

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

**ASPECTOS GENÉTICOS DE LAS LEVADURAS DE FLOR
PARA LA MEJORA DE VINOS OBTENIDOS POR CRIANZA
BIOLÓGICA**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN ENOLOGÍA

CURSO 2020-2021

**AUTORA: NOELIA GARCÍA GARCÍA
TUTORA ACADÉMICA: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER**

VALENCIA, JULIO DE 2021

RESUMEN

Los vinos de Jerez amparados por las Denominaciones de Origen "Jerez-Xérès-Sherry" y "Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda" son productos de una gran calidad que cuentan con un elevado reconocimiento en el mundo de la enología. Este tipo de vinos se caracteriza por tener una crianza biológica llevada a cabo por ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, conocidas como levaduras de flor. Este tipo de crianza es muy particular y ocurre tras la fermentación alcohólica, en la cual se forma el denominado velo de flor, un *biofilm* que aporta a estos vinos una serie de características organolépticas muy interesantes y que les hace ser únicos en el mundo. Las levaduras de flor tienen una genética muy particular y está poco estudiada. Por ello resulta muy interesante profundizar en dicho campo y se ha realizado una búsqueda bibliográfica. Se ha buscado información acerca de las levaduras de flor y sus características genéticas que hacen diferencial a este tipo de vinificación en bases de datos como *Pubmed* y *Google Scholar*. En dichas bases de datos se han encontrado trabajos que han caracterizado los genes que están involucrados en procesos exclusivos de dicha vinificación, como pueden ser los genes *FLO11*, *NRG1*, *HSP12*, *BTN2* y diversas técnicas de mejora genética, como puede ser por ejemplo la hibridación de cepas o la mutagénesis inducida. Además, se ha visto que existen diversas sustancias y factores que favorecen el envejecimiento biológico de los vinos de Jerez, como puede ser el polen de abeja o la lisozima. Pese a que el volumen de producción y consumo de estos vinos es bastante alto se constata que hay poca bibliografía al respecto y hay distintos aspectos metabólicos en dicha crianza en los cuales todavía se desconoce su relación con los aspectos genéticos que la regulan.

Palabras clave: Vinos de Jerez, crianza biológica, levaduras de flor, velo de flor, *Saccharomyces cerevisiae*

Autora: Noelia García García

Tutora académica: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, Julio de 2021

RESUM

Els vins de Jerez emparats per les Denominacions d'Origen "Jerez-Xérès-Sherry" i "Camamil·la - Sanlúcar de Barrameda" són productes d'una gran qualitat que compten amb un elevat reconeixement en el món de l'enologia. Aquest tipus de vins es caracteritza per tindre una criança biològica duta a terme per uns certs ceps de *Saccharomyces cerevisiae*, conegudes com a llevats de flor. Aquest tipus de criança és molt particular i ocorre després de la fermentació alcohòlica, en la qual es forma el denominat vel de flor, un biofilm que aporta a aquests vins una sèrie de característiques organolèptiques molt interessants que els fa ser únics en el món. Els llevats de flor tenen una genètica molt particular, i està poc estudiada. Per això resulta molt interessant aprofundir en aquest camp i s'ha realitzat una cerca bibliogràfica. S'ha buscat informació sobre els llevats de flor i les seues característiques genètiques que fan diferencial a aquesta mena de vinificació en bases de dades com Pubmed i Google Scholar. En aquestes bases de dades s'han trobat treballs sobre caracteritzats els gens que estan involucrats en processos exclusius d'aquesta vinificació, com poden ser els gens *FLO11*, *NRG1*, *HSP12*, *BTN2* i diverses tècniques de millora genètica, com pot ser per exemple la hibridació de ceps o la mutagènesis induïda. A més, s'ha vist que existeixen diverses substàncies i factors que afavoreixen l'envelliment biològic dels vins de Jerez, com pot ser el pol·len d'abella o la liozima. Malgrat que el volum de producció i consum d'aquests vins és bastant alt es constata que hi ha poca bibliografia sobre aquest tema i hi ha diferents aspectes metabòlics en aquesta criança en els quals encara es desconeix la seua relació amb els aspectes genètics que la regulen.

Paraules clau: Vins de Jerez, criança biològica, llevats de flor, vel de flor, *Saccharomyces cerevisiae*

Autora: Noelia García García

Tutora acadèmica: Ana Isabel Jiménez Belenguer

València, Juliol de 2021

ABSTRACT

Sherry wines protected by the "Jerez-Xérès-Sherry" and "Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda" Appellations of Origin are high quality products that are very important in the world of oenology. This type of wine is characterized by having a biological aging carried out by certain strains of *Saccharomyces cerevisiae*, known as flower yeasts (*Flor* yeast). This type of aging is very particular and occurs after alcoholic fermentation, in which the flower veil is formed, a biofilm that gives these wines a series of very interesting organoleptic characteristics that makes them unique in the world. *Flor* yeasts have very particular genetics, and it is little studied. For this reason, it is very interesting to go deeper in this field and a bibliographic search has been carried out. Information about flower yeasts and their genetic characteristics that make this type of wine making differentiates have been sought in databases such as Pubmed and Google Scholar. In these databases there have been found research about which genes are involved in those exclusive processes of winemaking. Those genes have been characterized, such as the genes *FLO11*, *NRG1*, *HSP12*, *BTN2*. Also, various genetic improvement techniques, such as, for example, the hybridization of strains or the induced mutagenesis. In addition, it has been seen that there are various substances and factors that favor the biological aging of Sherry wines, such as bee pollen or lysozyme. Even though the volume of production and consumption of these wines is quite high, it is found that there is little bibliography on the matter and there are different metabolic aspects in those aging in which their relationship with the genetic aspects that regulate it is still unknown.

Keywords: Sherry wines, biological aging, flower yeasts, flower veil, *Saccharomyces cerevisiae*

Author: Noelia García García

Academic tutor: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, July 2021

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	1
1.2. LOS VINOS DE JEREZ.....	2
1.3. PAPEL ACTUAL SOCIOECONÓMICO DE LOS VINOS DE JEREZ.....	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. ESQUEMA PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA DEL TRABAJO.....	6
3.2. RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN	6
3.3. PUBMED	6
3.4. GOOGLE SCHOLAR.....	6
3.5. USO DE LIBROS	7
3.6. ESTRUCTURA DEFINIDA.....	7
3.4. ESTILO DE REDACCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1. VINIFICACIÓN EN EL MARCO DE JEREZ	8
4.2. LA CRIANZA BIOLÓGICA: EL VELO DE FLOR.....	12
4.3. ECOLOGÍA PRESENTE EN EL VELO DE FLOR DE LOS VINOS DE JEREZ.....	13
4.4. MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS PARA FACILITAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO. 14	
4.5. GENES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO	16
4.5.1. GENES RELACIONADOS CON LA FLOTABILIDAD DE LAS LEVADURAS	16
4.5.2 GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA AL ETANOL.....	19
4.6. FACTORES NO GENÉTICOS QUE AYUDAN A MEJORAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO20	
4.6.1. SUSTANCIAS ACTIVADORAS DEL VELO.....	20
4.6.2. CONSUMO DE GLUCÓNICO PARA MEJORAR EL PERFIL ORGANOLÉPTICO	22
4.6.3. LA LISOZIMA EN LA ESTABILIDAD BIOLÓGICA DE LOS VINOS DE JEREZ.....	23
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva (Escolar y Morueco, 2011). A partir del cultivo de la vid o *Vitis vinifera*, un arbusto sarmentoso y trepador (Higaldo, 2002) se obtienen las uvas, las cuales son esenciales en la elaboración de vino y son recogidas en el período de vendimia que en el hemisferio norte comprende normalmente un período de tiempo entre agosto y octubre.

El origen del vino es incierto, aunque las evidencias más antiguas del machacado de uva con intención de extraer mosto datan del 5400-5000 a.C. en Egipto y Fenicia (McGovern et al., 1996)

En cuanto al origen del vino en Jerez, fue el geógrafo griego Estrabón en el siglo I a.C. quien dio las primeras noticias de que las vides jerezanas fueron introducidas y cultivadas por los fenicios alrededor del año 1100 a.C. Así se confirma que fueron los mismos fundadores de la antigua Gades (hoy Cádiz) los que trajeron la cultura de la vid y la elaboración del vino, desde las tierras del actual Líbano (SHERRY WINE, 2021). Pero no fue hasta la reconquista de Alfonso X el Sabio en 1264 cuando se le dio una gran importancia a la producción enológica en la Zona de Jerez (Espinazo, 2008). A partir de este momento, los vinos de esta zona comienzan a coger reconocimiento internacional, siendo los franceses e ingleses los que más los demandaban. Para que el vino no se deteriorase durante su transporte en barco para comercializarlo en otros países, el vino era previamente encabezado con aguardiente. Se cree que un almacenaje del vino muy prolongado, o una reducción en la adición de alcohol de encabezado para reducir costes, pudo propiciar la aparición del velo de flor y con ello se reparó en el descubrimiento de un nuevo tipo de vino con unas características organolépticas singulares (Marín Menguiano, 2014). Posteriormente, las bodegas desarrollan los conocimientos necesarios para, mediante distintos niveles de encabezado, propiciar o inhibir en cada caso el desarrollo de la flor (Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2011).

La demanda de vinos de Jerez aumentó tanto que el Cabildo promulgó en 1483 el primer Reglamento de la Denominación de Origen de estos vinos, con el cual se regulaba desde las características de las botas jerezanas hasta los sistemas de crianza, pasando por los pormenores de la vendimia, Así es como se consiguió regular la actividad vitivinícola y comercial en esta zona (Álvarez Rafael, 2017).

1.2. LOS VINOS DE JEREZ

Actualmente, en Jerez se producen vinos generosos. Según el Reglamento del Consejo Regulador, los vinos generosos son secos (con un máximo de 5 g/L de azúcar residual) en cuyo proceso de elaboración se produce una fermentación completa de los mostos, obteniéndose así el vino base. Al final de esta fermentación, se produce la aparición del velo de las levaduras conocidas como "flor" en este vino base. La decisión por parte de los bodegueros de fortificar el vino base a 15° o por encima de los 17° va a determinar el tipo de crianza a la que va a someterse el vino posteriormente. A partir de este momento es donde surgen los distintos Vinos de Jerez: Manzanilla, Fino, Amontillado, Oloroso o Palo cortado Lebrija (Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2011). Este tipo de vinos son considerados productos de elevada calidad y reconocimiento internacional en el mundo de la enología, ya que tienen unas características organolépticas muy particulares.

Los Vinos de Jerez son producidos en una zona al noroeste de la provincia de Cádiz, la cual se encuentra delimitada por el océano Atlántico, el último tramo del río Guadalquivir y la sierra de Ronda. Esta zona, conocida como Marco de Jerez, se encuentra compuesta por las ciudades de Sanlúcar de Barrameda, Jerez de la Frontera, el Puerto de Santa María (conocido como el Triángulo de Jerez), y además también se incluyen los términos municipales de Puerto Real, Chiclana de la Frontera, Trebujena, Chipiona, Rota y Lebrija (Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2011).



Imagen 1. Mapa en el que se puede apreciar la zona geográfica que abarcan las denominaciones de origen "Jerez-Xérès-Sherry" y "Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda" (RIGMONTGÓ, 2021)

Los suelos que predominan en esta zona están formados por una tierra blanca característica conocida como “albariza”, compuesta por carbonato cálcico (hasta en un 40%), arcilla y sílice. La principal característica de esta tierra es su gran capacidad de retención de la humedad gracias a su elevada porosidad, lo que le permite almacenar el agua de la lluvia para nutrir la cepa en los meses secos de verano (SHERRY WINE, 2021).

Otro tipo de suelo predominante en la zona son terrenos de “barros y “arenas”. Por un lado, los barros son predominantes de las zonas bajas de las colinas y las vaguadas y se caracterizan por contener una gran cantidad de caliza y en una menor fracción arcilla, arena y una gran cantidad de materia orgánica, lo que hace que sean más fértiles y oscuros. Por otro lado, las arenas, típicas de las zonas costeras, tienen un menor predominio de la caliza y más de arcilla y arenas (Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2011).

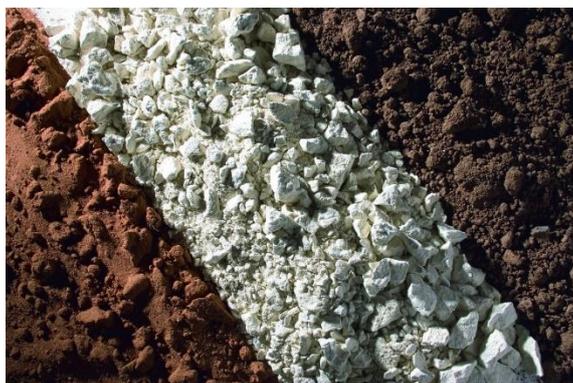


Imagen 2. Muestra de las tres tierras: arenas, albariza y barros (SHERRY WINE, 2021).

En esta zona, los vinos producidos se encuentran amparados por las Denominaciones de Origen "Jerez-Xérès-Sherry" y "Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda". Son unas de las Denominaciones de Origen más antiguas de España y de toda Europa (SHERRY WINE, 2021).

En el caso de la Denominación de Origen "Manzanilla - Sanlúcar de Barrameda", la crianza del vino se limita exclusivamente a esta ciudad. Aunque la materia prima (uva o vinos base) para la Manzanilla puede provenir de cualquier lugar que pertenezca al Marco de Jerez, el proceso de crianza debe de llevarse a cabo en Sanlúcar de Barrameda. En esta ciudad se dan unas características climáticas únicas que hacen sus vinos elaborados mediante crianza bajo velo unas características peculiares y diferenciadas del resto de los vinos de Jerez.

Las variedades de uva permitidas por el Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen para la elaboración de este tipo de vinos son la Pedro Ximenez, Palomino fino y Moscatel (SHERRY WINE, 2021).



Imagen 3. Racimos de Pedro Ximenez, Palomino fino y Moscatel, respectivamente (VITIVINICULTURA, 2021).

1.3. PAPEL ACTUAL SOCIOECONÓMICO DE LOS VINOS DE JEREZ

Los vinos de Jerez constituyen una marca que representa tanto a Andalucía como a España. Juegan un papel muy importante dentro de nuestra cultura e industria agroalimentaria, y además presentan un gran reconocimiento mundial.

Una de las características más relevantes de los vinos de Jerez en cuanto a su papel dentro de la economía, es su gran exportación. La exportación es un pilar fundamental para el desarrollo económico de cualquier país o región. El Marco de Jerez en los últimos años ha destinado más del 70% de su producción vinícola al mercado exterior, destacando Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Alemania, Dinamarca, Filipinas, Francia, Suecia, Canadá, Estados Unidos, Japón y Suiza como sus principales compradores, además de estar presentes en un centenar más de países (Rodríguez-García, 2017). En concreto, en 2018, Reino Unido se llevó el primer puesto al país más comprador de estos tipos de vinos, ocupando un 45% del total de las exportaciones (lo que supuso más de 9 millones de litros de vino importados); en segundo lugar, se posicionaron los Países Bajos, con un 23% del total de las exportaciones (aproximadamente 5 millones de litros) y en el tercer puesto, Alemania, con un 8% de las exportaciones, lo que suponen unos dos millones de litros (Jiménez García, 2018).

La preferencia por los distintos tipos de vinos de Jerez es diferente según el país; por ejemplo, en Reino Unido destaca el consumo de Amontillado y Fino, mientras que en Dinamarca prefieren el *Pale Cream* y el Fino. Se podría decir que existe un vino a gusto del consumidor para cada país.

La venta de estos vinos no siempre ha sido exitosa, se ha visto sumida en ciclos de años de ganancias y años de pérdidas (Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2002). Por ejemplo, en la década de 1960 hasta 1970 se produjo un aumento de las exportaciones en un 267,7%, mientras que en la década siguiente se produjeron enormes pérdidas. Estas pérdidas estaban asociadas a un exceso de oferta, ya que se habían plantado muchas nuevas viñas con la esperanza de los buenos años de ventas anteriores, desencadenando así un gran aumento de los stocks de vino almacenados que no se podían vender (Rodríguez-García, 2017).

En el año 2020, se preveía que se produjesen unas pérdidas de hasta el 30% en la venta de los vinos de Jerez, achacadas a la pandemia mundial de la Covid-19. Los datos oficiales referentes a las ventas de vinos en 2020 reflejan una caída algo superior al 8%, lo que se acusa en la disminución de las ventas de los vinos Fino y Manzanilla que se consumían durante las ferias y fiestas andaluzas. Fue Reino Unido quien salvó medianamente el mercado de Jerez, ya que realizaron la compra de casi 9,6 millones de litros de vino (LA GACETA DEL VINO, 2021).

Por otro lado, las bodegas de Jerez están ganando territorio en el sector del enoturismo. Según los informes anuales de ACEVIN (Asociación Española de Ciudades del Vino) en 2019 sobre el enoturismo en España, el Marco de Jerez se encuentra entre una de las tres primeras regiones con más visitantes en España con un 18,5% (Compés López & Szolnoki, 2020).

2. OBJETIVOS

Dado el gran reconocimiento e importancia de los vinos de Jerez en el mundo de la enología, el principal objetivo del presente Trabajo Final de Máster consiste en la búsqueda de información y análisis de distintos aspectos genéticos de las levaduras de flor y de los principales genes asociados que van a proporcionar las características particulares de este tipo de crianza. Así como la valoración de las diferentes técnicas de mejora genética de levaduras que pueden utilizarse para potenciar algunos de los aspectos relacionados a la crianza biológica. Además, también se tiene como objetivo valorar los distintos aspectos y sustancias de las cuales no hay evidencia de los genes que puedan estar asociados pero que resultan útiles en la mejora de la crianza biológica de los vinos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESQUEMA PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA DEL TRABAJO

Para cumplir los objetivos planteados en este trabajo, el primer paso fue elaborar un esquema general de cómo se iba a estructurar el presente Trabajo Final de Máster. Ya que el principal objetivo de este trabajo es evaluar las posibles mejoras genéticas de levaduras de flor responsables del envejecimiento biológico, se estableció un esquema preliminar basado en los genes relevantes de dichas levaduras.

3.2. RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Por un lado, la búsqueda se centró en encontrar artículos de revisión, libros y tesis doctorales, ya que estos recogen una gran información de diferentes fuentes ofreciendo así una visión global del tema que se está tratando. Por otro lado, se examinaron también artículos científicos más concretos donde se detallaban los genes relevantes en las levaduras de flor, sustancia que se pueden adicionar a los vinos para mejorar sus características organolépticas etc. Las palabras clave empleadas fueron “sherry wines”, “vinos de Jerez”, “flor yeast”, “levaduras de flor” “mejora genética”.

En este proceso, las bases de datos utilizadas para buscar dicha información fueron *PubMed* y *Google Scholar*, además de la base de datos del ministerio de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

3.3. PUBMED

Se trata de un sistema de búsqueda bibliográfica de acceso libre y especializado en ciencias de la salud. Fue desarrollado por la National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la National Library of Medicine (NLM). En esta base de datos en concreto se encuentra poca información acerca de los vinos de Jerez (sólo aparecen 35 artículos), ya que no hay muchas bases de datos especializadas en este tema en concreto.

3.4. GOOGLE SCHOLAR

Se trata de un buscador de Google que permite localizar documentos académicos de diversos tipos, como artículos científicos, tesis doctorales, libros etc. Gracias a este buscador se han localizado la mayoría de las tesis doctorales y de libros aplicando el filtro de encontrar

información escrita a partir de 2017. En esta base de datos sí que se encuentra mucha más información relacionada con el tema descrito, en total aparecen 581 entradas.

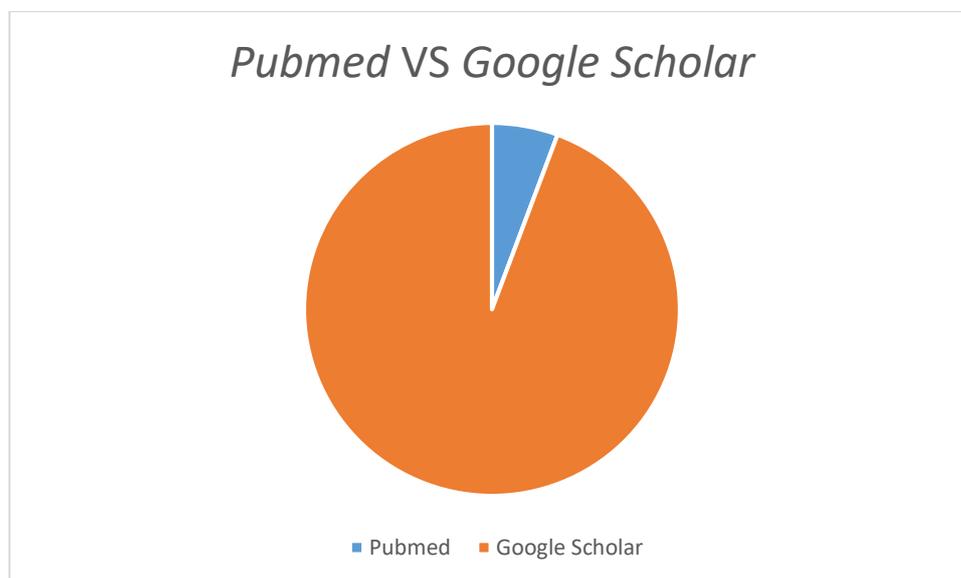


Imagen 4. Gráfico donde se ilustra de qué base de datos se ha podido extraer más información acerca del tema que se está estudiando (Elaboración propia).

3.5. USO DE LIBROS

Algunos de los libros utilizados para realizar esta revisión bibliográfica han sido *Yeasts in the production of wine* o *Tratado de viticultura general*, entre otros. Han sido de gran ayuda a la hora de realizar este trabajo ya que ofrecían una visión global pero bien detallada sobre el proceso de elaboración de los vinos de Jerez y las levaduras de flor.

3.6. ESTRUCTURA DEFINIDA

Una vez recopilada toda la información, se procedió a desarrollar un esquema con la estructura final que iba a tener el Trabajo Final de Máster. Algunos de los artículos y demás información encontrada previamente fueron descartados porque no se ajustaban al objetivo principal de este Trabajo Final de Máster.

3.4. ESTILO DE REDACCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Para redactar la bibliografía se utiliza el estilo Harvard, ya que es uno de las opciones que ofrece la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universitat Politècnica de València. Como ayuda para redactar dicha bibliografía se usa un gestor

bibliográfico llamado Mendeley el cual es capaz de, tras introducir el título del artículo deseado en la barra de búsqueda, citar y referenciar el mismo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. VINIFICACIÓN EN EL MARCO DE JEREZ

La vinificación o elaboración de vino es el conjunto de procesos que transforman el mosto (o zumo de uva) en una bebida alcohólica denominada vino. La elaboración de los vinos de Jerez se realiza en varias etapas sucesivas.

En primer lugar, se realiza la vendimia, es decir, la recogida de uva a finales de agosto o principios de septiembre, dependiendo de las condiciones climáticas que hayan ocurrido durante el año. Al llegar a bodega, se produce el despalillado, que puede ser total, parcial u optativo. En esta operación se separa el raspón de los granos de uva y aunque éste al romperse puede aportar ciertos compuestos herbáceos y tánicos no muy deseables para las características organolépticas finales del vino, la presencia de cierta cantidad de raspón sin roturas puede ser beneficioso ya que facilita el drenaje del mosto durante el prensado, lo que resulta en una mejora del rendimiento de la extracción.

A continuación, la uva se estruja y se le aplican diferentes fracciones de presión, para facilitar la extracción de mosto y evitar que se contamine y oxide por la presencia de hollejos, pepitas, hojas etc. Dependiendo de la presión aplicada, se obtendrán distintas fracciones de mosto, las cuales se separan según su calidad para la producción de distintos tipos de vino. La primera fracción de prensado obtenida se conoce como “mosto yema o mosto flor”, ya que es la de mayor calidad (Carrascosa et al., 2011).

Tras este primer prensado, las uvas son prensadas por segunda vez, obteniéndose así el mosto “segunda yema”. Las restantes fracciones de prensado y los productos restantes de la uva, normalmente son molidos, fermentados y destilados para producir el alcohol vínico que se utilizará para encabezar los vinos al final de la primera fermentación.

Con el “mosto yema” se realiza la fermentación alcohólica, llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual se produce la transformación de azúcares fermentables (la glucosa y la fructosa) en etanol y dióxido de carbono. Antiguamente este proceso se llevaba a cabo en barricas de madera de roble de unos 500L, pero actualmente cada

vez son más las bodegas que hacen la fermentación en depósitos de acero inoxidable, donde se pueden controlar diversos parámetros como la temperatura (Álvarez Rafael, 2017).

Una vez finaliza la fermentación, se obtiene lo que se conoce como “vino base” de unos 11-12° de alcohol y se procede a su deslío o clarificación (operación en la cual se separa el vino de las lías acumuladas en el fondo del depósito).

Estos vinos se someten a un proceso conocido como encabezado, que consiste en adicionar alcohol vínico hasta alcanzar cierta graduación alcohólica. Dependiendo de la graduación obtenida, se producirán distintos tipos de vino: Fino o Manzanilla (crianza biológica), Amontillado (sistema combinado de crianza biológica y crianza oxidativa) u Oloroso (crianza oxidativa).

Aquellos vinos base destinados sólo a crianza biológica, son encabezados hasta llegar a una graduación de unos 15-17° y posteriormente se trasiegan a barricas de madera de 550 L (conocidas como botas jerezanas) que son llenadas hasta 5/6 partes de su capacidad (BOJA nº 155 del 8 de agosto de 2013) y ya están listas para el proceso de crianza conocido como criaderas y soleras. La adición de alcohol a estas concentraciones hace que el vino esté mucho más protegido frente a contaminaciones, además de propiciar el desarrollo del velo de flor. La protección natural de este *biofilm* de levaduras evita la oxidación del vino y le confiere características organolépticas muy especiales.



Imagen 5. Vino bajo crianza biológica por acción de levaduras de flor (ENOARQUÍA, 2021).

El velo (flor) que se forma, aísla y protege el vino de la oxidación excesiva. Es el origen de reacciones bioquímicas complejas, resultantes del metabolismo oxidativo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de flor y del ambiente reductor creado en el vino. La combinación de ambas acciones otorga una gran originalidad organoléptica a estos vinos (Marín Menguiano, 2014).

Las levaduras en ausencia de glucosa utilizan el etanol como fuente de carbono, produciendo en consecuencia acetaldehído. Este es uno de los cambios metabólicos más importantes que ocurren durante la crianza biológica. El acetaldehído se considera el mejor marcador de envejecimiento biológico. Por otro lado, durante esta crianza también ocurre una marcada reducción del contenido de glicerol, de ácido acético y de prolina (un aminoácido que sólo es consumido por las levaduras en ciertas condiciones enológicas) (Pozo-Bayón & Moreno-Arriba, 2011).

Por otra parte, los vinos base destinados sólo a crianza oxidativa, son fortificados hasta una graduación de un 18-20°. A estas elevadas concentraciones de alcohol, las levaduras son incapaces de desarrollarse, por eso en la crianza de estos vinos no hay presencia de velo de flor. Por tanto, la ausencia del *biofilm* durante la crianza en la barrica de madera hace que se obtengan unos vinos muy oxidados con un color y aroma particular (color oscuro y aroma muy intenso).

Además, existen unos vinos finos o manzanillas a los cuales se les cae el velo, y por tanto se produce una oxidación del vino. En estos vinos se ve combinada una crianza biológica y una crianza oxidativa. Cuando se produce esta caída del velo, el vino se fortifica hasta un 20%, produciéndose amontillado en el caso de que el velo haya caído de un vino fino o manzanilla pasada en el caso de manzanillas de Sanlúcar de Barrameda. Estos vinos se caracterizan por tener una coloración ámbar, suaves y secos con un aroma a avellanas (SHERRY WINE, 2021).

Hay ciertos vinos generosos que se elaboran con el sistema combinado de crianza biológica y oxidativa donde se ve combinado el aroma de Amontillado y el sabor de olorosos; estos se conocen como Palo Cortado (Carrascosa et al., 2011). El origen de este vino es muy antiguo, proceden de aquellos tiempos en los que los vinos fermentaban exclusivamente en botas de madera de 500L, en las que entraban en juego múltiples variables enológicas que provocaban sutiles diferencias entre vinos procedentes de la misma cosecha (SHERRY WINE, 2021).

Tabla 1. Resumen de las características de los vinos generosos producidos en Jerez (Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Vinetur.com)

Vinos generosos	Color	Alcohol	Azúcar
Fino	Amarillo pajizo	15%-18% vol.	< 5 g/L
Manzanilla	Amarillo pajizo	15%-19% vol.	< 5 g/L
Amontillado	Ámbar	16%-22% vol.	< 5 g/L
Oloroso	Caoba	17%-22% vol.	< 5 g/L
Palo cortado	Castaño	17%-22% vol.	< 5 g/L

Aunque en el caso de la crianza oxidativa es posible llevar a cabo una crianza estática, normalmente todas las bodegas mantienen la tradición del sistema dinámico de crianza de criaderas y soleras (SHERRY WINE, 2021).

En el caso de realizar la crianza dinámica, ésta se lleva a cabo en dos fases:

Una fase estática conocida como sobretablas y una fase dinámica donde se da un sistema conocido como criaderas y soleras. En esta segunda fase, las botas se apilan unas encima de otras para formar una escala: la fila inferior, más cercana al suelo, se llama solera y contiene el vino más antiguo (teniendo todas las barricas de la misma fila vino del mismo tipo y edad). La fila superior a la solera se llama primera criadera y contiene el segundo vino más viejo. Por encima se encuentran la segunda y tercera criadera, respectivamente, y así sucesivamente hasta alcanzar una altura de cinco o seis filas (Carrascosa et al., 2011).

Entonces, tiene lugar un proceso conocido como saca y rocío: de la fila de la solera, se extrae aproximadamente un 40% del contenido por año para embotellar el vino y poder comercializarlo. La cantidad de vino extraída de la solera se sustituye por un volumen idéntico de vino de la fila superior, y así sucesivamente con todas las filas.

Finalmente, la fracción de vino extraída de la criadera superior que es la que contiene el vino más joven, es reemplazada por el vino de sobretablas (Pozo-Bayón & Moreno-Arriba, 2011).

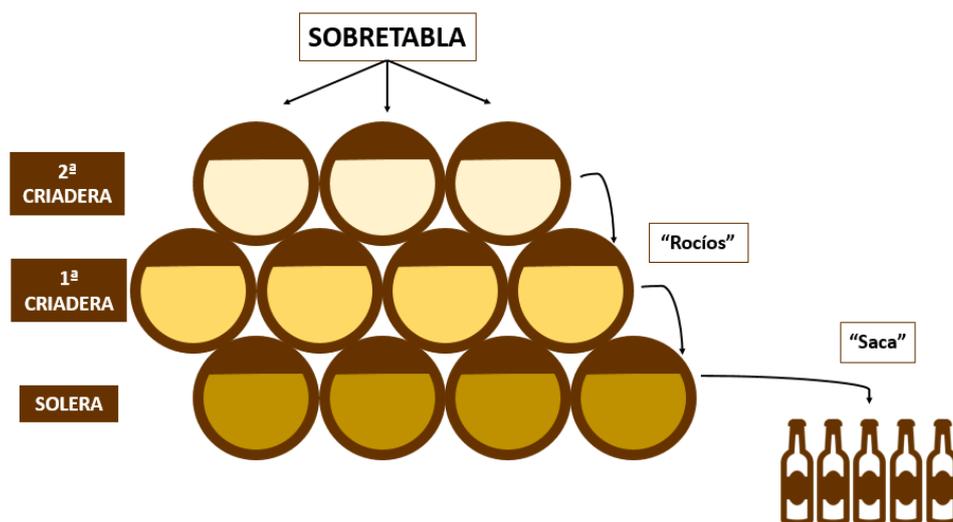


Imagen 6. Proceso de crianza dinámica basado en criaderas y soleras. (Elaboración propia).

4.2. LA CRIANZA BIOLÓGICA: EL VELO DE FLOR

Durante la crianza biológica de los vinos de Jerez, se dan ciertas condiciones adversas para las levaduras: baja concentración de oxígeno, alta concentración de etanol, bajo pH, presencia de sulfitos, baja o nula concentración de azúcares fermentables y niveles de nitrógeno en agotamiento (Moreno-García et al., 2015). En estas condiciones de estrés celular, las levaduras desarrollan un mecanismo de supervivencia: cambiar su metabolismo fermentativo por uno oxidativo y formar una estructura conocida como velo de flor.

Por un lado, este cambio de metabolismo causa importantes cambios en la composición final del vino, lo que repercute en las propiedades organolépticas del mismo. Un ejemplo de estos cambios en la composición del vino es una clara disminución en el contenido de etanol (que las levaduras usan como fuente de carbono no fermentable), el cual es transformado en acetaldehído y del que posteriormente se obtienen ciertos subproductos como 1,1-dietoxietano y el sotolon que hacen tan característico el sabor de este tipo de vinos. Además, las levaduras también consumen otras fuentes de carbono no fermentables reducidas como glicerol, ácido acético, acetato de etilo etc. Igualmente, las levaduras también toman como nutriente, ácidos grasos y aminoácidos como la prolina, produciendo compuestos como acetoína y 2,3-butanodiol, que continúan cambiando la composición del vino (Marín Menguiano, 2014).

Por otro lado, las levaduras se agrupan formando agregados multicelulares con una mayor hidrofobicidad superficial; debido a ello, estos agregados son capaces de atrapar el CO₂, lo que hace que suban hacia la superficie del vino, formándose así la estructura conocida como velo de flor o *biofilm* (Álvarez Rafael, 2017).

Tanto el velo de flor como el metabolismo oxidativo protegen al vino de oxidaciones, haciendo que éste mantenga un color amarillo pálido característico durante toda la crianza biológica (Álvarez Rafael, 2017; Mesa, 2000).

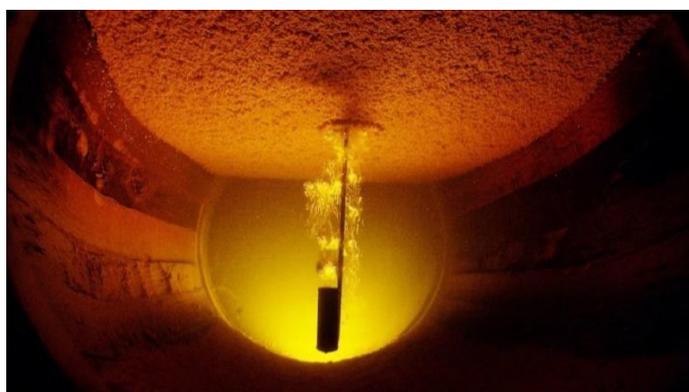


Imagen 7. Barrica llena de vino vista desde dentro, donde se puede apreciar en la parte superior el velo de flor (APRENDER DE VINO, 2021)

El velo joven generalmente tiene un color casi blanco, sobre todo en presencia de una gran aireación. En cambio, el velo viejo presenta una coloración más grisácea, pudiendo llegar a ser marrón en el caso de que haya poca aireación. Con el paso del tiempo, algunos trozos del velo se pueden desprender, y estos serán repuestos por nuevo desarrollo (Álvarez Rafael, 2017). Estos trozos de levaduras que caen se autolisan, lo que influye de manera positiva en el sabor y bouquet del vino. En el trasiego del vino a lo largo del sistema de crianza de criaderas y soleras, se aportan nuevos micronutrientes y oxígeno, potenciándose así la crianza. (Martínez Rodríguez, 1995).

4.3. ECOLOGÍA PRESENTE EN EL VELO DE FLOR DE LOS VINOS DE JEREZ

Durante la crianza biológica de los vinos de Jerez se desarrolla un velo de flor que consiste en un agregado multicelular de diversos microorganismos, tales como levaduras, bacterias y hongos (Cordero-Bueso et al., 2018). Este velo se desarrolla bajo unas condiciones de estrés severo: elevadas concentraciones de etanol y acetaldehído, bajo pH y elevadas concentraciones de sulfuros. Pocos microorganismos son capaces de sobrevivir a estas condiciones; debido a ello, más del 95% del velo de flor está formado por *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es la levadura mejor adaptada a estas duras condiciones. Además, se encuentran presentes en una menor cantidad otros microorganismos como bacterias, hongos y otras especies de levaduras (Alexandre, 2013).

Dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, destacan cuatro subespecies que forman parte del velo: *Saccharomyces cerevisiae beticus*, *Saccharomyces cerevisiae cheresiensis*, *Saccharomyces cerevisiae montuliensis*, *Saccharomyces cerevisiae rouxii*. Estas levaduras morfológicamente son muy similares a *Saccharomyces cerevisiae* y tienen ciertas características en común como el consumo de etanol como fuente de carbono, el metabolismo de lípidos implicado en la formación del velo y el requerimiento que tienen de oxígeno para asegurar la viabilidad del velo (Cordero-Bueso et al., 2018).

La subespecie que primero aparece es *Saccharomyces cerevisiae beticus*, ya que es la más rápida a la hora de formar el velo y predomina en vinos más jóvenes, mientras que *Saccharomyces cerevisiae montuliensis* es capaz de resistir a elevadas concentraciones de acetaldehído por lo que esta subespecie suele aparecer más tarde.

Inicialmente, estas levaduras se clasificaron en esas distintas subespecies en función de la distinta capacidad de fermentar diferentes azúcares (galactosa, dextrosa, lactosa, maltosa,

melibiosa, rafinosa y sacarosa). Pero recientes estudios taxonómicos basados en técnicas moleculares, como el análisis del DNA nuclear, han catalogado las levaduras en otras especies: *Saccharomyces montuliensis* como *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces rouxii* como *Zygosaccharomyces rouxii* y el resto de las levaduras de flor se consideran como sinónimos de *Saccharomyces cerevisiae* (debido a su similitud de DNA nuclear), aunque presentan ciertas diferencias cromosómicas (Kurtzman et al., 2011). Ahora, tanto *Torulaspota delbrueckii* como *Zygosaccharomyces rouxii* se consideran especies no-*Saccharomyces* tolerantes al etanol. El resto de levaduras que no forman parte del género *Saccharomyces* que se han aislado del velo de flor (sobre todo de la fase de sobretablas) se ha visto que no tienen relevancia a nivel fermentativo y que no son capaces de aguantar concentraciones de etanol superiores a 15% v/v, como *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces bailii* o incluso especies poco deseables como *Dekkera bruxellensis* (también llamada *Brettanomyces bruxellensis*) (Ruíz-Muñoz et al., 2017).

4.4. MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS PARA FACILITAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO

A lo largo de la historia se han utilizado técnicas de mejoramiento tanto para obtener nuevas variedades o razas de animales optimizadas. Actualmente, también se pueden utilizar estrategias similares para la mejora genética de levaduras enológicas. El uso de las levaduras en el mundo actual está ampliamente distribuido y abarca un gran número de campos: desde el sector alimentario, hasta la biomedicina, pasando por la ecología o la industria de los combustibles. Es por lo que la mejora genética de las levaduras y su posterior selección es muy importante para el desarrollo del mundo actual.

En la actualidad la mejora genética de microorganismos se divide en técnicas OMG (Organismos Modificados Genéticamente) y en técnicas no-OMG. Las técnicas basadas en OMGs son aquellas en las que se transforma el material genético de un organismo, añadiendo genes foráneos en su genoma (Guillén González, 2018). Hay muchas leyes diferentes de muchos países que limitan la producción y distribución de estos organismos, por lo que su salida a mercado es algo complicado. Por ejemplo, en el caso de la Unión Europea, a pesar de que los OMGs pueden contribuir a la expansión económica de los Estados miembros, se vieron en la obligación de implantar medidas de protección para el “improbable” caso de que pudiesen surgir riesgos derivados de la utilización de dichos OGMs. Dentro de las normas impuestas por la Unión Europea, los Estados miembro tienen sus propias normas. En el caso de España, la utilización de

OGMs es confinada (es decir, las modificaciones del material genético se deben de realizar con barreras para limitar el contacto con el medio ambiente y se debe de hacer con un seguimiento de trabajos I+D en laboratorios), de liberación voluntaria (se refiere a la liberación de los OMGs en el medio ambiente sin utilización de barreras, pidiendo previamente una autorización, siempre y cuando no haya una comercialización; este podría ser el caso de ensayos de campo con cultivos en fase experimental) (Ley 9/2003, de 25 de abril). Sin embargo, se puede utilizar como alternativa útil las técnicas no-OMG, que incluyen la selección clonal, la mutagénesis inducida, la recombinación sexual, la evolución adaptativa celular o la hibridación de cepas.

Por un lado, la descendencia vegetativa de un individuo, como puede ser una levadura, se conoce como clon. Por tanto, la selección clonal se hace a partir de individuos multiplicados vegetativamente, seleccionando sólo aquellos que tengan las características genéticas favorables o deseadas.

Por otro lado, la técnica de mutagénesis inducida consiste en introducir mutaciones en el material genético del microorganismo que se pretende mejorar. Esta inducción artificial de mutaciones se puede realizar mediante el uso de mutágenos químicos (como puede ser la azida sódica o el etil-metano-sulfonato) o utilizando mutágenos físicos (como los rayos UV y rayos X).

La recombinación sexual, por su parte, el proceso por el cual se producen nuevas combinaciones de genes en las poblaciones, mediante la combinación de los cromosomas parentales.

Otra técnica conocida como evolución adaptativa celular está basada en provocar la aparición de mutaciones en respuesta a condiciones específicas a las que se tienen que adaptar las células (Caspeta & Nielsen, 2015); en respuesta a esta adaptación, las células están sometidas a un estrés constante ya que las condiciones no son las óptimas para ellas, por lo que sufren una sucesión de mutaciones en su genoma en respuesta a adaptarse a estas condiciones (López-Malo et al., 2015). En este mecanismo de adaptación está basada la selección natural.

La hibridación de cepas por otro lado es una técnica ampliamente utilizada en el mundo de la enología y que consiste en fusionar dos células de la misma especie (intraespecífica) o de diferentes especies (interespecífica) para formar un nuevo individuo que recibirá características de ambas células parentales, pero la proporción de alelos recibidos puede variar en cada célula hija obtenida (Peris et al., 2016). Este podría ser el caso de las cepas de levaduras para elaborar cerveza tipo lager clasificadas como *Saccharomyces pastorianus*; estas cepas son híbridos interespecíficos naturales que se originaron a partir de una hibridación espontánea a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces eubayanus* (Gorter de Vries et al., 2019). Esta cepa es ideal para producir cerveza, ya que es capaz de fermentar maltosa y maltotriosa a baja

temperatura y de producir aromas y sabores que aumentan la calidad organoléptica de la cerveza (Van den Broek et al., 2015).

4.5. GENES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO

4.5.1. GENES RELACIONADOS CON LA FLOTABILIDAD DE LAS LEVADURAS

Una de las principales características de las levaduras de flor, es que son capaces de flotar en la superficie del vino formando un *biofilm* o velo. La flotabilidad es un mecanismo generalizado en organismos como el plancton, pero no en levaduras del género *Saccharomyces*, por eso resulta muy interesante dilucidar de dónde adquieren estos microorganismos la capacidad de flotar (Eldarov & Mardanov, 2020).

Esta capacidad de desarrollar el velo de flor se atribuyó en primer lugar a una alta hidrofobicidad de su superficie celular, es decir, a la capacidad que tienen estas levaduras de repeler el agua de su superficie. Al aumentar la hidrofobicidad, se facilita la agregación o agrupamiento de células entre sí y el atrapamiento de dióxido de carbono, permitiendo que el agregado celular suba a la superficie y desarrolle este *biofilm* (Zara et al., 2005).

Esta cualidad se debe a la hidrofobicidad de las paredes celulares de las levaduras, lo cual se comprobó tratando las células con β -glucanasa (una enzima que desintegra glucanos, un polisacárido ampliamente distribuido en la pared celular de las levaduras). Al tratar las paredes celulares con esta enzima, la hidrofobicidad de las levaduras disminuía, y por tanto, su capacidad de formación del velo de flor. Igualmente, también se cree que las manoproteínas (un tipo de glucoproteínas) están involucradas en la hidrofobicidad (Alexandre, 2013).

Por otro lado, cabe destacar que tanto la formación del velo como la ocupación resultante de la interfaz aire-líquido proporciona a estas levaduras una gran ventaja selectiva en un entorno tan adverso, donde el acceso al oxígeno es un factor crítico. Estas características, hacen que las levaduras de flor sean particularmente atractivas para estudios genéticos sobre evolución adaptativa (Eldarov & Mardanov, 2020).

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* en concreto está compuesto por 6275 genes (la unidad molecular de herencia genética que codifica proteínas) distribuidos en 16 cromosomas (Belda et al., 2019). Varios de estos genes han sido estudiados con la finalidad de descubrir cómo se forma el velo de flor y cómo las levaduras de flor pueden sobrevivir a las condiciones de elevado estrés presentes en el envejecimiento biológico de los vinos de Jerez, es decir, elevadas concentraciones de etanol y acetaldehído (Aranda et al., 2002).

4.5.1.1 GENES *FLO*

Los genes *FLO* constituyen una familia de genes que codifican proteínas que se encuentran ancladas a la membrana celular por un residuo de GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Romano et al., 2019). Uno de estos genes, *FLO11* (también conocido como MUCI), codifica una proteína de tipo adhesina conocida como Flo11p, cuya participación es muy importante a la hora de desarrollar del velo de flor (Zara et al., 2005; Fidalgo et al., 2006), ya que está involucrada en procesos de filamentación, crecimiento invasivo, floculación y adherencia a superficies sólidas en condiciones de estrés (Fidalgo et al., 2008).

Este gen lo poseen todas las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, responsables de realizar la fermentación alcohólica, tanto en vino como en cervezas de tipo ale y lager (Gorter et al., 2019). Sin embargo, no todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que poseen el gen pueden formar el velo de flor, sólo lo hacen las cepas de flor. El análisis de la secuencia de *FLO11* entre las levaduras de flor y el resto de las cepas, revela muchas diferencias. En las levaduras de flor, se ha descubierto que el promotor de *FLO11* es más corto, mientras que la secuencia codificante (ORF) es más larga (Fidalgo et al., 2006). Por tanto, la capacidad que tienen estas levaduras de flotar y de formar este velo puede deberse a la desregulación del gen *FLO11*, conduciendo una mayor expresión de este y que por tanto se sintetice una mayor cantidad de proteína Flo11p, lo que desencadena en una mayor hidrofobicidad (Mardanov et al., 2020). El papel clave de este gen para la formación de *biofilm* de levaduras de flor se demostró en experimentos sobre su inactivación genética (Fidalgo et al., 2006) o sobreexpresión (Fidalgo et al., 2008). Al inactivar el gen, se comprobó como las levaduras perdían la capacidad de flotar y de formar el *biofilm*, mientras que al sobreexpresarlo, se comprobó cómo podrían formar el velo de flor sin problemas.

Por otro lado, Zara et al., (2009) descubrieron que este gen también estaba íntimamente regulado por regulación epigenética. La epigenética explica cómo algunos genes pueden verse expresados o reprimidos en función del ambiente en el que se encuentre un organismo sin que haya modificación de la secuencia de ADN. Se cree que *FLO11* se reprime cuando la glucosa está presente en el medio (Verstrepen y Klis, 2006), y en cambio su expresión se ve aumentada en presencia de elevadas concentraciones de etanol y acetaldehído, bajo pH y un estrés oxidativo (Romano et al., 2019). Esto explicaría porqué las levaduras de flor se desarrollan tras la fermentación alcohólica convencional, cuando se ha consumido toda la glucosa y sólo quedan fuentes de carbono secundarias como el etanol.

Una comparación genética entre las levaduras de flor y las no levaduras de flor revelaron que la formación del velo depende no solo del gen *FLO11*, sino de otros 71 genes más, la mitad de los cuales son muy necesarios para la regulación de la transcripción de *FLO11* (Andersen et al., 2014).

Sería interesante realizar técnicas de mejora genética como mutagénesis inducida para que poder sembrar levaduras en el velo de flor y asegurarnos que poseen esta desregulación del gen *FLO11*, para que se favorezca la flotabilidad y prevenir una caída del velo.

4.5.1.2 GENES *NRG*

Los genes *NRG* o neuregulina, son una familia de genes que a su vez pertenecen a la familia EGF (factor de crecimiento epidérmico), la cual codifica una proteína que estimula el crecimiento y la diferenciación celular. En concreto el gen *NRG1* codifica una proteína, Ngrp1, que regula la expresión de *FLO11*, induciendo la síntesis de Flo11p en presencia de dicha proteína. Esto se ha comprobado en diversos estudios introduciendo mutaciones puntuales en el que *NRG1*, y viendo cómo una proteína truncada Ngr1p afecta a la expresión de *FLO11* (Alexandre 2013; Aranda & del Olmo 2003; Aranda et al., 2002).

Otra posible mejora de la genética de las levaduras de flor sería favorecer la expresión de este gen *NRG1* para que la síntesis de Flo11p no se vea limitada y por tanto, se vea reducida la flotabilidad de las levaduras de flor y de manera indirecta, se produzca la caída del velo de flor.

4.5.1.3 GENES *HSP*

Los genes de la familia *HSP* (Heat Shock Proteins) codifican unas proteínas de choque térmico, cuya expresión se ve inducida en condiciones de elevado estrés celular. Un gen concreto dentro de esta familia, el gen *HSP12*, se ha visto que está relacionado con la formación del velo de flor. Zara et al. (2002) realizaron distintos experimentos donde delecionaban dicho gen y donde le inducían mutaciones puntuales, y comprobaron así cómo su ausencia perjudicaba la formación del velo. Además, Alexandre (2013) descubrió que la expresión de este gen está fuertemente inducida en ausencia de glucosa y en presencia de etanol. Su sobreexpresión, resulta en un aumento de glutatión peroxidasa y reductasa (dos enzimas cuya función principal es proteger a las células del estrés oxidativo, manteniendo el ambiente reductor celular). Como resultado de esta sobreexpresión, se produce un aumento en el contenido de glutatión intracelular y una reducción de peróxidos de lípidos (lo que desencadena una mayor resistencia al estrés oxidativo,

un desarrollo más rápido del velo de flor). Esta sería otra de las razones que explicarían porqué las levaduras de flor son tan resistentes a condiciones de elevado estrés celular (Fierro-Risco et al. 2013).

La inducción de la expresión de este gen sería muy interesante no solo en las levaduras de flor encargadas del envejecimiento biológico, sino de las levaduras que realizan fermentaciones normales para que estén protegidas ante condiciones de elevado estrés por presencia de oxígeno.

4.5.2 GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA AL ETANOL

4.5.2.1. GENES *BTN2*

Las condiciones de estrés severo ocasionadas por elevadas concentraciones de etanol (9% v/v), así como la privación de glucosa, inducen una represión de la síntesis de proteínas en general en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo estas condiciones de estrés, las levaduras de flor *Saccharomyces cerevisiae* consumen el etanol como fuente de carbono secundaria, produciendo acetaldehído como subproducto.

El acetaldehído induce la expresión del gen *BTN2*, el cual codifica una proteína de unión, Btn2p, la cual se encarga de controlar la homeostasis iónica en la levadura, de regular su pH, de aportarle a la levadura resistencia al etanol, y determina la formación del *biofilm* y de participar en la localización celular de determinadas proteínas específicas (Espinazo-Romeu et al., 2008).

La proteína Btn2p es una proteína de tipo v-snare (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), que forman parte de un conjunto de proteínas que se encargan de producir la fusión de vesículas, permitiendo así el intercambio y transporte de moléculas y de proteínas (Chattopadhyay & Pearce, 2002). Por tanto, esta proteína, Btn2p, está íntimamente involucrada en el tráfico de proteínas intracelulares, ya que sin ella no se produciría esta fusión vesicular y por tanto intercambio de moléculas intracelular (Kama et al., 2007).

Para comprobar esto, se realizaron diversos experimentos donde se deleccionaba el gen *BTN2*. Chattopadhyay & Pearce (2002), comprobaron que las levaduras mutantes que carecían de dicho gen eran incapaces de localizar la proteína Rhb1p, la cual regula la actividad de la proteína transportadora de arginina y lisina. Por tanto, la falta de dicho gen en la levadura ocasiona una carencia de los aminoácidos arginina y lisina, ya que no se puede producir un buen transporte intracelular de los mismos, y en consecuencia, dificulta el crecimiento normal de las células.

Además, Btn2p también es necesaria para la localización de una proteína de membrana muy importante, Ist2p, la cual está involucrada en la tolerancia a la sal, manteniendo así la homeostasis celular (Kim et al., 2005).

Por otro lado, se ha visto que las proteínas que ofrecen resistencia a condiciones de estrés se ven inducidas precisamente bajo dichas condiciones. Este es el caso de la resistencia al etanol: en levaduras mutantes con el gen *BTN2* deletado se ve una hipersensibilidad al etanol (Yamauchi and Izawa, 2016). Esto se debe a que el promotor del gen *BTN2* se ve inducido bajo condiciones de estrés por elevado contenido en etanol y en acetaldehído.

BTN2 también está relacionado con el gen *FLO11*, pues al verse aumentada la cantidad de Btn2p, se induce la expresión de *FLO11*, favoreciendo así la formación del velo de flor. Por tanto, sería interesante realizar alguna técnica de mejora genética en levaduras, como puede ser la mutagénesis inducida para favorecer la expresión del gen *BTN2* y que por tanto se exprese también *FLO11*, favoreciéndose así tanto la flotabilidad del velo como la resistencia a las elevadas concentraciones de etanol.

4.6. FACTORES NO GENÉTICOS QUE AYUDAN A MEJORAR EL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO

A continuación, se van a detallar unos factores o sustancias que contribuyen a la mejora del envejecimiento biológico, así como de las características organolépticas de los vinos, pero sin detallar aspectos genéticos, ya que no se han encontrado en la revisión bibliográfica realizada. La información que se ha encontrado sobre los vinos de Jerez, centrándonos en la genética de las levaduras de flor, ha sido bastante limitada. Una explicación podría ser que no haya surgido en la D.O. y las bodegas productoras junto con la comunidad científica la necesidad de investigar más en profundidad los factores que condicionan todos los aspectos de esta crianza tan especial y única.

4.6.1. SUSTANCIAS ACTIVADORAS DEL VELO

Uno de los factores más importantes para mantener el velo de flor es la humedad. Es muy importante que en las bodegas de Jerez se mantenga una humedad constante, para evitar que se produzca la temida “caída del velo”. Esta caída también puede ocurrir por una parada en el crecimiento de las levaduras de flor. Por eso es muy importante investigar alternativas que

permitan el mantenimiento del velo, como por ejemplo activadores del crecimiento de las levaduras de flor.

Además, las levaduras consumen y producen diversos aminoácidos para conseguir un equilibrio del potencial redox celular. Por otro lado, algunos autores como Berlanga et al. (2006) estudiaron diferentes procesos, como el consumo y conversión de aminoácidos en otros alcoholes, ácidos y otros compuestos más reducidos durante el envejecimiento biológico. Las levaduras de flor pueden sintetizar nuevos aminoácidos durante el envejecimiento biológico utilizando la prolina como principal fuente de nitrógeno (Moreno-García et al., 2015).

Actualmente existe una única técnica para potenciar el crecimiento de las levaduras de flor y evitar la caída del velo, basada en la aireación e introducción de vino de la nueva añada en las botas jerezanas para introducir oxígeno y nuevos nutrientes (Mauricio et al., 2001). En el mercado enológico actual existe una amplia variedad de productos a base de aminoácidos y amonio diseñados para suministrar al mosto de uva con deficiencias naturales, pero tales productos aún no han sido estudiados para administrar en la etapa de envejecimiento biológico (Amores-Arrocha et al., 2018). En algunos trabajos de investigación como el de Campos et al. (2018), se usan altas dosis de polen de abeja (un producto natural que proviene de las colmenas de abejas y es rico en carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas, minerales, ácidos grasos, polifenoles esteroides y fosfolípidos entre otros compuestos de interés) en mosto de uva blanca y en hidromiel, disminuyendo el período que tarda en comenzar la fermentación alcohólica. Esto se debe a que el polen, que en un 14-16% está formado por aminoácidos, especialmente prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina y leucina, supone un aumento significativo del nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura (Roldán et al., 2011). Según este mismo autor, la prolina es el aminoácido libre más importante en la composición del polen de abeja y se encuentra en una concentración de 15,5 mg/g.

También se han realizado otras investigaciones con polen de abeja, como es el caso de Sancho-Galán et al., (2019), donde utilizan distintas cantidades de polen para ver cómo afecta al desarrollo del velo de flor, comprobando así que la adición de polen en dosis iguales o superiores a 0,25 g/L produce un aumento significativo en las poblaciones de levadura de flor durante el envejecimiento biológico. Durante este crecimiento se comprobó que el aminoácido más consumido fue la L-prolina, por lo que se piensa que es una de las fuentes de nitrógeno preferidas de las levaduras de flor. Asimismo, se vio un aumento relacionado con los niveles de hidrofobicidad del velo; se cree que esto se debe al hecho de que el polen de abeja posee algunos ácidos grasos responsables de la hidrofobicidad de la pared celular de la levadura, como

pueden ser el ácido palmítico y el ácido oleico. Por tanto, el polen de abeja es un conjunto de sustratos que permiten la capacidad de las levaduras de flotar en una fase filmógena sobre el vino (Campos et al., 2018). Igualmente, también se investigó el efecto que puede tener la adición de polen en cuando a las características organolépticas del vino. Los resultados obtenidos del análisis sensorial revelaron que en concentraciones inferiores a 1 g/L, el polen de abeja puede mejorar los atributos sensoriales del envejecimiento biológico tanto en la fase gustativa como en la fase olfativa. En cambio, a concentraciones superiores (10-20 g/L), los vinos pierden sus atributos sensoriales característicos y adquieren derivaciones sensoriales como un aumento de la intensidad del color, lo cual puede afectar a la calidad del vino. Este aumento de color puede ser explicado por el elevado contenido en polifenoles del polen de abeja, que podrían facilitar el desarrollo de reacciones de oxidación en el vino en presencia de oxígeno y como consecuencia, disminuir la calidad sensorial final del vino (Campos et al., 2018).

Consecuentemente, el polen de abeja puede ser una herramienta natural y viable para potenciar el desarrollo y crecimiento de las levaduras de flor durante la crianza biológica siempre que no se sobrepasen las concentraciones mínimas que pueden perjudicar los atributos sensoriales finales del vino.

4.6.2. CONSUMO DE GLUCÓNICO PARA MEJORAR EL PERFIL ORGANOLÉPTICO

En la crianza biológica, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se desarrollan en un entorno adverso de máximo estrés celular, en ausencia de glucosa y de muchas otras fuentes de nutrientes, por lo que se ven obligadas a consumir fuentes de carbono alternativas como el etanol o el glicerol (Moreno-García et al., 2015). Se han realizado diversos estudios donde se prueba la evolución de las levaduras usando fuentes de carbono alternativas al etanol o el glicerol, como puede ser por ejemplo el ácido glucónico. Este ácido procede de un hongo conocido como *Botrytis cinerea* que causa una enfermedad, la podredumbre gris (Ogawa et al., 2021). El desarrollo de esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas a los viticultores, ya que disminuye la calidad de la uva, y en consecuencia empeora las características organolépticas del vino. Esto se debe a que *Botrytis cinerea* produce una gran cantidad de lacasa, una enzima polifenoloxidasas exocelular que oxida los compuestos polifenólicos tornándolos de un color marrón, lo que repercute en el color final del vino (Peinado et al., 2004). Además, esta enzima disminuye la acidez titulable y disminuye la acidez volátil, ya que la podredumbre favorece la presencia de bacterias acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Peinado et al., 2003).



Imagen 8. Racimo de uva con podredumbre, debido a una infección por *Botrytis cinerea* (URBINA VINOS, 2021).

El ácido glucónico suele ser un indicador de podredumbre en el mosto de uva; este ácido puede ser una fuente de carbono asimilable fácilmente por diversos microorganismos, pero no por las levaduras normales, por lo que los vinos normales que contienen este ácido suelen tener unas características organolépticas poco agradables. En cambio, se ha visto en varios estudios como el de Ogawa et al., (2021), cómo las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de flor son capaces de metabolizar el ácido glucónico como fuente de carbono secundaria además de reducir la acidez volátil y de aumentar los ácidos butanoico, isobutanoico, 2-metilbutanoico y 3-metilbutanoico, dando como resultado un vino con mejores características aromáticas (Peinado et al., 2003).

Por tanto, el ácido glucónico puede ser usado por este tipo de levaduras en ausencia de otras fuentes de carbono secundarias como el etanol o el glicerol, y favorecer así el perfil organoléptico de los vinos.

4.6.3. LA LISOZIMA EN LA ESTABILIDAD BIOLÓGICA DE LOS VINOS DE JEREZ

En el velo de flor se pueden desarrollar muchos más microorganismos aparte de las levaduras de flor, como otras levaduras, hongos o bacterias del ácido láctico. En concreto, el desarrollo de bacterias lácticas en el velo de flor da como resultado unos vinos viscosos y con abundantes aminas biógenas (Roldán et al., 2012). Las aminas biógenas son compuestos tóxicos que se encuentran presentes en bebidas fermentadas, como es el caso del vino, y que suponen un gran

problema de seguridad alimentaria ya que pueden ocasionar importantes problemas de salud, como por ejemplo reacciones alérgicas, alteraciones respiratorias, sofocos, migrañas, problemas estomacales e intestinales etc. (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero), además de deteriorar organolépticamente el vino (García García, 2019), suponiendo además un rechazo por parte del consumidor.

El desarrollo de estas bacterias lácticas suele estar relacionado con el contenido de ácido glucónico producido por una infección de *Botrytis cinerea* presente en las uvas con las que se va a elaborar el vino. Altas concentraciones de este ácido, es decir, más de 600 mg/L conduce a una fermentación heteroláctica característica de este tipo de bacterias y que da como resultado una acumulación de grandes cantidades de ácido láctico y acidez volátil (Pérez et al., 1991).

De manera tradicional se ha utilizado dióxido de azufre (SO₂) para controlar infecciones de microorganismos y para proteger los vinos de la oxidación. Sin embargo, si se usan elevadas concentraciones de SO₂ (es decir, aquellas concentraciones mayores a 100 mg/L) en vinos destinados a crianza biológica, se retrasa la formación del velo. Por eso hay que buscar alternativas al dióxido de azufre para asegurar la estabilidad microbiana en este tipo de vinos.

Este sería el caso de la lisozima, también conocida como muramidasa, una enzima hidrolítica que degrada las paredes celulares de las bacterias Gram positivas (las bacterias lácticas se incluyen dentro de este grupo), y por tanto acaba lisándolas.

Actualmente la lisozima se suele extraer de la clara de huevo de gallina y se usa comercialmente como conservante de alimentos. Además, fue aprobada por la OIV (Organización Internacional del Vino) para ser añadida al mosto o al vino en cantidades no superiores a 500 mg/L para el control microbiano de los mismos. Las concentraciones más bajas que se han probado son dosis de 62,5 mg/L (Lasanta et al., 2010) y vieron que era efectiva tanto para corregir como para prevenir la fermentación heterotáctica y el desarrollo bacteriano láctico.

La lisozima puede ser adicionada tanto antes del desarrollo del velo, como por ejemplo en el mosto si se observa que las uvas vienen infectadas de podredumbre gris, o bien una vez que ya se haya desarrollado el velo. Por tanto, ya que la lisozima es una enzima que sólo afecta a bacterias Gram positivas, puede ser una buena alternativa para el control microbiano de los vinos y que no afecte al velo de flor.

5. CONCLUSIONES

En base a la información recogida, se ha podido comprobar lo únicos e importantes que son los vinos de Jerez no sólo en España, sino en todo el mundo. Un aspecto que cabe destacar es que constata que hay poca bibliografía al respecto, aunque sea uno de los vinos con más renombre y exportación actualmente en España.

En cuanto a los aspectos genéticos se ha confirmado cómo las levaduras de flor poseen una genética única que le aportan las características necesarias para poder llevar a cabo la crianza biológica, destacando los genes *FLO11*, *NRG1*, *HSP12*, *BTN2* y se ha evidenciado las diversas técnicas de mejora de levaduras que se están llevando a cabo en el mundo de la enología y que podrían servir para mejorar tanto la calidad como el proceso de elaboración de estos vinos.

Se han encontrado singularidades como que las levaduras de flor son de los pocos microorganismos capaces de consumir ácido glucónico, así como que la adición de lisozima y de polen de abeja mejora la calidad final de estos vinos. Sin embargo, dada su limitación geográfica, hay pocos estudios entorno a estos vinos centrados en los aspectos genéticos involucrados con los factores anteriormente descritos. Sería interesante desarrollar futuras líneas de estudio en las cuales se podrían investigar más aspectos de los aquí expuestos que puedan estar involucrados en la crianza biológica y a su vez relacionarlos con los genes que estén asociados a dichos procesos con el objetivo final de mejorar tanto los aspectos tecnológicos, así como la calidad de estos singulares vinos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* — Their ecology, genetics, and metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2): 269–275. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>

Álvarez Rafael, R. (2017). Trabajo Final de Grado. Análisis molecular de cepas de levadura de velo de flor en el marco de jerez. Universidad de Cádiz.

Amores-Arrocha, A., Roldán, A., Jiménez-Cantizano, A., Caro, I. and Palacios, V., 2018. Effect on White Grape Must of Multiflora Bee Pollen Addition during the Alcoholic Fermentation Process. *Molecules*, 23(6), p.1321.

Andersen, K., Bojsen, R., Sørensen, L., Nielsen, M., Lisby, M., Folkesson, A. and Regenber, B., 2014. Genetic Basis for *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Liquid Medium. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 4(9), pp.1671-1680.

APRENDER DE VINO. Disponible <https://www.aprenderdevino.es/influencia-velo-flor-vinos-jerez/>. Accedido el 16 Abril 2021.

Aranda, A. and del Olmo, M., 2003. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20(8), pp.747-759.

Aranda, A.; Querol, A. and Del Olmo, M. (2002). Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol*, 177: 304-312. Doi: 10.1007/s00203-001-0391-1

Berlanga, T., Millán, C., Mauricio, J. and Ortega, J., 2006. Influence of nitrogen on the biological aging of sherry wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), pp.2113-2118.

Campos, M., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. and Ferreira, F., 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), pp.154-161.

Carrascosa, A.; Muñoz, R. and González, R. (2011). *Molecular wine microbiology*. Editorial Academic Press. USA. 259 pp.

Caspeta, L. and Nielsen, J. (2015) «Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses», *mBio*, 6(4), pp. 1-9. doi: 10.1128/mBio.00431-15

Chattopadhyay, S. and Pearce, D., 2002. Interaction with Btn2p Is Required for Localization of Rsg1p: Btn2p-Mediated Changes in Arginine Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 1(4), pp.606-612.

Compés, López, R. & Szolnoki, G. 2020. *Enoturismo sostenible e innovador. Modelos de éxito alrededor del mundo*.

Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. (8 agosto 2013). Orden que aprueba el Reglamento de las Denominaciones de Origen Jerez-Xérès-Sherry» y «Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda», así como sus correspondientes Pliegos de Condiciones. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía núm. 155* (pp. 126-145).

Cordero-Bueso, G.; Ruiz-Muñoz, M.; González-Moreno, M.; Chirino, S.; Bernal-Grande, M. C. and Manuel Cantoral J. (2018). The microbial diversity of Sherry Wines. *Fermentation*, 4 (1), p. 19. Doi: 10.3390/fermentation4010019

Eldarov, M. and Mardanov, A., 2020. Metabolic Engineering of Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(9), p.964.

ENOARQUÍA. Disponible en <https://www.enoarquia.com/el-velo-de-flor/>. Accedido el 16 Abril 2021.

Escolar, M. and Morueco, F. 2011. Vino, turismo e innovación: las Rutas del Vino de España, una estrategia integrada de desarrollo rural. *Estudios de Economía Aplicada*, 29: 129-165

Espinazo-Romeu, M., Cantoral, J., Matallana, E. and Aranda, A., 2008. Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Research*, 8(7), pp.1127-1136.

Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., González-Moreno, M., Chirino, S., Bernal-Grande, M. and Cantoral, J., 2018. The Microbial Diversity of Sherry Wines. *Fermentation*, 4(1), p.19.

Fidalgo, M., Barrales, R. and Jimenez, J., 2008. Coding repeat instability in the FLO11 gene of *Saccharomyces* yeasts. *Yeast*, 25(12), pp.879-889.

Fidalgo, M., Barrales, R., Ibeas, J. and Jimenez, J., 2006. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), pp.11228-11233.

García García, M., 2019. Ingeniería de catalizadores bienzimáticos de amino oxidasa y catalasa: eliminación de aminos biógenas en vino. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Gorter de Vries, A., Pronk, J. and Daran, J. 2019. Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS Yeast Research*, 19(7).

Hidalgo, L. (2002). *Tratado de viticultura general*. Vol I. Editorial Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1264 pp.

Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2002. *Diagnóstico del sector vitivinícola y de las bodegas en el Marco de Jerez*. Cádiz.

Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca, 2011. *Pliego de condiciones de la denominación de origen «Jerez-Xérès-Sherry»*. Cádiz.

- Kama, R., Robinson, M. and Gerst, J., 2007. Btn2, a Hook1 Ortholog and Potential Batten Disease-Related Protein, Mediates Late Endosome-Golgi Protein Sorting in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2), pp.605-621.
- Kim, Y., Chattopadhyay, S., Locke, S. and Pearce, D., 2005. Interaction among Btn1p, Btn2p, and Ist2p Reveals Potential Interplay among the Vacuole, Amino Acid Levels, and Ion Homeostasis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(2), pp.281-288.
- Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. and Boekhout T. 2011. *The yeasts: A Taxonomic Study*. Vol 1. Editorial Elsevier Science. 2354 pp.
- Lasanta, C., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L. and Palacios, V., 2010. Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. *Food Control* 21, 1442e1447.
- López-Malo, M., García-Rios, E., Melgar, B., Sanchez, M., Dunham, M. and Guillamón, J., 2015. Evolutionary engineering of a wine yeast strain revealed a key role of inositol and mannoprotein metabolism during low-temperature fermentation. *BMC Genomics*, 16(1).
- Mardanov, A., Eldarov, M., Beletsky, A., Tanashchuk, T., Kishkovskaya, S. and Ravin, N., 2020. Transcriptome Profile of Yeast Strain Used for Biological Wine Aging Revealed Dynamic Changes of Gene Expression in Course of Flor Development. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Martínez Rodríguez, P. 1995. Tesis Doctoral. Evolución y caracterización de las poblaciones de levaduras responsables de la crianza biológica del vino de jerez. Universidad de Sevilla.
- Marín Menguiano, M. 2014. Tesis Doctoral. Caracterización y mejora de levaduras de flor aisladas en la Denominación de Origen Montilla-Moriles. Universidad Pablo de Olavide.
- Mauricio, J., Valero, E., Millán, C. and Ortega, J., 2001. Changes in Nitrogen Compounds in Must and Wine during Fermentation and Biological Aging by Flor Yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), pp.3310-3315.
- McGovern, P. E.; Glusker, D. L.; Exner, L. J. and Voigt, M. M. 1996. Neolithic resinated wine. *Scientific correspondence*. 381: 480-481
- Mesa, J. J. 2000. Tesis doctoral. Desarrollo de técnicas microbiológicas y moleculares para la selección y caracterización de levaduras y su aplicación en la crianza biológica y propiedades analíticas del vino de Jerez. Universidad de Cádiz.

- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J. and Mauricio, J. 2015. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *Food Microbiology*, 46, pp.25-33.
- Ogawa, M., Moreno-García, J., Joseph, L., Mauricio, J., Moreno, J. and García-Martínez, T. 2021. Metabolic Changes by Wine Flor-Yeasts with Gluconic Acid as the Sole Carbon Source. *Metabolites*, 11(3), p.150.
- Peinado, R., Mauricio, J., Medina, M. and Moreno, J. 2004. Effect of *Schizosaccharomyces pombe* on Aromatic Compounds in Dry Sherry Wines Containing High Levels of Gluconic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), pp.4529-4534.
- Peinado, R., Moreno, J., Ortega, J. and Mauricio, J. 2003. Effect of Gluconic Acid Consumption during Simulation of Biological Aging of Sherry Wines by a Flor Yeast Strain on the Final Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), pp.6198-6203.
- Peris, D., Pérez-Través, L., Belloch, C. and Querol, A. 2016. Enological characterization of Spanish *Saccharomyces kudriavzevii* strains, one of the closest relatives to parental strains of winemaking and brewing *Saccharomyces cerevisiae* × *S. kudriavzevii* hybrids. *Food Microbiology*, 53, pp.31-40.
- Pozo-Bayón, M. A. & Moreno-Arribas, M. V. 2011. *Sherry Wines*. Vol 63. Cap 2. Editorial Elsevier. Madrid. 17 pp.
- Pérez, L., Valcarcel, M.J., González, P. and Domecq, B. 1991. Influence of Botrytis infection of the grapes on the biological aging process of fino sherry. *American Journal of Enology and Viticulture* 42 (1), 58e62.
- RITMONGÓ. Disponible en <https://www.rimontgowineries.com/es/bodegas-en-venta-espana/do-jerez>. Accedido el 14 Abril 2021.
- Rodríguez-García, J., and Vieira-Rodríguez, Á., 2017. Análisis del Mercado de los Vinos de Jerez-Xérès-Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda en el periodo 1982-2012. *Revista de Estudios Andaluces*, vol. 34 (1), 155-200. <http://dx.doi.org/10.12795/rea.2017.i34.06>
- Roldán, A., Lasanta, C., Caro, I. and Palacios, V., 2012. Effect of lysozyme on “flor” velum yeasts in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiology*, 30(1), pp.245-252.
- Roldán, A., van Muiswinkel, G., Lasanta, C., Palacios, V. and Caro, I., 2011. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), pp.574-582.

- Romano, P., Ciani, M. and Fleet, G., 2019. *Yeasts in the production of wine*. 1st ed. New York.
- RUIZ-CAPILLAS, C. and JIMÉNEZ-COLMENERO, F., 2005. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), pp.489-599.
- Ruíz-Muñoz, M; Bernal-grande, M. C.; Cordero-bueso, G. and Hughes-herrera, D. 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, 58. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040058>
- Sancho-Galán, P., Amores-Arrocha, A., Jiménez-Cantizano, A. and Palacios, V. 2019. Use of Multiflora Bee Pollen as a Flor Velum Yeast Growth Activator in Biological Aging Wines. *Molecules*, 24(9), p.1763.
- VITIVINICULTURA. Disponible en <https://www.vitivinicultura.net/pedro-ximenez.html>. Accedido 25 Junio 2021.
- SHERRY WINE Disponible en <https://www.sherry.wine/>. Accedido 14 Abril 2021.
- URBINAVINOS. Disponible en <http://urbinavinos.blogspot.com/2011/07/podredumbre-gris-botrytis-bunch-rot-and.html>. Accedido 25 Junio 2021.
- Van den Broek, M., Bolat, I., Nijkamp, J., Ramos, E., Luttik, M., Koopman, F., Geertman, J., de Ridder, D., Pronk, J. and Daran, J. 2015. Chromosomal Copy Number Variation in *Saccharomyces pastorianus* Is Evidence for Extensive Genome Dynamics in Industrial Lager Brewing Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), pp.6253-6267.
- Yamauchi, Y. and Izawa, S. 2016. Prioritized Expression of BTN2 of *Saccharomyces cerevisiae* under Pronounced Translation Repression Induced by Severe Ethanol Stress. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Zara, S., Bakalinsky, A., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M. and Budroni, M. 2005. FLO11 -Based Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp.2934-2939.