



## RESOLUCIÓN OIV-OENO 576A-2017

### MONOGRAFÍA SOBRE LAS LEVADURAS *SACCHAROMYCES*

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

CONSIDERANDO que las levaduras no *Saccharomyces* pueden utilizarse para sembrar mostos y vinos, y que dicha siembra puede preceder a una inoculación secuencial o realizarse de forma simultánea con *Saccharomyces* spp.,

DECIDE reemplazar la monografía "Levaduras secas activas (LSA) *Saccharomyces* spp." (ES-COEI-1-LEVSAC, OENO 329-2009) por la monografía "Levaduras seleccionadas *Saccharomyces* spp.",

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

## Levaduras seleccionadas *Saccharomyces* spp.

### 1. OBJETO, ORIGEN Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

La resolución OENO-MICRO 14-546 indica que pueden utilizarse levaduras seleccionadas *Saccharomyces* spp. para su siembra en uvas, mostos y vinos a fin de iniciar o garantizar la finalización de la fermentación alcohólica, así como para elaborar vinos especiales.

Las levaduras utilizadas deberán haberse aislado de las uvas, mostos o vinos, obtenerse por hibridación de cepas procedentes de uvas, mostos o vinos, o derivar de otras levaduras enológicas. Para utilizar levaduras enológicas genéticamente modificadas, se deberá solicitar la autorización de las autoridades competentes.

### 2. ETIQUETADO

En el envase deberán indicarse los siguientes datos:

- el nombre del género (*Saccharomyces*), de la(s) especie(s) y de la(s) cepa(s), así como todas las características que puedan garantizar la trazabilidad del producto,
- la forma física del producto como se describe en el punto 3,
- nombre del seleccionador,
- nombre y dirección del fabricante o del comercializador o del distribuidor,
- las instrucciones de uso recomendadas por el fabricante,
- el índice de siembra recomendado,
- la cantidad mínima de células viables –conservadas a la temperatura recomendada– por gramo de producto (UFC según el punto 4.6) garantizada por el fabricante,
- el número de lote de fabricación, la fecha de caducidad y las condiciones de conservación,
- en caso de ser relevante, una indicación de que la cepa o las cepas de levaduras se han obtenido mediante modificación genética y los caracteres modificados,
- todos los aditivos.

### 3. CARACTERÍSTICAS

La preparación podrá ser un cultivo puro, una mezcla de cepas de levaduras *Saccharomyces* o una mezcla de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.

Las levaduras seleccionadas del género *Saccharomyces* pueden utilizarse de las siguientes formas:

- levaduras secas activas (ADY) con un 92 % de materia seca como mínimo y un nivel de levaduras viables igual o superior a  $10^{10}$  UFC/g de materia seca,

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

- levaduras congeladas activas (AFY) con un intervalo de materia seca de entre el 40 % y el 85 % y un nivel de levaduras viables igual o superior a  $10^{10}$  UFC/g de materia seca,
- levaduras comprimidas (COY) con un intervalo de materia seca de entre el 30 % y el 35 % y un nivel de levaduras viables igual o superior a  $10^{10}$  UFC/g de materia seca,
- levaduras en crema (CRY) con un intervalo de materia seca de entre el 18 % y el 25 % y un nivel de levaduras viables igual o superior a  $10^{10}$  UFC/g de materia seca,
- levaduras encapsuladas (perlas) o inmovilizadas (ENY) con alginato o cualquier otro producto admitido por la OIV con un 86 % de materia seca como mínimo y un nivel de levaduras viables igual o superior a  $10^9$  UFC/g de materia seca,
- levaduras del licor de tiraje para los vinos espumosos que contengan más de  $50 \times 10^6$  células viables por mL.

#### **4. LÍMITES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS**

##### **4.1 - Humedad**

Determinar en función de la pérdida de peso de 5 g de producto secado a 105 °C hasta alcanzar un peso constante. El contenido deberá ajustarse a las características relativas al nivel de humedad o agua que figuran en el punto 3.

##### **4.2 - Plomo**

Determinar según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a 2 mg/kg de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

##### **4.3 - Mercurio**

Determinar según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a 1 mg/kg de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

##### **4.4 - Arsénico**

Determinar según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a 3 mg/kg de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

##### **4.5 - Cadmio**

Determinar según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a 1 mg/kg de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

##### **4.6 - Total de levaduras viables**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ajustarse a las características que figuran en el punto 3.

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

#### **4.7 - Levaduras distintas de las que se indican en la etiqueta**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional, a fin de obtener un número determinado de colonias para su posterior identificación.

##### **4.7a. Determinación de contaminantes a nivel de género**

La población contaminante de un género distinto de *Saccharomyces* deberá ser 5 logs inferior a la población total de las cepas indicadas en la etiqueta y definidas en el punto 3 (Características). Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional para diferenciar entre *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.

##### **4.7b. Determinación de contaminantes a nivel de especie o cepa**

Las especies y cepas indicadas en la etiqueta deberán suponer, como mínimo, el 95 % de la población total de levaduras. Proceder a su control según el anexo 1.

#### **4.8 - Mohos**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a  $10^3$  UFC/g de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

#### **4.9 - Bacterias lácticas**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a  $10^5$  UFC/g de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

#### **4.10 - Bacterias acéticas**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. El contenido deberá ser inferior a  $10^4$  UFC/g de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

#### **4.11 - *Salmonella***

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. La ausencia deberá ser controlada en una muestra de 25 g.

#### **4.12 - *Escherichia coli***

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. Para ello, utilizar el medio selectivo-diferencial para *Escherichia coli*. La ausencia deberá ser controlada en una muestra de 1 g.

#### **4.13 - Estafilococos**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. Para evaluar la presencia de estafilococos, utilizar un cultivo de enriquecimiento en caldo Giolitti-Cantoni. Confirmar mediante cultivo en el medio sólido Baird-Parker.

Si el caldo Giolitti-Cantoni arroja un resultado positivo, confirmar la presencia de estafilococos mediante el aislamiento en un medio sólido Baird-Parker. Utilizar un asa de siembra en el medio de cultivo positivo para sembrar el medio sólido BP y aislar las colonias.

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

La ausencia deberá ser controlada en una muestra de 1 g.

#### **4.14 - Coliformes**

Proceder al recuento según el método que figura en el capítulo II del Codex Enológico Internacional. Para ello, utilizar el medio selectivo-diferencial para coliformes, agar desoxicolato.

El contenido deberá ser inferior a  $10^2$  UFC/g de la preparación correspondiente, que figura en el punto 3.

#### **5. ADITIVOS**

Deberán ajustarse a la legislación vigente.

#### **6. CONSERVACIÓN**

Los productos deberán conservarse y propagarse en condiciones que favorezcan la estabilidad genética.

En todos los casos, respetar las recomendaciones del fabricante.

#### **7. DOCUMENTACIÓN DEL PRODUCTO**

La documentación del producto deberá incluir pautas sobre conservación, transporte, manipulación y condiciones de uso (temperatura, activación, rehidratación según sea necesario, por ejemplo por suspensión en mosto o vino, etc.).

---

### **ANEXO 1**

#### **1. Obtención de colonias**

Tomar una muestra de 1 g o de 1 mL –en caso de levaduras de licor de tiraje– y suspenderla en condiciones asépticas en 100 mL de una solución aséptica de sacarosa al 5 %. Homogeneizar y dejar reposar a 25-30 °C durante 20 min.

Tras hacer las diluciones decimales sucesivas necesarias, propagar 0,1 mL de la muestra diluida en la superficie de una placa de YEPD y agar nutritivo (20 g de glucosa, 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 100 mg de cloranfenicol para evitar la proliferación bacteriana, 150 mg de bifenilo para evitar la proliferación de mohos, 20 g de agar y c. s. de agua para enrasar a 1000 mL). Incubar en aerobiosis durante seis días a 25 °C. En esta preparación puede cultivarse cualquier levadura, incluso las del género no *Saccharomyces*, que contaminarían o se integrarían en la mezcla con *Saccharomyces* spp.

#### **2. Identificación de las especies/cepas contaminantes**

La identificación se lleva a cabo en las colonias aisladas en las placas.

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

De acuerdo con las características, la población contaminante (que no es ni la cepa pura, ni ninguna de las distintas cepas de la mezcla de cepas) deberá ser inferior al 5 % de la población total. Tras las diluciones necesarias para obtener las colonias individuales, si se identifican 20 colonias de 300, un 5 % de contaminación equivale (idealmente) a 1 colonia de cada 20.

Identificar el contaminante a nivel de especie por secuenciación D1/D2 (véase el punto 2.1).

Si todas las colonias son de una misma especie, se puede comprobar que una cepa contaminante es inferior al 5 % analizando 20 colonias mediante SSR o PCR de secuencias delta para la especie *S. cerevisiae* (véase el punto 2.2).

Si la preparación incluye una mezcla de dos o tres especies o cepas, la que tenga menor representación deberá suponer un 15 % del total. Si se verifica la composición de la mezcla mediante la identificación de las colonias, no se obtendrá un resultado correcto. De hecho, para una mezcla de dos cepas y una placa con 400 colonias, la cepa con menor representación debería producir 3 de las 20 colonias identificadas. Por todo ello, se puede recomendar el uso de la PCR cuantitativa específica con sondas dirigidas a las **especies** esperadas, a fin de identificar dos o más **especies** en la mezcla (**proporción de diferentes especies**). En este caso, no se produce el cultivo preliminar en placas. El ADN se extrae directamente de la muestra.

Para controlar las **mezclas de cepas de una misma especie (proporción de distintas cepas)**, la única posibilidad, en la actualidad, no puede excluir el cultivo en placas ni la identificación de colonias a nivel de la cepa. El resultado deberá interpretarse con cautela, ya que la representación de cada cepa en las placas se ve afectada por la capacidad de crecimiento por un lado, y por el mínimo número de colonias que podrían llegar a identificarse por el otro.

## 2.1. Identificación de las especies

La especie se identifica mediante la secuenciación del ADN de los dominios variables D1 y D2 de la región ribosómica 26S, que se basa en la técnica de amplificación por PCR. Este es el método preferido para la identificación de especies de levaduras: aquellas cepas que presentan más de un 1 % de diferencia en la secuencia del dominio D1/D2 de 600 nucleótidos no pertenecen a la misma especie.

1. Suspender de forma independiente las colonias en la mezcla para PCR; esto podrá hacerse directamente o suspendiéndolas previamente en agua (unos 50 µL en función del tamaño de la colonia). A continuación, añadir una muestra a la mezcla para la PCR.
2. Mezcla para la PCR (volumen final de 50 µL): 10 mM de Tris-HCl (pH 8), 50 mM de KCl, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v), 0,2 mg/mL de ASB, glicerol al 3,12 % (v/v), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs y 0,1 U/µL de polimerasa Taq.
3. Cebadores: NL1/NL4. NL 1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) y NL 4 (5'-GGTCCGTGTTCAA GACGG).
4. Para llevar a cabo la amplificación, exponer a 95 °C durante 10 minutos para poder acceder al ADN. A continuación, repetir 30 veces el siguiente ciclo: 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 45 s, 72 °C durante 1 min y, por último, 72 °C durante 7 min.

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

5. Purificar el producto de la PCR con un paquete de purificación del producto de la PCR y secuenciar con los cebadores que se utilizaron para la amplificación.
6. Comparar las secuencias obtenidas con las que figuran en la base de datos GenBank ([www.ncbi.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nih.gov/Genbank)).

## 2.2. Identificación de las cepas

Tras identificar la especie, se pueden identificar las cepas. Para la mayoría de las especies de levaduras enológicas, al menos para las que actúan generalmente como iniciadores, el método de identificación más fiable y preciso se basa en el análisis de secuencias repetidas (microsatélites o SSR). Las cepas se diferencian en función del número de repeticiones de secuencias cortas en cierta región de su propio genoma. Estos locus se ven delimitados por una serie de zonas conservadas, que se seleccionan como cebadores para la amplificación por PCR. El análisis consiste en la amplificación por PCR de diversos locus con cebadores concretos para cada especie de levadura, y en la medición de su longitud mediante electroforesis capilar para secuenciación (con un grado de resolución de un solo nucleótido).

Nota:

1. En la actualidad, no es posible tipificar las cepas de todas las especies de levaduras;
2. con objeto de aplicar los últimos avances científicos, la elección de cebadores adaptados a las distintas especies se lleva a cabo con arreglo a los trabajos publicados en revistas científicas con arbitraje internacional;
3. para algunas especies, se analizan de 9 a 12 locus aproximadamente; algunos locus son más discriminatorios que otros;
4. el análisis puede simplificarse si se tiene en cuenta un menor número de locus seleccionados por su mayor capacidad de discriminación y si se continúa con el análisis en caso ambigüedad;
5. la amplificación puede hacerse por PCR múltiple (hasta nueve pares de cebadores) para algunas especies, como *S. cerevisiae*, lo que acorta y simplifica el análisis.

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, pueden utilizarse los perfiles obtenidos por amplificación (PCR) de las regiones interdelta (véase OIV-OENO 408-2011). No obstante, en caso de ambigüedad, cuando los perfiles sean distintos pero parecidos, será necesario determinar el tipo mediante análisis de microsatélites (SSR).

*Certificado conforme  
Sofía, 2 de junio de 2017  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*