Matarromera.

4. Caracterización microbiológica de *Aureobasidium pullulans*

4.1 Determinación de la relación entre DO y ufc/mL

La forma de cuantificar la población microbiana en medio líquido, tanto de *S. cerevisiae* como de *A. pullulans*, es mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Este valor se relaciona con el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen (mL), hallado previamente mediante conteo en placa. La relación es:

Tabla 3. Relación DO_{600} y ufc/mL.

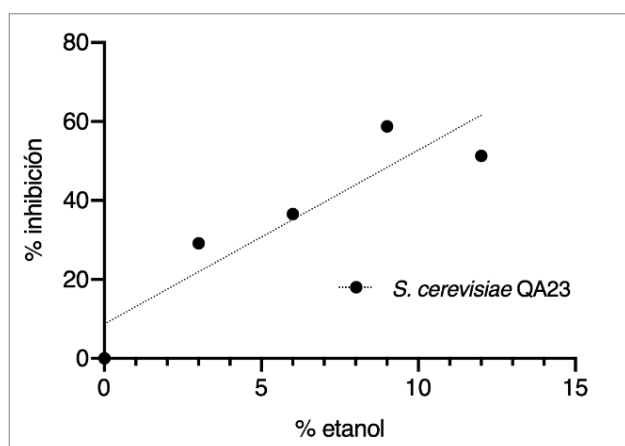
	DO_{600}	ufc/ml
<i>S. cerevisiae</i>	1.0	$6.7 \cdot 10^6$
<i>A. pullulans</i> 2660	2.1	$4.25 \cdot 10^6$
<i>A. pullulans</i> 20905	2.0	$4.65 \cdot 10^6$

4.2 Resultados del estudio de la tolerancia a etanol

En el estudio de resistencia a etanol se emplean la cepa de *S. cerevisiae* QA23 y las cepas 2660 y 20905 de *A. pullulans*, con diferentes rangos de concentraciones de etanol, ya que *S. cerevisiae* tolera una concentración de etanol más elevada que otras especies de hongos y levaduras.

Las cepas se incuban a 25°C en los tubos con etanol durante 24h en el caso de *S. cerevisiae* y 144h en el caso de *A. pullulans*. Transcurrido este tiempo se mide la DO_{600} y se hallan los porcentajes de inhibición para cada cepa.

Porcentajes de inhibición para *S. cerevisiae* QA23:



% EtOH	% inhibición
0	0%
3	29.18%
6	36.54%
9	58.76%
12	51.31%

Figura 7. Ensayo de resistencia a etanol de *S. cerevisiae* QA23.

Los valores de inhibición para *S. cerevisiae* QA23 (figura 7) concuerdan con lo esperado para una levadura vínica encargada de llevar a cabo la fermentación alcohólica, ya que para una concentración de etanol del 12% v/v (similar a la de los vinos terminados) se observa que el máximo porcentaje de inhibición está entre el 50-60%.

Los resultados obtenidos para las cepas de *A. pullulans* son los siguientes:

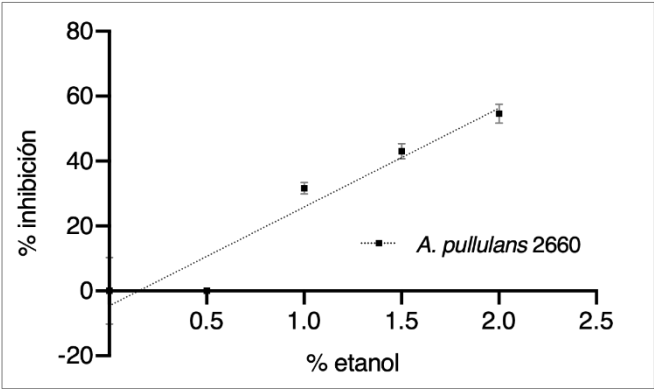


Figura 8. Ensayo resistencia a etanol *A. pullulans* 2660.

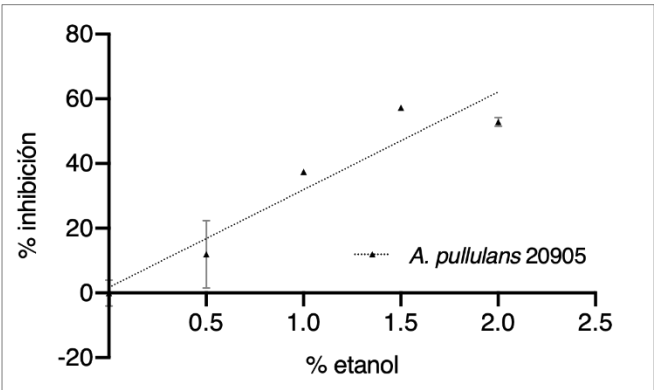


Figura 9. Ensayo resistencia a etanol *A. pullulans* 20905.

Se observa que ambas cepas de *A. pullulans* alcanza en torno al 50% de inhibición para una concentración de etanol del 2% (v/v). A partir de esta cantidad de etanol el porcentaje de inhibición supera el 100%, lo que significa que esa cantidad de etanol es totalmente letal para *A. pullulans*, y que no puede proliferar ni sobrevivir bajo esas condiciones. Por tanto, el etanol puede ser la causa del descenso de población de hongo visto en el contejo de las placas (figuras 5 y 6).

La realización de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (% de etanol y cepa) con interacción confirma, de forma muy significativa ($p < 0.0001$), que el porcentaje de inhibición varía con el porcentaje de etanol y depende del tipo de cepa. Además, el porcentaje de etanol en la inhibición afecta de forma diferente según la cepa.

4.3 Resultados del estudio de la tolerancia a sulfito

Las cepas de *A. pullulans* elegidas se han evaluado frente a un gradiente de $K_2S_2O_5$, con las concentraciones de sulfuroso libre especificadas en la tabla 4. Tras incubar la placa a 25°C y se añade MTT (5 mg/mL) con el objetivo de evaluar la viabilidad de los

microorganismos que pudieran haber crecido en cada uno de los pocillos, pues habrán reducido el MTT produciendo formazán. La medida de la absorbancia a 580 nm permite cuantificar la viabilidad celular de las distintas cepas frente al tratamiento con sulfuroso.

Tabla 4. *Porcentaje de viabilidad de distintas cepas de A. pullulans en función de la concentración de sulfuroso.*

Sulfuroso (mg/L)	Viabilidad <i>A. pullulans</i> 2660	Viabilidad YBU 38	Viabilidad YBU 40
1600	112.46%	71.90%	45.28%
800	123.99%	90.10%	73.38%
400	96.30%	97.52%	115.68%
200	118.71%	100.57%	106.64%
100	124.92%	104.65%	109.27%
50	112.62%	100.79%	97.38%
25	101.68%	93.87%	104.88%
0	100%	100%	100%

La realización de un test t de Student para muestras emparejadas determina que entre las cepas salvajes (YBU 38 y YBU 40) y entre *A. pullulans* 2660 y YBU 40 no existen diferencias en el porcentaje de viabilidad según la cepa, mientras que entre *A. pullulans* 2660 y YBU 40 sí las hay.

En el caso de *A. pullulans* 2660, una de las cepas utilizadas para la fermentación mixta, los valores de viabilidad para cualquiera de las concentraciones de sulfuroso son muy cercanos a 100%. En las cepas salvajes de *A. pullulans*, YBU 38 e YBU 40, los porcentajes de viabilidad de las concentraciones más altas de sulfuroso, 1600 y 800 mg/L, son menores de 100, mientras que en aquellas concentraciones de sulfuroso que se añaden a los vinos, entre 150 y 250 mg/L, la viabilidad ronda el 100%. Así, se puede afirmar que la presencia de sulfuroso en un amplio rango de concentraciones no afecta de modo importante ni al crecimiento ni a la viabilidad de *A. pullulans*.

4.4 Resultados de factor *killer*

El estudio de la posible producción de toxina *killer* por parte de *S. cerevisiae* QA23 tiene como objetivo determinar si *A. pullulans* es resistente a ella o si por el contrario su ausencia al final de la fermentación pudiera deberse a su sensibilidad frente a la toxina.

Sobre el césped de una cepa no productora y sensible a la toxina *killer* se ve claramente como *S. cerevisiae* QA23 es productora de toxina *killer*, ya que se forma un halo de inhibición a su alrededor (figura 10), aunque éste es menos claro que el formado por la cepa K⁺R⁺. Por otra parte, en la figura 11 se ve cómo claramente las dos cepas de *A. pullulans* utilizadas en la fermentación crecen sobre el césped de *S. cerevisiae* QA23, por lo que son resistentes a la toxina.

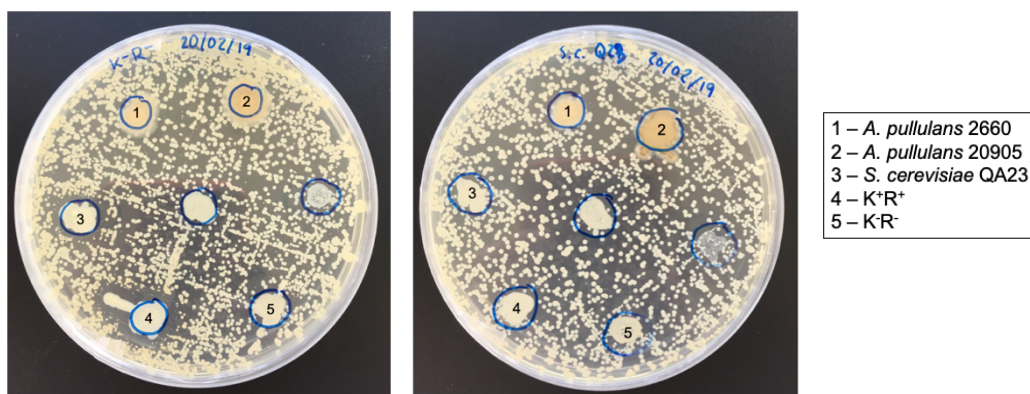


Figura 10. Césped de cepa K⁻R⁻. Figura 11. Césped de *S. cerevisiae* QA23.

Por lo tanto, el resultado de este ensayo descarta que la ausencia de *A. pullulans* al final de las fermentaciones realizadas con la levadura QA23 sean debidos a su sensibilidad frente a la toxina *killer* producida por esta levadura.

5. Resultados de secuenciación e identificación

Tras la extracción del DNA genómico de las cepas de *A. pullulans* salvajes y de las cepas de la CECT se cuantificó el DNA total obtenido, utilizando el software NanoDrop, para comprobar que la cantidad y la calidad es suficiente para realizar una PCR, a pesar de que algunas muestras presentaban valores indicativos de presencia de proteínas o de otros compuestos orgánicos algo alejados del rango óptimo (anexo, tabla 3).

La amplificación de los dominios D1 y D2 se lleva a cabo mediante una PCR con los *primers* NL1 y NL4, que hibridan dentro del gen del rRNA 26S. Tras la amplificación se obtiene un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, tanto en las cepas salvajes como en las cepas de la CECT, lo que se comprueba por electroforesis (figura 12). El control negativo (C) sirve para confirmar que en el kit de PCR no hay DNA que pueda amplificar.

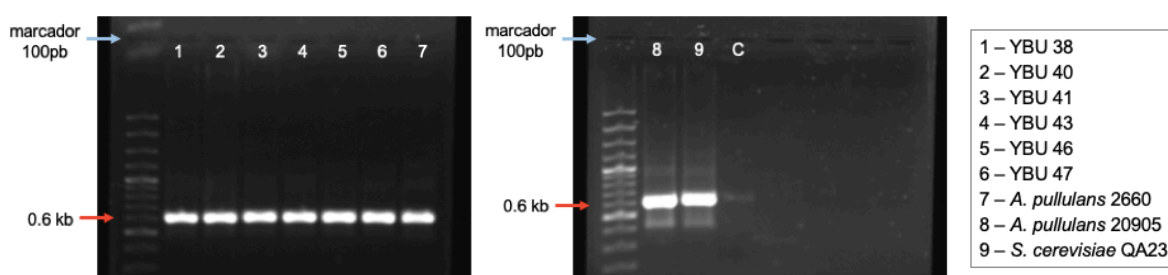


Figura 12. Gel de agarosa al 1% en TBE con las muestras tras los ciclos de PCR.

Las muestras amplificadas se enviaron al servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del CIBA, y una vez conocida la secuencia de nucleótidos de la región

amplificada se les asigna género y especie utilizando para ello la herramienta BLAST del NCBI (tabla 5).

Tabla 5. Identificación a partir de la región D1/D2 del gen del RNA ribosómico 26S.

Cepas CECT	Microorganismo id.	% id.
<i>A. pullulans</i> 2660	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100%
<i>A. pullulans</i> 20905	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	99.81%
Cepa salvaje	Microorganismo id.	% id.
YBU 38	<i>Aureobasidium pullulans</i>	>99%
YBU 40	<i>Aureobasidium pullulans</i>	96.32%
YBU 41	<i>Aureobasidium pullulans</i>	98.77%
	<i>Kabatiella microsticta</i>	98.77%
YBU 43	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99.65%
YBU 46	<i>Aureobasidium pullulans</i>	96.47%

Identificador de la cepa, microorganismo asociado mediante BLAST (NCBI) y % de identidad.

La diferencia entre las cepas de *A. pullulans* de la CECT es la variedad: la cepa 2660 es *A. pullulans* var. *pullulans*, y la cepa 20905 es *A. pullulans* var. *melanogenum*, lo que hace que la cepa 20905 tenga una morfología ligeramente diferente, formándose un micelio de color negruzco transcurridos unos días, mientras que el de 2660 es blanquecino. Todas las cepas salvajes analizadas pertenecen a *A. pullulans*, aunque la muestra YBU 41 también podría pertenecer a *Kabatiella microsticta*, sinónimo de *Aureobasidium microstictum*, especie muy cercana filogenéticamente a *A. pullulans*. Esta prueba sirvió para confirmar que las cepas que se están estudiando en este trabajo corresponden con *A. pullulans* de forma previa a la aproximación preliminar para diseñar una prueba genética que las diferencie de *S. cerevisiae*.

6. Resultados del gel de digestión enzimática

La digestión de las secuencias amplificadas con enzimas de restricción puede permitir determinar de manera rápida la presencia de *A. pullulans*, al elegir enzimas que corten en su secuencia D1/D2 y no en la de *S. cerevisiae*. El análisis de las secuencias obtenidas permitió seleccionar las enzimas DraI, AatII y DpnI que cumplen estos requisitos, generando en *A. pullulans* fragmentos de, aproximadamente, 0.35 y 0.15 kb en el caso de DraI; 0.39 y 0.11 kb con AatII; y 0.27 y 0.23 kb con DpnI (anexo, figuras 2 y 3). Así, el gel que se esperaba obtener tras correr las muestras digeridas es el recogido en la figura 13. Al lado, la figura 14 recoge la imagen del gel obtenido con las muestras digeridas, tras visualizarlo exponiéndolo a luz ultravioleta.

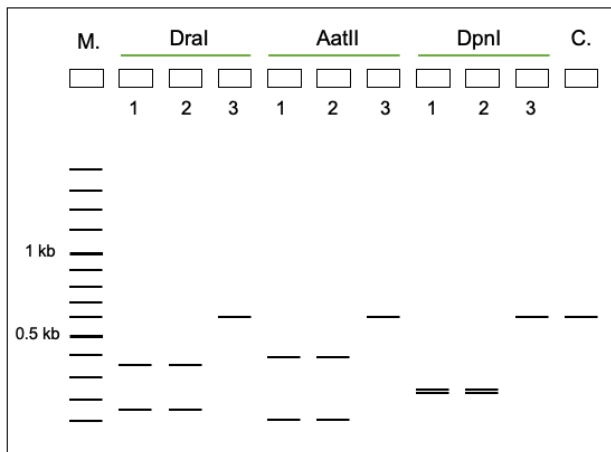


Figura 13. Esquema del gel esperado al tratar las muestras con las enzimas de restricción DraI, AatII y DpnI. **1-** *A. pullulans* 2660; **2-** *A. pullulans* 20905; **3-** *S. cerevisiae* QA23.

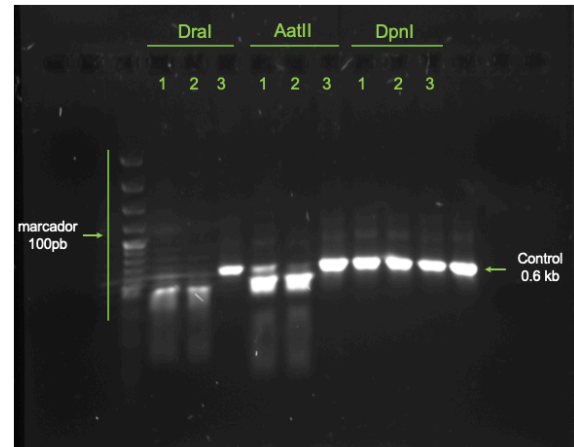


Figura 14. Gel de agarosa al 1% TBE con las muestras de DNA digeridas con las enzimas Dral, AatII y DpnI. **1-** *A. pullulans* 2660; **2-** *A. pullulans* 20905; **3-** *S. cerevisiae* QA23.

Como se ve en la figura 14, las bandas obtenidas en el gel para las muestras digeridas con Dral y AatII corresponden con la disposición esperada: en ambas se ven fragmentos de menor tamaño para los productos de *A. pullulans*, mientras que la muestra procedente de *S. cerevisiae* tiene una sola banda a 0.6 kb, igual que la muestra control sin digerir. Las bandas correspondientes a los fragmentos de menor tamaño (0.11 y 0.15 kb) están difuminadas, probablemente por efecto de la alta concentración de acetato que posee el buffer Tango®, con el que actúan algunas de estas enzimas, o al hecho de que su tamaño es demasiado pequeño para observarse con nitidez en un gel con este porcentaje de agarosa.

En las muestras de *A. pullulans* tratadas con la enzima DpnI no se observan fragmentos cortados, sino que sólo aparece una banda a 0.6 kb, al igual que en *S. cerevisiae* y en la muestra control. Esto se debe a que esta es una enzima dependiente de metilación y las cadenas amplificadas no tienen grupos metilo por lo que no habrá cortado a pesar de existir su secuencia de corte en los fragmentos amplificados.

Esta es una prueba que habría que optimizar, seleccionando, en primer lugar, buffers para las enzimas de digestión que no contuvieran en su composición acetato, ya que éste interfiere con el TBE, modificando el pH del gel, de modo que las bandas que se obtienen al correr las muestras aparecen más difuminadas, haciendo que determinar el tamaño de los fragmentos sea más complicado. Otra opción de optimización del método sería utilizar cebadores diferentes, que hibridaran en sitios más alejados, pudiendo así obtener productos de amplificación tras la PCR que, al ser digeridos con las enzimas de restricción, generasen fragmentos de tamaños más grandes y más diferentes que los obtenidos en este caso, facilitando así la interpretación de los resultados en el gel.

V. CONCLUSIONES

1. La presencia del hongo *A. pullulans* en fermentaciones llevadas a cabo por *S. cerevisiae* no afecta a la cinética ni a la velocidad de la fermentación.
2. *A. pullulans* no puede proliferar en vinos terminados, ya que concentraciones de etanol igual o superior a 2.5% v/v son letales para el microorganismo.
3. *A. pullulans* es resistente a las concentraciones de sulfito que se utilizan en las bodegas como control microbiológico (entre 100 y 200 mg/L).
4. *A. pullulans* es resistente a la toxina *killer* producida por *S. cerevisiae* QA23.
5. Así, la principal causa de la muerte de *A. pullulans* en las fermentaciones mixtas puede atribuirse a la alta concentración de etanol.
6. Existe la posibilidad de desarrollar un método para discriminar, de manera rápida, entre *A. pullulans* y *S. cerevisiae*, utilizando enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa, si bien éste debe ser optimizado para mejorar y facilitar la lectura de los resultados.
7. En el test triangular se aprecian diferencias sensoriales entre el mosto sintético fermentado solamente con *S. cerevisiae* y el fermentado con *S. cerevisiae* y *A. pullulans* 20905, apareciendo aromas más dulces y frutales en el segundo.
8. En el análisis por olfatometría (GC-O) de los compuestos aromáticos producidos por *A. pullulans* 20905 se explican los aromas frutales por la presencia ésteres y alcoholes. Además, se comprueba que este hongo no produce ningún compuesto aromático que se pueda asociar con el olor a espárrago.

V. CONCLUSIONS

1. The presence of yeast-like fungi *A. pullulans* in fermentations performed by *S. cerevisiae* does not affect neither kinetic parameters nor fermentation rate.
2. *A. pullulans* cannot proliferate in finished wines, since ethanol concentrations equal or above 2.5% v/v are lethal for this microorganism.
3. However, *A. pullulans* is resistant to sulfite concentrations used in wineries as microbiological control (100-200 mg/l).
4. *A. pullulans* is resistant to killer toxin secreted by *S. cerevisiae* QA23.
5. For these reasons, the main cause for *A. pullulans*' death in mixed fermentations may be attributed to high ethanol concentration.
6. There is a possibility to develop a method to quickly distinguish between *A. pullulans* and *S. cerevisiae*, by using restriction enzymes and electrophoresis in agarose gel, although this method should be optimized to improve and make easier the results analysis.
7. The triangular test has shown some sensorial differences between synthetic must fermented by *S. cerevisiae* and must fermented by *S. cerevisiae* and *A. pullulans* 20905, such as sweeter and fruity odors in the second one.
8. In olfactometry analysis of aromatic compounds produced by *A. pullulans* 20905, fruity odors are explained because of the presence of esters and alcohols. It is also proved that this fungus does not produce any aromatic compound that could be associated with the asparagus smell.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Fleet GH. Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1984 Nov;48(5):1034–8.
2. Maicas S, Natividad À, Ferrer S, Pardo I. Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2000;16(8/9):805–10.
3. Fleet, G.H. & Heard, G. *Yeast growth during fermentation* (Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1993).
4. Blanco P, Vázquez-Alén M, Losada A. Influence of yeast population on characteristics of the wine obtained in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinifera* Lado. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35(3):183–8.
5. Blanco P, Ramilo A, Cerdeira M, Orriols I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 2006 Jun 6;89(3–4):351–7.
6. Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. 2003;86:11–22.
7. Swiegers JH, Pretorius IS. Yeast Modulation of Wine Flavor. *Adv Appl Microbiol* [Internet]. 2005 Jan;57:131–75.
8. Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SE, Walker MA, Lapsley JT. The economics of wine production. *Nature*. 2002;418(August):696–9.
9. Fleet, G.H., 2001. Wine. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 747– 772.
10. Marquina D, Santos A, Peinado JM. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*. 2002;5(2):65–71.
11. Bozoudi D, Tsaltas D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*. 2018;4(4):1–15.
12. Zalar P, Gostinčar C, de Hoog GS, Uršič V, Sudhadham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol*. 2008;61:21–38.
13. Prasongsuk S, Lotrakul P, Ali I, Bankeeree W, Punnapayak H. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(2):129–40.
14. Chan GF, Puad MSA, Chin CF, Rashid NAA. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2011;56(5):459–67.
15. Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2012;153(3):243–59.

16. Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust J Grape Wine Res* [Internet]. 2005 Oct 1;11(3):316–27.
17. Baffi MA, Tobal T, Lago JHG, Boscolo M, Gomes E, Da-Silva R. Wine aroma improvement using a β -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169(2):493–501.
18. Merín MG, Morata de Ambrosini VI. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2018;285(February):18–26.
19. Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J Enol Vitic*. 2019;21(1):97–129.
20. Aznar M, López R, Cacho J, Ferreira V. Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *J Agric Food Chem*. 2003;51(9):2700–7.
21. Alegre Y, Pilar M, Navajas S, Ferreira V, García D. Rapid strategies for the determination of sensory and chemical differences between a wealth of similar wines. *Eur Food Res Technol*. 2017;0(0):0.
22. Escudero A, San-Juan F, Franco-Luesma E, Cacho J, Ferreira V. Is orthonasal olfaction an equilibrium driven process? Design and validation of a dynamic purge and trap system for the study of orthonasal wine aroma. *Flavour Fragr J*. 2014;29(5):296–304.
23. Sahagún, E.M. (2006). La base química del aroma de vinos blancos de variedades españolas (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza.
24. Hernandez-Orte P, Bely M, Cacho J, Ferreira V. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust J Grape Wine Res* [Internet]. 2006 Jul;12(2):150–60.
25. Sinkinson C. Principle T. Triangle Test. JTI (Japan Tobacco International), Geneva, Switzerland. 2017;153–70.
26. Park S, Korea S. A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction Note A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction. 2015;(March 2009):1–5.
27. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 1998;73(4):331–71.

ANEXO

Tabla 1. *Composición del stock de aminoácidos básicos*

Aminoácido	mg/L en mosto
Alanina	60
Tirosina	20
Valina	20
Isoleucina	20
Leucina	20
Cisteína	5

Tabla 2. *Composición del stock de aminoácidos específicos*

Aminoácido	mg/L en mosto
Asparagina	49.2
Ácido glutámico	144
Glutamina	106
Serina	108
Glicina	3.78
Histidina	49.7
Treonina	82.6
Arginina	201
Prolina	528
Metionina	13.5
Fenilalanina	35.7
Lisina	12.3
Ácido gamma-aminobutírico	60.1

Diferencias morfológicas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Aureobasidium pullulans*.

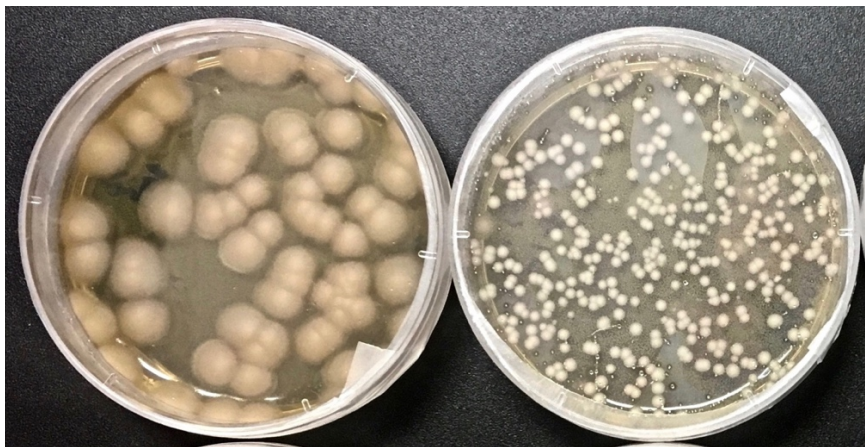


Figura 1. Placas de YPD sólido con colonias de *A. pullulans* (izquierda) y colonias de *S. cerevisiae* (derecha).

Tabla 3. Cantidad de DNA extraído en nanogramos por microlitro y relación de pureza.

	YBU 38	YBU 40	YBU 41	YBU 43	YBU 46	<i>A. pullulans</i> 2660	<i>A. pullulans</i> 20905
ng/μL	142.5	136.3	60.2	28.0	29.8	253.2	132.1
260/280	1.88	1.74	1.48	1.47	1.55	2.05	1.60
260/230	1.40	1.27	0.49	0.46	0.65	2.14	0.93

La relación 260/280 indica la relación entre DNA y proteínas. El valor óptimo debe estar entre 1.8 y 2.0. La relación 260/230 indica la relación entre DNA y compuestos orgánicos. El valor óptimo debe estar entre 1.5 y 2.2.

Sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo en la región amplificada (extremo 5' del gen rRNA de 26S) de *Aureobasidium pullulans*.

Mapas de restricción generados con el software ApE (A Plasmid Editor).



Figura 2. Sitios de corte de las enzimas en la secuencia de *A. pullulans* 2660, bases 1-505.



Figura 3. Sitios de corte de las enzimas en la secuencia de *A. pullulans* 20905, bases 1-536.