

Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en uvas

Ana Godoy

Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias

Tutora: Dra Carina Gaggero,
Departamento de Biología Molecular, IIBCE

Co-tutora: M.Sc Karina Medina,
Sección Enología, Facultad de Química

Montevideo, Uruguay
Noviembre, 2013

A mis padres y hermanos.

Agradecimientos

Para poder realizar este trabajo que representa el fin-comienzo de una nueva etapa en mi vida, fue necesario el apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

En primer lugar a Carina, por abrirme las puertas del laboratorio, aceptar ser mi tutora, y por hacer que este trayecto fuera una experiencia enriquecedora y disfrutable.

A Cece por las explicaciones, ayuda y su apoyo en todo momento.

A todo el equipo de la Sección Enología de la Facultad de Química, por brindarme las cepas y siempre recibirme con buena onda, dentro de los que se encuentra Karina mi Co-Tutora, Maru, Vale, Laurita, Francisco y un agradecimiento especial a Maia que hoy no forma parte del grupo, pero fue quien me enseñó los primeros pasos en Microbiología.

A todos los compañeros del laboratorio de Biología Molecular, por facilitarme la integración, haciéndome sentir muy cómoda en todo momento.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de Iniciación en la Investigación otorgada, que posibilitó que terminara mis estudios.

A mi familia: mis hermanos compañeros de toda la vida, mi padre, mi abu Lala compinche de todas las horas, a mami y “el inni” un gran papá por brindarme la posibilidad de estudiar, a todos por su cariño y apoyo incondicional.

A Manu por su amor, comprensión y su paciencia infinita.

A mis amigas, las de siempre y las que me dio la facultad en estos años de carrera, por estar siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	9
-Generalidades de levaduras	
-Flora nativa de la uva	10
-Levaduras No- <i>Saccharomyces</i>	13
-Identificación molecular de levaduras a nivel de especie y subespecie	16
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
<u>Microbiología:</u>	
<u>Aislamiento de levaduras nativas:</u>	
-Selección y procesamiento de las uvas	
-Aislamiento y Purificación	25
<u>Biología Molecular:</u>	25
-Extracción de ADN en gran escala	
-Amplificación por PCR de la región ribosomal D1/D2	26
-Discriminación de individuos dentro de una misma especie utilizando el método TRtRNA	27
-Análisis de ADN en geles de agarosa	28
<u>Bioinformática:</u>	29
-Discriminación de especies,	
-Diferenciación de individuos dentro de una misma especie	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO I	56
ANEXO II	57

Resumen

RESUMEN

Las levaduras del género *No-Saccharomyces* constituyen el 99% de la flora nativa de la uva. Aunque la especie *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) es la que predomina y completa el proceso de fermentación, el aporte de ciertas cepas *No-Saccharomyces* durante las primeras etapas de la misma, es de gran importancia ya que producen aromas deseables y enzimas capaces de liberar aromas ligados mejorando así el “bouquet” del vino final. Mediante la realización de fermentaciones mixtas, combinando levaduras *S. cerevisiae* con cepas seleccionadas *No-Saccharomyces*, es posible mejorar la complejidad aromática del vino final y su estructura en boca. Por otro lado, algunas de estas cepas *No-Saccharomyces* podrían desempeñar un papel clave en el control biológico de fitopatógenos en uvas y otras frutas.

Este trabajo consistió en el aislamiento e identificación, a nivel de especie, de levaduras nativas *No-Saccharomyces* presentes en uvas. A partir de diferentes vendimias y variedades de vid, se lograron aislar un total de 165 aislamientos con morfologías diferentes en el medio diferencial WLN. Se aislaron sus ADNs y se amplificaron y secuenciaron las regiones ribosomales variables D1/D2, a partir de las cuales fue posible identificar 25 especies *No-Saccharomyces*, pertenecientes a diez géneros diferentes. También se encontraron cepas de *S. cerevisiae* y por lo tanto se discute cual sería la metodología más apropiada para evitar el aislamiento de esta especie. Para un grupo de once cepas de la especie *Hanseniaspora guilliermondii* (*H. guilliermondii*) se realizó una discriminación molecular a nivel de sub-especie, evidenciando que se trataba de individuos diferentes.

Introducción y Antecedentes

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Generalidades de levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares, organismos eucariotas pertenecientes al reino Fungí, dentro del cual se clasifican mayoritariamente en el phylum Ascomycota, por su característica básica que consiste en la presencia de ascos. Los ascos son células en forma de saco que contienen ascosporas. Este phylum cuenta con aproximadamente 64.000 especies conocidas (Kirk *et al.*, 2008), de las cuales a la fecha hay 430 especies con su genoma completo en la base de datos del NCBI. Se trata del mayor phylum de hongos y uno de los más diversos dentro de los eucariotas. Sus especies se encuentran en numerosos nichos ecológicos y prácticamente en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos (Schoch *et al.*, 2009).

La morfología de las levaduras puede determinarse mediante observación al microscopio óptico. Normalmente son ovales, esféricas o cilíndricas, con un diámetro promedio de unas 10 μm .

Su reproducción puede ser sexuada o asexuada. La gemación es un proceso de reproducción asexual en el cual la célula progenitora multiplica y reparte sus constituyentes celulares con una célula hija. La esporulación es un tipo de reproducción sexuada, en el que una célula diploide normal da lugar a dos ascos que contienen cuatro ascosporas haploides. Las ascosporas pueden ser de tipo “a” o “alpha”. La unión de una célula haploide “a” con una “alpha” da lugar a una célula diploide normal, las haploides del mismo sexo pueden unirse dando lugar a diploides anormales (Madigan *et al.*, 2003). En particular, muchos Ascomycota son conocidos sólo por los estados de reproducción asexual, haciendo difícil su ubicación filogenética basándose en criterios morfológicos.

Flora nativa de la uva

Las levaduras juegan un rol central en el proceso de fermentación durante la vinificación, proporcionando un efecto directo sobre la calidad del vino final, tanto en relación a mejoras aromáticas como a la complejidad aportada (Mercado *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007).

La calidad del vino es una consecuencia de la diversidad y composición de microorganismos, además de la dinámica y frecuencia con la que éstos aparecen (González *et al.*, 2006).

Es por esta razón que resulta indispensable conocer la flora autóctona presente. Se ha reportado que la composición de las levaduras presentes en la uva depende de muchos factores tales como la ubicación geográfica del viñedo, el ambiente propio en el que se encuentra, el tipo de suelo, la edad del viñedo, el tipo de uva y su grado de maduración. Además se ha demostrado que ciertas cepas están plenamente adaptadas a un entorno climático específico (Francesca *et al.*, 2009). Es preciso conocer esta información, dado que algunos enólogos consideran que únicamente se obtienen buenos resultados con levaduras seleccionadas procedentes de la micro-zona donde se producen los vinos. Según González *et al.*, (2006) no existe correlación entre la variedad o el origen de la uva, y el número de levaduras. Y en concordancia con lo mencionado anteriormente, las diferencias en la densidad de población en uvas estarían relacionadas con diferencias en las condiciones climáticas de donde proceden las uvas.

En otro estudio realizado por Francesca *et al.*, (2009) en el que se muestrearon uvas en diferentes condiciones, ya sea de racimo sano, como de fruto picoteado por aves, o de uvas tomadas del suelo, de manera de obtener un panorama general de la biodiversidad presente, se encontró una alta biodiversidad de especies de

levaduras entre las cuales aparecen especies de los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, y *Zygosaccharomyces*. Estas levaduras No-*Saccharomyces* están presentes durante las primeras etapas de la fermentación, dada su baja tolerancia al etanol y su limitada capacidad para fermentar los azúcares presentes en los mostos. Al continuar el proceso de fermentación estas especies son reemplazadas naturalmente por *S. cerevisiae*, que se ve incrementada de forma proporcional con la concentración de etanol (Gonzalez. *et al.*, 2006; Francesca *et al.*, 2009).

Las levaduras presentes en las primeras etapas de la fermentación son las que confieren las características enológicas de las regiones productoras de vino (Pretorius *et al.*, 1999).

El uso de levadura seca activa en la fermentación se está convirtiendo en una de las prácticas más comunes en la elaboración del vino, ya que garantiza un producto reproducible, además de reducir la fase de retardo y el riesgo de alteración del vino. Sin embargo la comunidad vitivinícola se ve ampliamente dividida acerca de esta práctica debido a la creencia generalizada de que las cepas de levaduras nativas dan un estilo distintivo y de calidad al producto final. De hecho el uso de levadura seca activa reduce el número de diferentes cepas autóctonas debido a la imposición de la competencia entre levaduras desde el arranque de la fermentación (Beltran *et al.*, 2002). Además, la mayoría de las cepas comerciales disponibles en el mercado, generalmente necesitan de la adición de sales de amonio, debido a que ellas no han sido adaptadas a las condiciones naturales de muchas uvas provenientes de viñedos de alta calidad, que poseen entre 100 y 250 mgN/L de Nitrógeno asimilable (Carrau 2003). Actualmente se está tratando de disminuir

la adición de nitrógeno, ya que su exceso puede ser riesgoso tanto para la salud como para la producción de calidad (Medina *et al.*, 2007). A continuación se enumeran algunas de las razones por las que debe evitarse el exceso de Nitrogeno: 1) formación de compuestos de riesgo para la salud humana como el etil-carbamato, 2) incremento de aminoácidos residuales tales como histidina precursor de histamina (Lonvaud-Funel 2006), 3) un exceso de nitrógeno residual facilita la contaminación de los vinos durante la maduración, con cepas de levaduras del tipo *Brettanomyces*, 4) el exceso de nitrógeno conlleva a fermentaciones alcohólicas más rápidas y demandan más energía para el enfriamiento de los mostos-vinos con la consiguiente pérdida de aromas durante el proceso, y 5) el incremento en la adición de amonio, cambia el perfil típico de los aminoácidos presentes en variedades tales como Sauvignon Blanc y algunas tintas, cambiando y/o alterando la tipicidad varietal (Carrau 2003). Por otro lado, es sabido que aplicaciones de la misma cepa de levadura comercial en diferentes regiones del mundo, lleva a la obtención de vinos con características comunes, limitando la diversidad de estilos de elaboración. Algunos enólogos consideran que éste es un punto débil de la tecnología de elaboración de vinos, por lo que actualmente el interés está focalizado hacia la producción de vinos con un estilo único, con la mínima manipulación y evitando el uso de aditivos. Esto es posible empleando uvas con óptima concentración de los productos claves necesarios para alcanzar estabilidad y calidad: altos niveles de polifenoles y azúcares y bajos pH. La composición de las uvas es determinante en los componentes de la fermentación, a su vez el viñedo tiene el potencial de influenciar sobre la composición de las uvas y en última instancia en la composición del vino, que

alternadamente puede ser afectado también por los microorganismos nativos que intervienen en el proceso. Todo esto forma parte de una estrategia que se conoce como “Enología de Mínima Intervención” (EMI) (Ramey 1995; Carrau 2003). Para llevar a cabo esta estrategia se ideó un método que apunta a la selección de nuevas generaciones de cepas de levaduras adaptadas a la EMI (Carrau *et al.*, 2005; Carrau 2005; Medina *et al.*, 2005; Rabosto *et al.*, 2006).

Por todo lo anterior, resulta indiscutible la importancia que tiene conocer la biodiversidad de levaduras presente en la uva, para poder hacer un buen uso de las mismas y mejorar la calidad del producto final.

Levaduras No-Saccharomyces

Las levaduras No-Saccharomyces constituyen el 99% de la flora nativa de la uva. Estas levaduras juegan un papel relevante en el impacto metabólico y la complejidad del aroma del producto final. (Ciani *et al.*, 2010).

La fermentación comienza por el crecimiento de especies de varios géneros de No-Saccharomyces como por ejemplo, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces*, pero su crecimiento se limita a los primeros dos o tres días de fermentación, luego del cual mueren.

Durante las etapas tempranas de fermentación, las levaduras de baja fermentación No-Saccharomyces producen algunas reacciones importantes en el mosto que mejoran el sabor del vino final (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998).

La contribución de estas levaduras al sabor del vino es específica de la especie y de la cepa, dado que se relaciona con sus características metabólicas particulares (más específicamente con el metabolismo secundario), incluyendo la capacidad de secreción de las enzimas y metabolitos con impacto en el aroma de los vinos, la producción de glicerol, la liberación de manoproteínas, la baja acidez volátil, o contribuciones a la estabilidad del color del vino (Gonzalez *et al.*, 2013).

Los compuestos terpenicos liberados en el procesamiento de la uva, representan la mayor parte de los aromas disponibles en la uva, que contribuyen a las características de calidad del vino final (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998).

Es importante conocer el potencial de producción de enzimas extracelulares de las levaduras nativas de interés para la vinificación, que sean capaces de alterar ciertos componentes de los mostos y así mejorar los atributos sensoriales del vino. Las pectinasas, proteasas y glucosidasas son algunas de las enzimas secretadas por estas levaduras, con interés para la vinificación, debido a sus efectos tecnológicos y su contribución a la formación de aroma.

Las enzimas pectinolíticas escinden largas cadenas de pectina en segmentos de cadena cortos más solubles, que facilitan el prensado de las uvas y contribuyen a la clarificación de los mostos. Mientras el mosto está en contacto con las pieles de la uva, puede aumentar la extracción de sustancias que contribuyen al color y aroma, además de mejorar la filtración de los vinos.

Las proteínas que están presentes en las uvas en cantidades variables, son otro componente que al igual que los polisacáridos aumentan la turbidez de los mostos y vinos. Su hidrólisis enzimática en pequeñas moléculas que contienen nitrógeno más soluble

(pequeños péptidos y aminoácidos), es otra solución técnica para los problemas que influyen en la clarificación y estabilización de los mostos y vinos. También ayuda a prevenir fermentaciones incompletas debido a una deficiencia de nitrógeno asimilable en el mosto.

Los terpenos y demás sustancias volátiles como alcoholes de cadena lineal y cíclicos, por nombrar sólo unos pocos, ayudan a mejorar el aroma del vino. Estos compuestos volátiles, están presentes en forma libre en las uvas o en forma conjugada unido principalmente a moléculas de azúcar para formar complejos glucosídicos no volátiles e inodoros. Las glucosidasas escinden los precursores de aromas ligados de las moléculas de azúcar contribuyendo así a la percepción del aroma del vino (Fernández *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Ganga y Martínez (2003) se llevó a cabo una identificación molecular de 151 levaduras No-*Saccharomyces* y se analizó la producción de enzimas extracelulares, dando como resultado que un 70% de los aislamientos presentaba alguna actividad enzimática.

En la actualidad, se sabe que el proceso de fermentación es más complejo de lo que se pensaba anteriormente, y que durante las primeras etapas de la fermentación, las especies de levaduras No-*Saccharomyces* desempeñan papeles importantes en el impacto metabólico y la complejidad aromática del producto final, dando paso luego, a las levaduras de la especie *S.cerevisiae*, que predominan y completan el proceso. En los últimos años, ha habido una demanda creciente para mejorar la composición química y las propiedades sensoriales del vino. Es por esta razón que se ha propuesto la inclusión de levaduras No-*Saccharomyces* junto con

cepas *S. cerevisiae* para la realización de fermentaciones mixtas, como una herramienta aplicable a las nuevas tecnologías de fermentación. Por lo tanto, es de suma importancia el conocimiento de las interacciones fisiológicas y metabólicas entre levaduras *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces* durante la fermentación del vino (Ciani *et al.*, 2010).

En un estudio reciente de Maturano *et al.*, (2012) se pudo comprobar el alto valor de al menos cinco actividades enzimáticas al final de la vinificación. Esto indica que estas enzimas probablemente no se ven afectadas por las condiciones presentes en las últimas etapas de la fermentación.

Otro objeto de estudio en estos últimos años se ha centrado en la búsqueda de alternativas para los fungicidas sintéticos, debido a la preocupación por la contaminación (ambiental y del producto final) y a los posibles mecanismos de resistencia que se puedan seleccionar en los agentes patógenos debido a un uso continuado. En un estudio de Rabosto *et al.*, (2006) se comprobó que algunas cepas No-*Saccharomyces* presentan alta capacidad antagónica frente al hongo fitopatogénico *Botrytis cinerea*.

Por lo tanto, aquellas cepas que resulten buenas controladoras de fitopatógenos, y además aporten aromas deseables al vino, podrían utilizarse como agentes de control biológico a nivel del campo.

Identificación molecular de levaduras a nivel de especie y subespecie

La identificación de levaduras se basa comúnmente en el estudio de la morfología celular y reacciones bioquímicas distintivas en un conjunto estandarizado de pruebas de fermentación y asimilación.

Estas pruebas bioquímicas tienen la desventaja de ser pruebas laboriosas y muchas veces ambiguas debido a la variabilidad de las cepas. Es por ello que se utiliza, cada vez más, técnicas moleculares para su identificación (Kurtzman & Robenett 1998). Estas técnicas comprenden, comparaciones moleculares, secuenciación, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Bruns *et al.*, 1991) y ADN polimórfico amplificado al azar (Hadrys *et al.*, 1992).

En este trabajo se aplicó el método descrito por Kurtzman & Robnett (1998) en el cual las relaciones filogenéticas entre las levaduras se analizan mediante las divergencias en el dominio variable D1/D2 de la subunidad 26S del ADN ribosomal. Las divergencias en este dominio son suficientes para resolver las distintas especies. Los datos indican que la mayoría de las especies de levadura pueden ser identificadas de esta manera (Kurtzman & Robenett, 1998). Se trata de un método reproducible y sencillo.

Considerando las diferentes aplicaciones tecnológicas que se han descrito para las diferentes cepas de levaduras No-*Saccharomyces* dentro de una misma especie, ya sea la mejora de la calidad del vino final, en cuanto a su aroma, gusto, textura, o como fuentes potenciales de nuevas enzimas, además del papel que cumplen ciertas cepas como agentes de control biológico de fitopatógenos, resulta importante conocer que individuo dentro de una especie puede cumplir tales roles.

Para discriminar individuos dentro de una misma especie, para la cual aún no existen datos genómicos, se procedió tal como se describe en el trabajo de Barquet *et al.*, (2012) en el que se diseñó un método de PCR reproducible que combina oligonucleótidos basados en repetidos en tándem con un segundo oligonucleótido basado en una región conservada de un ARN de transferencia

específico para Ascomycetos. Este método se basa en que las repeticiones en tándem se encuentran dispersas al azar en todos los genomas eucariotas y los genes de ARN de transferencia están conservados y se encuentran presentes en múltiples copias en diferentes cromosomas.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un relevamiento general de la biodiversidad de especies de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en uvas maduras.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar a nivel de especie levaduras nativas No-*Saccharomyces* presentes en uvas maduras.
- Discriminar a nivel de subespecie un grupo de levaduras pertenecientes a la especie *Hanseniaspora guilliermondii*.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron técnicas de diferentes disciplinas, como Microbiología (técnicas de aislamiento, medios de cultivos selectivos, diferenciales), Biología Molecular (extracción de ADN, electroforesis, geles de agarosa, PCR a gran escala) y herramientas de Bioinformática (análisis de secuencias, bases de datos).

Microbiología

Aislamiento de levaduras nativas

-Selección y procesamiento de las uvas

Las muestras se tomaron de viñedos de la zona de Canelones, Uruguay (Canelones constituye la zona vitivinícola del Uruguay, que alberga al 80% de los productores de uvas del país). Se tomaron cinco uvas sanas al azar de diferentes racimos en vendimias de los años 2011, 2012 y 2013, de las variedades Tannat, Merlot, Tempranillo, Cabernet Franc, Petit Verdot, Arinarnoa y Cabernet Sauvignon. No se muestrearon uvas de los bordes de la plantación. El muestreo se hizo por la mañana y las uvas fueron cuidadosamente recolectadas, colocadas en bolsas de nylon conservadas en refrigerador hasta su uso. Las muestras de uva se trasladaron hasta el laboratorio de la Sección Enología de Facultad de Química, donde se procedió a realizar los aislamientos microbiológicos. Los microorganismos se aislaron mediante molienda manual por dos procedimientos diferentes, los cuales se indican con las letras G o F en el código de cada cepa. El método G (de “grape”) consiste en la molienda de los granos en un mortero estéril con 10mL de solución salina estéril, agitando durante 2 minutos y a continuación, realizando diluciones seriadas en solución

salina. El método F (de “fermentación”) consiste en el aislamiento a partir del mosto en fermentación desde el día cero hasta una densidad del mosto de 1030. La toma de muestras y los aislamientos de los años 2011 y 2012 fueron realizados por el personal de la sección Enología de la Facultad de Química. Mi participación en estas actividades se limitó al año 2013.

Con las diluciones obtenidas se realizaron siembras en superficie en un medio diferencial WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient) (Pallmann *et al.*, 2001) (Anexo). Este medio de cultivo permite una discriminación primaria, de forma rápida, en base a la morfología y color de la colonia. Las colonias de *S. cerevisiae* muestran un color crema a verdoso y tienen una superficie suave, opaca, con consistencia cremosa. En cambio, por ejemplo, las colonias de *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*) tienen un color verde intenso, con superficie lisa, opaca y con una consistencia mantecosa (Pallmann *et al.*, 2001). El principio diferencial de este medio de cultivo, se basa en el reactivo verde de bromocresol, que actúa como colorante diferencial.

Las placas sembradas se incubaron a 25°C durante 48hs.

Hasta este punto el procedimiento fue exactamente igual en los tres años. En el año 2011 el aislamiento no fue enfocado exclusivamente a las levaduras del género *No-Saccharomyces*, sino que se aislaron todas las levaduras que fueron capaces de crecer en el medio de cultivo.

Para el año 2012, el procedimiento se afinó y el objetivo se centró en las levaduras *No-Saccharomyces*.

Transcurrido el tiempo de incubación, aquellas colonias que no presentaban apariencia de *S. cerevisiae* se repicaron en un medio

diferencial Agar Lisina (Fowell 1965) (Anexo) que permite una discriminación aproximada entre especies *S. cerevisiae* y No-*Saccharomyces* debido a que contiene lisina como única fuente de nitrógeno y *S. cerevisiae* no es capaz de metabolizarla. Las placas se incubaron a 25°C durante 96 horas. Luego de crecidas las colonias, se volvió a realizar un repique en el mismo medio de cultivo para confirmar que sean No-*Saccharomyces*. En un primer repique puede haber crecimiento de *S. cerevisiae* que aún conserva una reserva de aminoácidos que le permita crecer en cualquier medio. Por lo tanto se consideran No-*Saccharomyces*, a aquellas cepas que crecen en este medio luego de dos repiques consecutivos (Carrau Magariños, 2005).

Este procedimiento se llevó a cabo en la vendimia del año 2012, el cual se hizo de manera exhaustiva, aislando todas aquellas colonias que crecieron de la siembra en superficie en WLN con una morfología diferente. Para el siguiente año de vendimia (2013) se simplificó el aislamiento, debido a que ya se contaba con un registro “histórico” detallado de las características morfológicas de las colonias de distintas especies. En base a este registro fue posible aislar directamente del medio WLN colonias de *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Issatchenkia*, etc. sin necesidad de realizar el paso de siembra en Agar-Lisina.

Las levaduras se conservaron en medio de cultivo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2%) que es un medio nutriente. Se incubaron durante 48hrs, y luego de su crecimiento se guardaron en heladera a 4°C para su uso. Para su mantenimiento a largo plazo, las colonias se resuspendieron en glicerol (15%) y se congelaron a -80°C.

-Aislamiento y Purificación

Con el objetivo de obtener colonias aisladas se utilizó el método de aislamiento en placa por estrías. Consiste en cargar el ansa con la muestra y descargarla en un borde de la placa, a continuación se quema el ansa para esterilizarla, se deja enfriar y girando la placa 90° se hacen estrías paralelas tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente; por ultimo quemando nuevamente el ansa y volviendo a girar la placa se estría el resto de la superficie sin sembrar.

Para obtener cultivos puros se toma una única colonia suficientemente crecida y aislada del resto, a partir de la cual se vuelve a aplicar el mismo método de aislamiento mencionado anteriormente, en una nueva placa con el mismo medio de cultivo. De esta manera nos aseguramos que el cultivo obtenido finalmente sea puro.

Biología Molecular:

-Extracción de ADN en gran escala

Se puso a punto un método de extracción de ADN simplificado para trabajar a gran escala, basado en el descrito por Jubany *et al.*, 2008.

Se tomaron unas 15 colonias aisladas de una placa fresca con medio de cultivo YPD y se resuspendieron en 80µL de buffer de lisis (Triton X-100 2%, dodecil sulfato de sodio 1%, NaCl 100mM, Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM). Las células se homogenizaron por vortexeado a alta velocidad durante 3 minutos con 0,06g glassbeads (Sigma G9268) y 80µL fenol equilibrado con Tris pH 8. Luego se agregaron 80µL de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8) y se vortexeo brevemente. Se llevó a centrifuga 5 minutos a 20°C 15.000 xg. La fase acuosa obtenida del centrifugado se transfirió a otro eppendorf limpio. El ADN se precipitó invirtiendo el tubo con 320µL de etanol

absoluto. Se volvió a centrifugar y esta vez se descartó el sobrenadante y se lavó el “*pellet*” con 160µL de etanol 70%. Tras un último paso de centrifugación se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se secó el “*pellet*” en bomba de vacío. El pequeño “*pellet*” secado se resuspendió en 40µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM). Se verificó la calidad y cantidad de ADN en gel de agarosa 0,7%.

-Amplificación por PCR de la región ribosomal D1/D2

Se realizó PCR a gran escala utilizando pipetas multicanal (con las puntas recomendadas por el fabricante) y preparando los mix de PCR en placas de 96.

La discriminación de especies se realizó según lo descrito por Kurtzman & Robnett (1998). Se amplificó la región variable D1/D2 de la subunidad 26S del ADN ribosomal, utilizando los oligos NL-1 y NL-4 (Tabla 1). La mezcla de reacción de PCR contenía: 20µL de ADN genómico (2ng/µL), 10µL 10X Taq buffer, 10µL de cebador (5µM NL1-NL4), 10µL dNTPs (2mM), 10µL MgCl₂ 25mM, 2,5µL (Taq DNA polimerasa) en un volumen final de 100µL. El programa de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación de cebadores a 56°C por 2 minutos, y extensión a 72°C por 2 minutos), con un fase final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Posteriormente se realizó un gel de agarosa 1% para cuantificar el producto de PCR obtenido.

-Discriminación de individuos dentro de una misma especie utilizando el método TRtRNA

Este método ideado por Barquet *et al.* (2012) para discriminar levaduras No-*Saccharomyces* a nivel de subespecie consiste en una reacción de PCR que utiliza dos juegos de cebadores: TtRNASc combinado con ISSR-MB o con 5CAG (Tabla 1). El programa de PCR se realizó en termociclador Thermo PXE 0.2. La mezcla de reacción de PCR contenía: 5µL ADN genómico (3ng/µL), 5µL 10X Taq buffer, 5µL de cada juego de oligo (5µM ISSR-MB/tTRNASc o 5CAG/tTRNASc), 5µL dNTPs (2mM), 10µL MgCl₂ (25mM) 2,5µL (Taq DNA polimerasa) en un volumen final de 50µL. El programa de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación de cebadores a 50°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 90 segundos), con un fase final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa 2% tal como se describe en Barquet *et al.* (2012).

Se emplearon para esta discriminación, 11 cepas pertenecientes a la especie *H. guilliermondii*, 10 de ellas se aislaron en la vendimia del 2012 y una fue una cepa perteneciente a la colección de Enología, Facultad de Química.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Temperatura de "annealing" (°C)
NL-1	CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	61,8
NL-4	GTCCGTGTTTCAAGACGG	59,5
TtRNASc	GCTTCTATGGCCAAGTTG	53,9
ISSR-MB	CTCACAACAACAACAACA	49,3
5CAG	CAGCAGCAGCAGCAG	51,6

Tabla 1. Cebadores utilizados en este trabajo.

-Análisis de ADN en geles de agarosa

Para verificar la calidad y estimar la cantidad de ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 07% incluyendo un marcador de peso molecular adecuado (lambda/HindIII). Para la corrida se utilizó el buffer TAE 1X (Tris 40mM pH 7.6, Ácido acético 20mM, EDTA 1mM), y se empleó un voltaje de 80V.

Según la concentración estimada en el gel se diluyen los ADNs a una concentración aproximada de 2ng/μL. Se mantienen a -20°C para su posterior uso en la reacción de PCR.

Se prepara otro gel de agarosa, pero esta vez 1% para cuantificar los productos de PCR, se incluyó el mismo marcador anteriormente utilizado lambda/HindII, el mismo buffer (TAE) y mismo voltaje (80V). Verificando de esta manera que la concentración total de producto de PCR sea 1-2μg, como es requerida por MacroGen para la secuenciación.

Los productos de PCR obtenidos por el método TRtRNA se separan en geles de agarosa 2%, un gel para cada par de cebadores. Se incluyó el marcador de peso molecular 2-Log DNA ladder de New England Biolabs. Se empleó el mismo buffer de corrida TAE y un voltaje menor de 50V. El patrón de bandas obtenido en estos geles se analizó mediante el programa Gel Compare para la discriminación a nivel de subespecie.

Bioinformática:

-Discriminación de especies

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en MacroGen, Corea. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante Blastn en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para discriminar las especies.

-Diferenciación de individuos dentro de una misma especie

A partir de los geles obtenidos, es posible discriminar individuos dentro de una misma especie utilizando el software package Gel Compare II versión 6.5 (Applied Maths). Este software permite evaluar el grado de diversidad genética mediante el análisis de conglomerados (cluster analysis). Una vez alineados los carriles correspondientes a cada cepa, se calculó la matriz de distancia que nos indica la similitud genética, usando el coeficiente de DICE (matriz basada en las bandas) y se realizó el análisis de agrupamiento, o sea la clasificación jerárquica, mediante el promedio aritmético no ponderado (UPGMA).

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de levaduras nativas:

Las muestras tomadas en las vendimias de los años 2011, 2012 y 2013 se procesaron tal como se describe en la sección Materiales y Métodos y las diluciones de los mostos obtenidos se sembraron en WLN para una discriminación primaria a nivel de especie de acuerdo a su morfología (Figura 1).

En la vendimia del año 2011 el procedimiento no fue minucioso sino que se aislaron todas las colonias diferentes que crecieron sin enfocar a las No-*Saccharomyces*, a diferencia de lo realizado en las siguientes vendimias. En 2012 se aislaron todas las colonias con diferente morfología, y aquellas colonias que no presentaban apariencia similar a la observada para *S. cerevisiae* se inocularon en el medio diferencial Agar-Lisina. Se realizaron dos repiques consecutivos para asegurar que solo crezcan levaduras No-*Saccharomyces*, tal como se observa en la Figura 2. Para la vendimia del 2013 se decidió eliminar este último paso dado que ya existía un entrenamiento previo que permitía reconocer las características morfológicas de las colonias No-*Saccharomyces* pudiendo hacer un aislamiento directamente del medio de cultivo WLN.

De esta manera se lograron obtener un total de 165 aislamientos con morfologías diferentes y provenientes de diferentes variedades de uvas (Anexo).

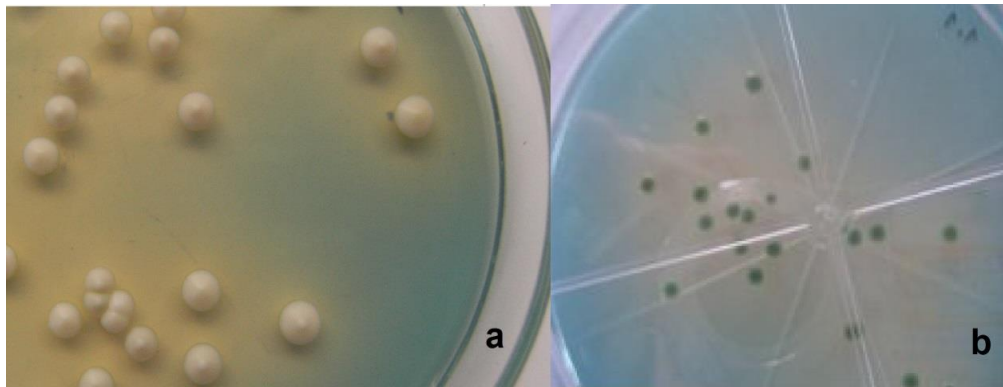


Figura 1. Placas de referencia donde se ven las diferencias de color y morfológicas de las distintas levaduras en el medio de cultivo WLN **a-** *Saccharomyces cerevisiae* **b-** *Hanseniaspora uvarum*.

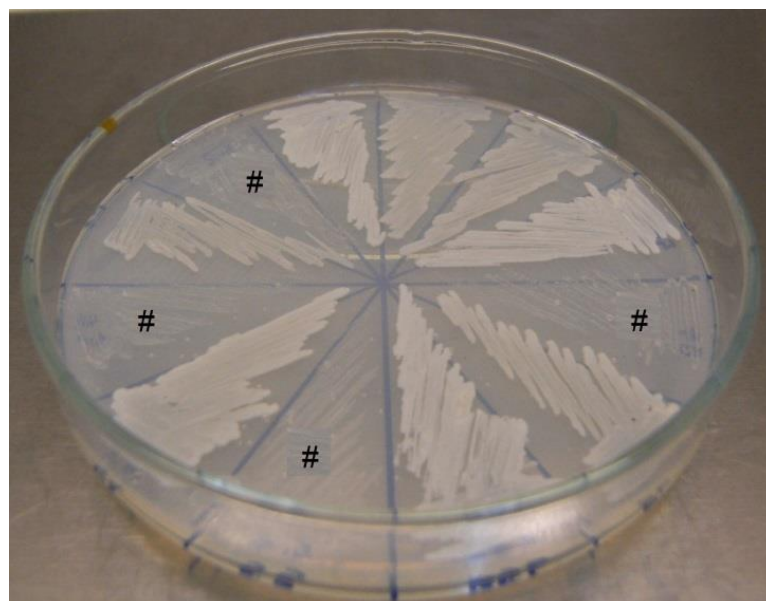


Figura 2. Ensayo de crecimiento en medio diferencial Agar-Lisina. Se observan las estrias de crecimiento de levaduras No-*Saccharomyces* y con el símbolo # se indican las zonas de la placa donde se estriaron cepas de *S.cerevisiae* que no son capaces de crecer en este medio.

Extracción de ADN en gran escala:

Se extrajo el ADN de los 165 aislamientos mediante un protocolo simplificado para trabajar a gran escala tal como se describe en Materiales y Métodos.

Con los ADNs obtenidos se corrió un gel de agarosa 0,7% para verificar su calidad y estimar su cantidad, utilizando lambda/HindIII como marcador de peso molecular (Figura 3)

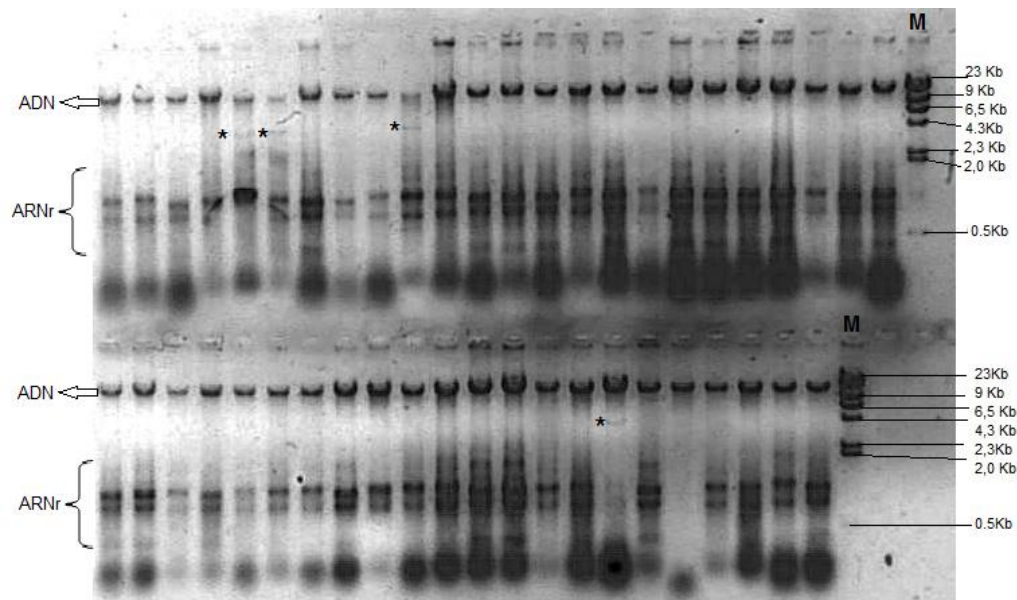


Figura 3. Estimación de la calidad y cantidad de ADN obtenido. Los ADNs de cada aislamiento se separaron en un gel de agarosa 0.7%. **M** indica el marcador de peso molecular utilizado, que fue lambda/HindIII. Con la flecha se indica la región donde migran los ARNs ribosomales. Con asterisco a la altura de la banda 4.3 kb del marcador, se indica las bandas que probablemente correspondan al ARN de doble cadena lineal, presente en muchas copias en algunas levaduras y/o al plásmido de 2 μ m.

De acuerdo a la intensidad de las bandas, comparadas con la intensidad del marcador, se estimó la cantidad de ADN obtenido en la extracción y se prepararon las diluciones adecuadas de manera de tener 2ng/μL requeridos para la reacción de PCR.

Es posible apreciar que además de la banda de ADN de alto peso molecular se observan ARNs ribosomales y en algunos casos ARNs de doble cadena lineal comúnmente presentes en muchas copias en algunas cepas, el mismo codifica para toxinas “killer” en muchos casos. También puede verse más tenue el plásmido críptico de 2 μm (para el cual no se conoce una función) que migra parecido al lineal dsRNA (Guthrie y Fink, 1991).

Se obtuvo un amplio rango de concentraciones de ADN que variaron entre 5 y 70ng/μL, y puede destacarse que para las levaduras de la especie *S. cerevisiae*, las concentraciones obtenidas de ADN no superaron los 30ng/μL. Mientras que para las levaduras *No-Saccharomyces* las concentraciones de ADN obtenidas se encuentran distribuidas en todo el rango observado (5 y 70ng/μL).

Amplificación por PCR de la región ribosomal D1/D2

Para la discriminación de especies se siguió el protocolo descrito por Kurtzman & Robnett (1998) utilizando los oligos NL-1 y NL-4.

En todos los casos se obtuvo un único producto de PCR, los mismos se cuantificaron en un gel de agarosa 1% utilizando el marcador de peso molecular lambda/HindIII como referencia, con el fin de verificar que se obtuvo la cantidad suficiente requerida por MacroGen para la secuenciación (1-2μg) (Figura 4).

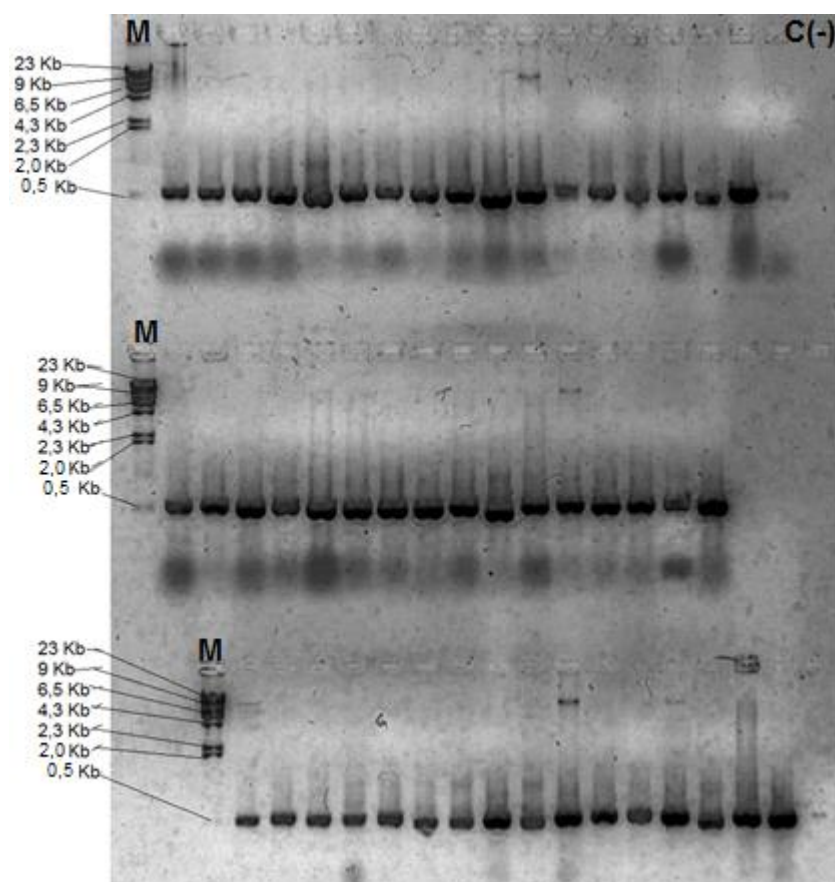


Figura 4. Estimación de la calidad y cantidad obtenida en cada producto de PCR. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1%. M indica el marcador de peso molecular utilizado lambda/HindIII. C(-) indica el control negativo sin el agregado de ADN.

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a Macrogen, Corea donde se purificaron y secuenciaron. Las secuencias resultantes se analizaron por Blastn en la base de datos de NCBI para discriminar especies. En la Tabla 2 se muestran las distintas especies encontradas y las cantidades relativas correspondientes.

Se lograron identificar 26 especies diferentes, 25 de las cuales fueron, No-*Saccharomyces*. Una especie que no esperábamos encontrar fue *S.cerevisie*. Las especies No-*Saccharomyces* identificadas en este trabajo también han sido reportadas por otros autores como parte de la flora nativa presente en uvas de diferentes regiones del mundo (Francesca *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

La especie *H. uvarum* es notoriamente abundante entre las levaduras No-*Saccharomyces*, su presencia se observa no solo en mayor proporción, sino que también aparece en todas las variedades estudiadas. *H. uvarum* se ha reportado en otros trabajos, junto con *Kloeckera* (su forma anamorfa) como parte de las especies predominantes en las uvas, representando aproximadamente un 50-75% de la población total de levaduras (Pretorius 2000; Li *et al.*, 2010; Jolly *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2006; Francesca *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Li *et al.*, (2010), en el que las variedades analizadas fueron Cabernet Sauvignon, Merlot y Chardonnay, el género, *Issatchenkia* se detectó sólo en las variedades tintas Cabernet Sauvignon y Merlot. Por lo que nuestro resultado, con respecto a este género se ajusta a los obtenidos por estos autores dado que logramos aislarla de las mismas variedades, además de encontrarla en Tannat y Arinarnoa que también son variedades tintas.

Metschnikowia es otro género muy frecuentes en nuestro trabajo lo que concuerda con resultados obtenidos por Gonzalez *et al.*, (2006) y Francesca *et al.*, (2009).

Metschnikowia y *Hanseniaspora* son de los géneros más comúnmente encontrados en los viñedos y son las que predominan en las primeras etapas de la fermentación (Rosini *et al.*, 1982).

Las otras especies aparecen en proporciones mucho más bajas, menores al 10%. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por otros autores (Rosini *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2010).

Para la explicación de cómo fue posible que aparecieran 11 levaduras *S. cerevisiae*, es importante destacar que cuatro de estos 11 aislamientos provienen de la vendimia del año 2011, en la cual el aislamiento no se enfocó en el género *No-Saccharomyces*, sino que se aislaba todo lo crecía, por lo que es razonable que dentro de las levaduras aisladas del año 2011 aparezcan *S. cerevisiae*. Por otra parte, una de ellas fue aislada el día 12 de fermentación, tiempo más que suficiente para que predomine esta especie que es la que completa el proceso de fermentación (Gonzalez *et al.*, 2006; Francesca *et al.*, 2009). De las otras tres cepas no tenemos datos del día de fermentación en que fueron aisladas. Las siete restantes provienen de la vendimia del año 2013, año en el que, el proceso de aislamiento fue simplificado, al eliminarse la etapa de sembrado en agar-lisina. Al sortear esta etapa pudo producirse un error, aislando colonias *S. cerevisiae*. Además vale la pena resaltar que de las siete cepas *S. cerevisiae* de la vendimia 2013, seis de ellas se aislaron el tercer día de fermentación y una del segundo día de fermentación. Está descrito que en el proceso de fermentación es común encontrarlas luego de transcurridos los primeros días del proceso (Gonzalez *et al.*, 2006; Francesca *et al.*, 2009).

Sin duda entonces, si nuestro objetivo es aislar solamente levaduras No-*Saccharomyces*, el mejor procedimiento a llevar a cabo es el empleo del medio de cultivo agar-lisina, dado que en la vendimia del año 2012 que fue en el que se empleó este medio, no aparecieron cepas *S. cerevisiae*.

Especie	Aislamientos	%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	1
<i>Candida azyma</i>	1	1
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	1	1
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	1	1
<i>Pichia occidentalis</i>	1	1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1	1
<i>Metschnikowia fructicola</i>	1	1
<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	1	1
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	1	1
<i>Metschnikowia koreensis</i>	1	1
<i>Saccharomycete sp</i>	1	1
<i>Candida californica</i>	2	1
<i>Zygoascus meyeriae</i>	2	1
<i>Candida zemplinina</i>	2	1
<i>Lachancea thermotolerans</i>	2	1
<i>Hanseniaspora vineae</i>	2	1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	3	2
<i>Candida sp.</i>	3	2
<i>Issatchenkia orientalis</i>	4	2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	5	3
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	10	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	7
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	24	15
<i>Issatchenkia terricola</i>	25	15
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	58	35

Tabla 2. Especies de levaduras encontradas, el número de aislamientos correspondientes y sus cantidades relativas.

Diferenciación de individuos dentro de una misma especie

La diferenciación de individuos se realizó tal como lo describe Barquet *et al.*, (2012) y se aplicó para un grupo reducido de 11 levaduras pertenecientes a la especie *H. guilliermondii*, diez de las mismas se aislaron en la vendimia del año 2013 y una pertenece a la colección de aislamientos de Enología, en Facultad de Química.

Se eligió esta especie para el estudio, en primer lugar porque contábamos con un número de aislamientos considerable y en segundo término porque nos interesaba elegir una especie con la que se puedan realizar ensayos con interés biotecnológico en un futuro con el fin de mejorar la calidad del vino.

Las cepas de las especies *H. uvarum* e *Issatchenkia terrícola* en general no confieren buenos aromas a los vinos. Estudios realizados por Jolly (2006) revelaron que *H. uvarum* es capaz de producir altos valores de acidez volátil, lo que resulta perjudicial para la característica sensorial del vino. Un trabajo publicado por Clemente-Jimenez *et al.*, (2004), en el que también se estudiaron los perfiles volátiles para *Issatchenkia*, se encontró que esta especie no solo muestra bajas características fermentativas sino que posee una alta producción de acetato de etilo (222 mg/L), concentración por encima del límite de 150mg/L, a partir del cual produce un sabor avinagrado desagradable. Las cepas de la especie *M. pulcherrima* no se consideraron ya que fueron estudiados previamente por Barquet *et al.*, (2012). En estudios llevados a cabo por distintos autores se demostró que diferentes cepas *H. guilliermondii* son buenas productoras de ésteres de acetato como acetato de etilo, 2-feniletil acetato, acetato de geranilo y acetato de isoamilo (Rojas *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2008). La opinión generalizada es que la producción de ésteres durante la fermentación del vino contribuye positivamente a

la percepción sensorial, ya que estos compuestos son importantes componentes del sabor del vino y otras bebidas alcohólicas derivadas de la uva. También se ha visto que la capacidad de producir ésteres está estrechamente relacionada con la especie en particular de levadura implicada (Viana *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2001). En un trabajo publicado por Medina *et al.*, (2013) se prepararon microvinificaciones en mosto de uva tinta, para medir los índices espectrofotométricos de color y polifenoles, para 11 levaduras distintas del género *Hanseniaspora*. Los valores obtenidos de las medidas realizadas, llevaron a las levaduras de la especie *H. guilliermondii* a estar entre las cinco *Hanseniasporas* preseleccionadas, que además resultó poseer una buena capacidad fermentativa.

Por todo lo antedicho se decidió discriminar a nivel de subespecie el conjunto de cepas de la especie *H. guilliermondii*.

El objetivo de este ensayo fue detectar diferencias en los genomas de estos aislamientos que permitan discriminar individuos, para ello se realizaron dos PCR con diferentes juegos de oligos que amplifiquen distintas regiones. Cada aislamiento arrojó un patrón de banda característico (Figura 5) que luego fue analizado con el programa Gel Compare para construir un dendograma (Figura 6).

El dendograma muestra que este método de PCR TRtRNA fue capaz de discriminar exitosamente las 11 cepas como individuos diferentes, algunos más cercanos que otros, por ejemplo las cepas provenientes de la variedad de uva Tannat están próximas entre sí, como las dos provenientes de la variedad Tempranillo. Esto sugiere que dentro de cada variedad de uva se crea un microambiente tal que las levaduras presentes de la misma especie poseen características genotípicas cercanas.

Puede observarse en la Figura 5 que para el Mix 1 en el que se utilizaron los oligos ISSR-MB/TtRNASc, el patrón de bandeo es menor que para el Mix 2, en el que los oligos utilizados fueron 5CAG/TtRNASc. Esto se aparta de los resultados obtenidos para *Metschnikowia pulcherrima* en el estudio realizado por Barquet *et al.*, (2012), en el cual el Mix 1 mostró un patrón de bandeo mayor que el Mix 2. Esto evidencia que los mismos oligos amplifican patrones de bandas diferentes según la especie.

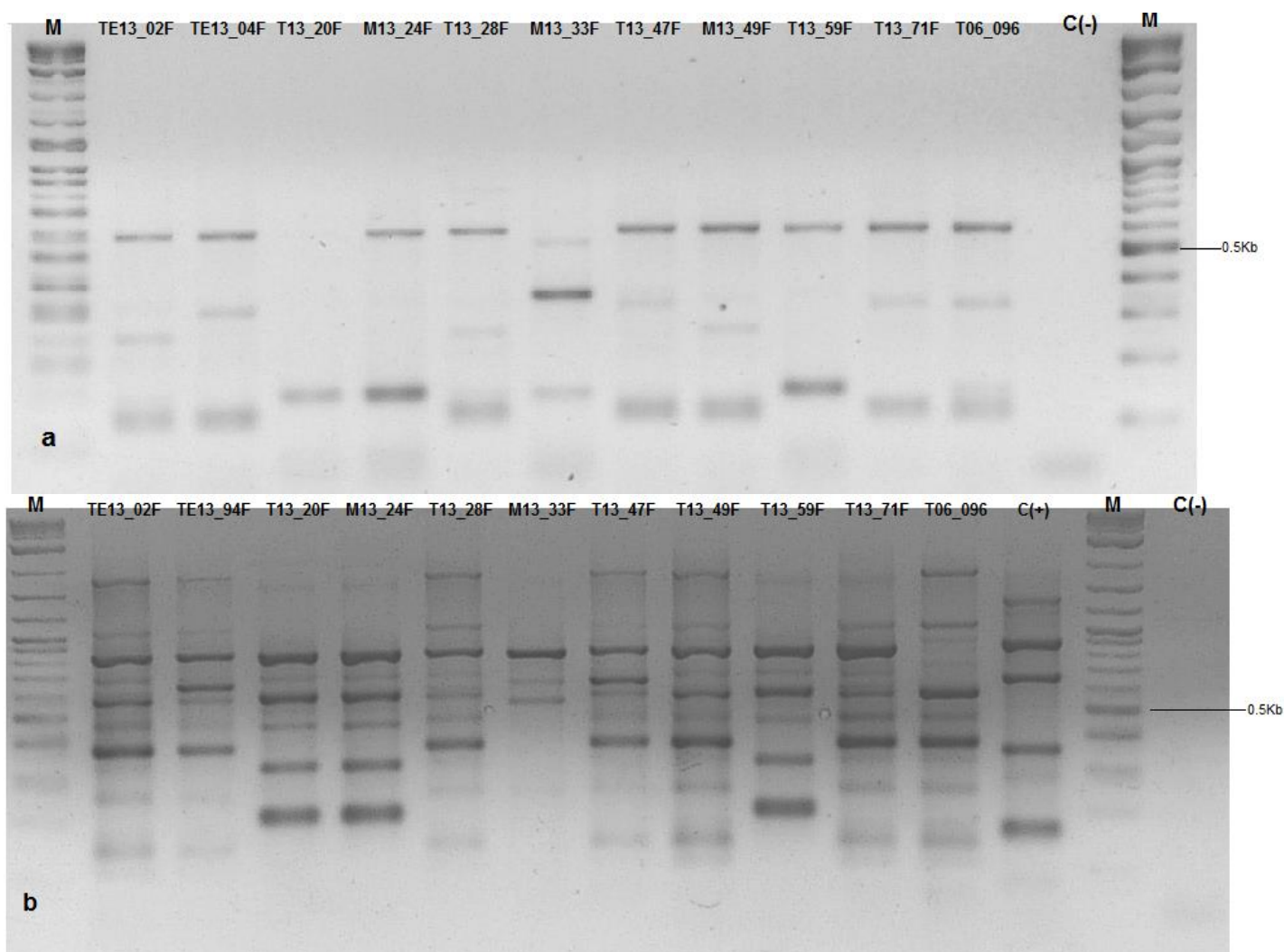


Figura 5. Discriminación molecular de cepas de la especie *H. guilliermondii* utilizando el metodo de PCR TRtTRNA. Se muestra el patrón de bandas obtenido al amplificar el ADN de cada cepa con la siguiente combinación de oligos **a)** ISSR-MB y TRtTRNASc, **b)** 5CAG y TRtTRNASc. **M** indica el marcador de peso molecular utilizado que fue el 2-Log DNA ladder de New England Biolabs. **C(-)** indica el control negativo de PCR sin el agregado de ADN. En la parte b) quedo incluido un ADN utilizado como C+ que no es de una cepa *H. guilliermondii*.

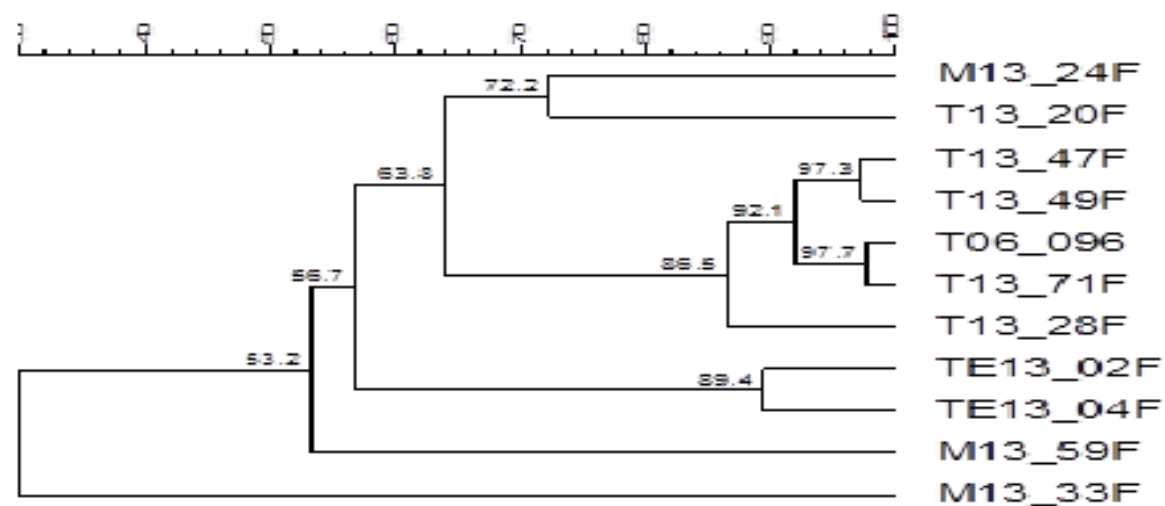


Figura 6. Dendrograma que representa el análisis filogenético, muestra 11 genotipos diferentes. M: Merlot, T: Tannat, TE: Tempranillo; 13:2013; 06: 2006.

Conclusiones y Perspectivas

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con respecto a los resultados obtenidos en el aislamiento puede concluirse que si el objetivo está enfocado en la obtención de levaduras No-*Saccharomyces* únicamente, el mejor procedimiento es el realizado en la vendimia del año 2012, en el cual luego de aislar las colonias en el medio WLN, se utilizó el medio agar lisina que permite el crecimiento solamente de levaduras No-*Saccharomyces*. Mediante un doble repique es posible asegurar que se obtienen las levaduras buscadas, esto se evidencia observando los resultados, dado que en esta vendimia no se obtuvieron otras levaduras que no fuesen No-*Saccharomyces*. En cambio en las otras vendimias, de los años 2011 y 2013 en las que no se utilizó este medio, si aparecieron levaduras *S. cerevisiae*.

De las levaduras No-*Saccharomyces* presentes en la flora nativa se observó una gran diversidad de especies, dentro de las cuales se destaca una marcada predominancia de algunas especies respecto de otras. *Hanseniaspora* fue el género que predominó en primer lugar, seguido de *Metschnikowia* e *Issatchenkia*.

Para poder contar con un panorama realmente global de la biodiversidad de levaduras presentes se podría extraer el ADN total presente en las uvas, amplificar la región D1/D2 y mediante secuenciación masiva determinar todas las especies presentes y su proporción relativa. De esta forma no se limitaría el análisis a las levaduras cultivables en las condiciones del ensayo y también se podrían detectar especies presentes en baja proporción.

Finalmente, es posible concluir que dentro de la especie *H. guilliermondii* existen varias subespecies (al menos 11). Es

importante conocer la diversidad dado que cada una de ellas podría desempeñar un papel relevante y diferente en la fermentación.

Como perspectivas futuras se propone la evaluación de estos aislamientos para su aplicación industrial, analizando por ejemplo:

- La posibilidad de realizar fermentaciones mixtas con estas cepas para la producción de vinos finos con características sensoriales únicas

- El uso de estas cepas como posibles agentes de biocontrol de fitopatógenos tanto a nivel del campo como en poscosecha

- La evaluación de la capacidad de estas cepas de producir enzimas extracelulares de interés enológico.

Otra perspectiva futura será ampliar estos ensayos a levaduras endófitas, teniendo en cuenta que varios estudios recientes han revelado el gran potencial de los endófitos como una fuente importante de compuestos biológicamente activos, con prometedoras aplicaciones medicinales y agrícolas (Shi *et al.*, 2012). También se han aislado levaduras endófitas de interés para la producción de biocombustibles (Vajzovic *et al.*, 2012).

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Barquet M.; Martin V.; Medina K.; Perez G.; Carrau F.; Gaggero C (2012) Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. Appl Microbiol Biotechnol 93:807-814
- Beltran G.; Torija MJ.; Novo M.; Ferrer N.; Poblet M.; Gillamon JM.; Rozes N.; Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. Syst Appl Microbiol 25:287-293
- Bruns TD.; White TJ.; Taylor JW (1991) Fungal Molecular Systematics. Annual Rev Ecol Syst, Vol. 22. Pp. 525-564
- Carrau F (2003) Caracterización de levaduras en relación a su habilidad para utilizar el nitrógeno. Estudios de compuestos aromáticos en vinos. Tesis de Doctorado en Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Carrau FM (2005) Levaduras nativas para Enología de Mínima Intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. Agrociencia, 9: 387-399
- Carrau Magariños M (2005). Evaluación de la capacidad antagónica de microorganismos aislados de la uva frente a hongos patógenos: *Botrytis spp.*, *Plasmopara viticola*, *Penicillium spp.* Y *Monilinia spp.* Informe de Pasantía. Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

- Ciani M.; Comitini F.; Mannazzu I.; Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res 10:123-133
- Clemente-Jimenez JF.; Mingorance-Cazorla L.; Martinez-Rodriguez S.; Las Heras-Vazquez FJ.; Rodriguez-Vico F (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol 21:149–155
- Esteve-Zarzoso B.; Manzanares P.; Ramon D.; Querol A (1998) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. Int Microbiol 1:143-148
- Fernandez M.; Ubeda JF.; Briones AI (2000) Typing of non-*Saccharomyces* yeast with enzymatic activities of interés in wine-making. Int J Food Microbiol 59:29-36
- Fowell RR (1965) The identification of wild yeast colonies on lysine agar. J Appl Bacteriol 28:373-383
- Francesca N.; Chiurazzi M.; Romano R.; Aponte M.; Settanni L.; Moschetti G (2009) Indigenous yeast communities in the environment of “Rovellobianco” grape variety and their use in comercial White wine fermentation. World J Microbiol Biotechnol 26:337-351

- Ganga MA.; Martinez C (2003) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. J Appl Microbiol 96:76-83
- Gonzalez R.; Quiros M.; Morales P (2013) Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. Trends in Food Sci Technol 29:55-61
- Gonzalez SS.; Barrio E.; Querol A (2006) Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain) J Appl Microbiol 102:1018-1025
- Guthrie C.; Fink GR. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology. Vol 194. Academic Press, INC.
- Hadrys H.; Balick M.; Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol Ecol 1:55-63
- Jolly NP.; Augustyn OPH.; Pretorius IS (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. S Afr J Enol Vitic, Vol. 27, No. 1
- Jubany S.; Tomasco I.; Ponde de Leon I.; Medina K.; Carrau F.; Arrambide N.; Naya H.; Gaggero C (2008) Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Yeast Res 8:472-484

Kirk PM.; Cannon PF.; Minter DW.; Stalpers JA (2008) Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi, 10th ed. Wallingford (UK): CAB International.

Kurtzman CP.; Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *A Van Leeuwenhoek* 73:331-371

Li SS.; Cheng C.; Li Z, Chen JY.; Yan B.; Han BZ.; Reeves M (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J Food Microbiol.* 138: 85-90

Lonvaud-Funel L 2006. Biogenic Amines in Wine. The Role of Lactic Acid Bacteria, Anticipation and Possible Control. Edited by California State University. Proc Int Wine Microbiology Symposium, Tenaya Lodge, CA, USA. April 4-5, p 71-75.

Madigan MT.; Martinko JM.; Parker J (2003) Biología de los Microorganismos: Brock 10^a ed. Pearson

Maturano PY.; Rodriguez LA.; Toro ME.; Nally MC.; Vallejo M.; Castellanos LI.; Combina M.; Vazquez F (2012) Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 155:43-50

Medina K.; Gonzalez J.; Carrau M.; Fariña L.; Capra A.; Perez G.; Gambaro A.; Boido E.; Dellacassa E.; Carrau FM (2005) Aplicación

de levaduras No-Saccharomyces para obtener mayor complejidad en vinos tintos de alta gama. X Cong. Latin. Vitic. Enol. 7-11 de noviembre, Bento Gonçalves. Brasil.

Medina K.; Fariña L.; Capra A.; Perez G.; Ferreri L.; Coniberti A.; Jubany S.; Boido E.; Disegna E.; Gaggero C.; Dellacassa E.; Henschke PA.; Carrau FM.; (2007) Impacto del uso de levaduras nativas seleccionadas en la Enología de Mínima Intervención. Enología, V.:1, p.: 45-58

Medina K.; Boido E.; Barquet M.; Gaggero C.; Dellacassa E.; Carrau F.; (2013) Levaduras del género *Hanseniaspora*: impacto sobre el contenido polifenolico de los vinos tintos. Enología, V.:10

Mercado L.; Dalcero A.; Masuella R.; Combina M (2006) Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. Food Microbiol 24:403-412

Pallman CL.; Brown JA.; Olineka TL.; Cocolin L.; Mills DA.; Bisson LF (2001). Use of WL Medium to profile native flora fermentations. Am J of Enol Vitic 52:198–203

Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approach estotheancient art of winemaking. Yeast 16:675-729

Pretorius IS.; Van der Westhuizen TJ.; Augustyn OPH (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. S Afr J Enol Vitic 20:61-74

- Rabosto X.; Carrau M.; Paz A.; Boido E.; Dellacassa E.; Carrau F (2006) Grapes and Vineyard Soils as Sources of Microorganisms for Biological Control of *Botrytis cinerea*. Am J Enol Vitic 57:332-338.
- Ramey D (1995) Low input winemaking-let nature do the work. In: Proc. Austr. WineIndust. Tech. Conf. C.S. Stockley, A.N. Sas, R.S. Johnstone and T.H. Lee (Eds.) pp 26-29, Adelaide, Australia.
- Rojas V.; Gil JV.; Piñaga F.; Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 70: 283–289
- Rosini G.; Federichi F.; Martini A (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. Microb Ecol 8:83–89
- Schoch CL *et al.*, (2009) The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. Syst. Biol. 58(2):224–239.
- Shi J.; Zeng Q.; Liu Y.; Pan Z. 2012. *Alternaria* sp. MG1, a resveratrol-producing fungus: isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production. Appl Microbiol Biotechnol. 95:369-379
- Vajzovic A.; Bura R.; Kohlmeier K.; Doty SL (2012) Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol on the prescence of inhibitors. J ind Microbiol Biotechnol 39:1453-1463

Viana F.; Gil JV.; Genove S.; Valle's S.; Manzanares P (2008) Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiol 25:778–785

Anexos

Anexo I

Composición de medios de cultivo

Medio Agar Lisina	g/L
Glucosa	44,5
Dihidrogeno fofato de potasio	1,78
Sulfato de magnesio	0,89
Cloruro de calcio fundido	0,178
Cloruro de sodio	0,089
Adenina	0,00178
DL-metionina	0,000891
L-histidina	0,000891
DL-triptofano	0,000891
Ácido bórico	0,0000089
Sulfato de Zinc	0,0000356
Molibdato de amonio	0,0000178
Sulfato de manganeso	0,0000356
Sulfato ferroso	0,0002225
Lisina	1
Inositol	0,02
Pantotenato de calcio	0,002
Aneurina	0,0004
Piridoxina	0,0004
Ácido p-aminobenzoico	0,0002
Ácido nicotínico	0,0004
Riboflavina	0,0002
Biotina	0,000002
Ácido fólico	0,000001
Agar	17,8

Medio WLN	g/L
Extracto de levadura	4
Tryptona	5
Glucosa	50
Dihidrogeno fosfato de potasio	0,55
Cloruro de potasio	0,425
Cloruro de calcio	0,125
Sulfato de magnesio	0,125
Cloruro férrico	0,0025
Sulfato de manganeso	0,0025
Verde bromocresol	0,022
Agar	15

Anexo II

Tabla de especies encontradas

Codigo	Especie	Codigo de cepa	Variedad de vid
T12_158G	<i>Candida azyma</i>	A	Arirarnoa
C12_207G	<i>Candida californica</i>	C	Cabernet Sauvignon
C12_207'G	<i>Candida californica</i>	CF	Cabernet Franc
T13_96F	<i>Candida sp.</i>	M	Merlot
M12_128_F	<i>Candida sp.</i>	PV	Petit Verdot
M12_132F	<i>Candida sp.</i>	TE	Tempranillo
C12_205G	<i>Candida zemplinina</i>	T	Tannat
T12_179G	<i>Candida zemplinina</i>		
T12_167G	<i>Hanseniaspora clermontiae</i>		
T13_20F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Codigo de cepa	Aislamiento a partir de
M13_24F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	G	Grape (uva)
T13_28F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	F	Fermentation (fermentacion)
CF13_33F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
T13_47F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
T13_49F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
M13_59F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
T13_71F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
TE13_02F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
TE13_04F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
T12_172G	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		
C12_208'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
M12_177G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		

Codigo	Especie
M12_177'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T11_204F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T12_161'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T12_220G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_175G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T11_225F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_71G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_22F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_26F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_37F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_40F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_58F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_70F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_57G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_57'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T12_161G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_175'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M12_37'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T12_141'F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
C12_203'G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
C12_203G	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
TE13_03F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_05F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_13F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_19F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

Codigo	Especie
M13_72F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_76F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_21F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_25F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
CF13_30F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_32F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_38F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_46F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
CF13_54F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_63F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_64F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_65F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_67F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_69F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
TE13_01F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_07F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_10F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_11F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_12F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_15F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_16F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M13_75F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
C13_77F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
C13_79F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
A13_83F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

Codigo	Especie
A13_87F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
PV13_88F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
PV13_92F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_97F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
T13_48F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
CF13_53F	<i>Hanseniaspora vineae</i>
A13_95F	<i>Hanseniaspora vineae</i>
M12_13F	<i>Issatchenkia orientalis</i>
M12_102F	<i>Issatchenkia orientalis</i>
M12_16"F	<i>Issatchenkia orientalis</i>
M12_16F	<i>Issatchenkia orientalis</i>
M12_66G	<i>Issatchenkia terricola</i>
C12_206G	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_67G	<i>Issatchenkia terricola</i>
T12_142'F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_31G	<i>Issatchenkia terricola</i>
C12_212G	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_89'F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_31'G	<i>Issatchenkia terricola</i>
C12_212'G	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_193F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_12F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_79F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T12_163G	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_36G	<i>Issatchenkia terricola</i>

Codigo	Especie
M12_12"F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_89F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T13_51F	<i>Issatchenkia terricola</i>
M13_60F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T13_68F	<i>Issatchenkia terricola</i>
C13_80F	<i>Issatchenkia terricola</i>
C13_82F	<i>Issatchenkia terricola</i>
A13_85F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T12_169G	<i>Issatchenkia terricola</i>
M12_12'F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T13_50F	<i>Issatchenkia terricola</i>
T12_171G	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
T13_14F	<i>Lachancea thermotolerans</i>
T13_17F	<i>Lachancea thermotolerans</i>
T13_66F	<i>Metschnikowia aff. Fructicola</i>
M13_73F	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>
CF13_55F	<i>Metschnikowia fructicola</i>
PV13_91F	<i>Metschnikowia koreensis</i>
M12_174'G	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_27'F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_93F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_78F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_27F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T12_160G	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T12_168G	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>

Codigo	Especie
M13_34F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_11"F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_88'F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M12_85F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PV13_89F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T13_27F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M13_35F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T13_39F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
CF13_43F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T13_52F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
M13_62F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
C13_81F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
A13_84F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
A13_86F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PV13_90F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PV13_93F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
PV13_94F	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
T12_162G	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
T12_154G	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
M13_74F	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
M12_102'F	<i>Pichia kudriavzevii</i>
M12_97F	<i>Pichia occidentalis</i>
M12_53G	<i>Rhodotorula glutinis</i>
T11_146'F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T11_207F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Codigo	Especie
M13_23F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T11_228F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T11_249F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T13_09F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T13_18F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CF13_56F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CF13_57F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M13_61F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T13_06F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C13_78F	<i>Saccharomycete sp.</i>
M12_215'F	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
M12_135F	<i>Zygoascus meyeræ</i>
M12_129F	<i>Zygoascus meyeræ</i>
M12_218F	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
T12_180G	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
M12_218'F	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
M12_70G	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
T13_42F	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>