

VCH-FC
Biotecnología
S165

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**MONITOREO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE FERMENTACIONES
VÍNICAS INOCULADAS.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Francisco José Salinas Sanhueza

Enero, 2008

Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Claudio Martínez Fernández.



**“MONITOREO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE FERMENTACIONES
VÍNICAS INOCULADAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FRANCISCO JOSÉ SALINAS SANHUEZA.

Dr. Claudio Martínez Fernández
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. Martínez', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Presidente Comisión

A horizontal line intended for a signature.

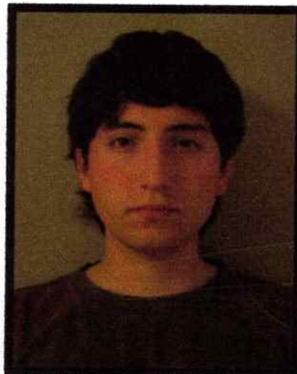
Dr. Marcelo Baeza Cancino
Profesor corrector

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Baeza', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, _____ 2008

BIOGRAFÍA

Yo, Francisco José Salinas Sanhueza nací el 18 de julio de 1983 en la ciudad de Santiago, Chile. Siendo el mayor de 3 hermanos, desde niño he vivido con mis padres quienes siempre me han apoyado. Estudie en el Colegio Simón Bolívar y posteriormente realice mi enseñanza media en el liceo Alexander Fleming, del cual egrese el año 2001 obteniendo el premio al mejor alumno del área científica y habiendo ganado 4 campeonatos de fútbol. El año 2002 ingrese a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. A través de los años en la Universidad y durante mi memoria de título tuve la oportunidad de conocer personas de una gran calidad humana, generando lazos de amistad que ojala perduren en el tiempo. Finalmente en enero del año 2008, a los 24 años, estoy terminado una de las etapas mas importantes de mi vida, estoy obteniendo un título profesional.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, Jaime Salinas Yañez y Pilar Sanhueza Dieguez quienes me han acompañado y apoyado en todas las etapas de mi vida.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Claudio Martínez y a la Dra. Maria Angélica Ganga, por darme la oportunidad y la confianza para realizar mi memoria de título en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile, y tener la oportunidad de conocer a un grupo de personas muy lindas con una excelente calidad humana y profesional. Entre ellas, me gustaría agradecer a Daniel Garrido, Carolina Carrasco y Liliana Godoy por su ayuda y amistad durante la realización de esta memoria de título. Finalmente, quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por su amistad y compañerismo, muchas gracias por los gratos momentos que compartimos.

Gracias

FINANCIAMIENTO

La memoria de titulo se realizo gracias al financiamiento del proyecto INNOVA N° 2044042 titulado “Desarrollo de Sistemas de Diagnostico Microbiológico para Vinos de Calidad”.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Levaduras en la industria vitivinícola.....	2
1.2. Selección de levaduras comerciales.....	5
1.3. Diferenciación de levaduras comerciales.....	6
1.4. PCR en tiempo real.....	10
2.- HIPÓTESIS.....	13
2.1. Hipótesis.....	14
3.- OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo General.....	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Cepas utilizadas.....	18
4.2. Medios de cultivos y extracción de DNA.....	20

4.3. Análisis RAPD-PCR de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4.4. Separación y purificación de los fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante RAPD-PCR.....	22
4.5. Amplificación, clonación y secuenciación de los fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante RAPD-PCR.....	22
4.6. Análisis de secuencias.....	24
4.7. Selección de secuencias intrónicas.....	24
4.8. Amplificación de secuencias intrónicas.....	24
4.9. Selección de secuencias de DNA mitocondrial.....	25
4.10. Amplificación del genoma mitocondrial.....	25
4.11. PCR en tiempo real para <i>S. cerevisiae</i>	26
5.-RESULTADOS.....	28
5.1. Definición de las cepas comerciales más utilizadas.....	29
5.2. Amplificación y secuenciación de intrones de <i>S. cerevisiae</i>	31
5.3. Análisis de las secuencias intrónicas.....	35
5.4. Amplificación y secuenciación de regiones del genoma mitocondrial.....	37
5.5. Análisis de secuencias del genoma mitocondrial.....	39
5.6. RAPD-PCR para <i>S. cerevisiae</i>	42
5.7. Análisis de secuencias especie y cepa específica.....	50
5.8. PCR en tiempo real para <i>S. cerevisiae</i>	53
6.- DISCUSIÓN.....	66
6.1. Secuencias Intrónicas.....	67
6.2. Secuencias del genoma mitocondrial.....	68

6.3. Secuencias especie y cepa específicas para <i>S. cerevisiae</i> mediante RAPD-PCR.....	69
6.4. PCR en tiempo real para <i>S. cerevisiae</i>	71
7.- CONCLUSIONES.....	75
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	77
9.- ANEXO.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de levaduras.....	19
Tabla 2. Partidores RAPD.....	21
Tabla 3. Volumen estimado anual de levadura comercial utilizado por las viñas.....	30
Tabla 4. Partidores diseñados para secuencias intrónicas.	33
Tabla 5. Partidores diseñados para la amplificación de regiones del genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	38
Tabla 6. Ubicación en el genoma nuclear de las secuencias amplificadas inespecíficamente en la reacción de PCR para la región intergénica 27812 del genoma mitocondrial.	41
Tabla 7. Fragmentos de DNA polimorficos especie específicos.	47
Tabla 8. Fragmentos de DNA polimórficos cepa específicos.	49
Tabla 9. Ubicación en el genoma de <i>S. cerevisiae</i> de las secuencias cepa específicas obtenidas.....	51
Tabla 10. Partidores y sonda de hidrólisis diseñados para el PCR en tiempo real de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	55
Tabla 11. Reproducibilidad del PCR en tiempo real para DNA plasmidial.....	60
Tabla 12. Cuantificación de levaduras en muestras de vino mediante conteo en placa y PCR en tiempo real.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amplificación por PCR de los intrones YDR064, YIL148 e YLR287.....	34
Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias para el intrón YLR287.....	36
Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias para el intron ai5a del gen <i>cox1</i>	40
Figura 4. RAPD-PCR para las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con el partidor R12...43	
Figura 5. RAPD-PCR para las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con el partidor R14...44	
Figura 6. RAPD-PCR para las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con el partidor R03...45	
Figura 7. RAPD-PCR para las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con el partidor R01...46	
Figura 8. Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida con el partidor R06 seleccionada como específica para la cepa comercial EC1118.....	52
Figura 9. Posición de los partidores y la soda en la secuencia de 170 pb obtenida con el partidor R12.....	56
Figura 10. Especificidad del PCR en tiempo real para <i>S. cerevisiae</i>	57
Figura 11. Amplificación por PCR en tiempo real de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	58
Figura 12. Productos de amplificación por PCR en tiempo real para <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 13. Curvas de amplificación para diluciones seriadas de cultivos puros de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> cepa EC1118.....	62
Figura 14. Curva de calibración para <i>S. cerevisiae</i> en cultivo puro, mosto y vino.....	63
Figura 15. Correlación entre métodos cuantitativos para <i>S. cerevisiae</i>	64

RESUMEN

Debido a que la principal especie responsable de la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, cepas de esta levadura son utilizadas frecuentemente en fermentaciones industriales. La inoculación en el mosto supone que ellas pueden imponerse sobre levaduras nativas y conducir la fermentación asegurando un adecuado comienzo y desarrollo del proceso, así como también la reproducibilidad del producto. Sin embargo, un problema microbiológico frecuente en la industria del vino se deriva de la no adaptación de las cepas comerciales a las condiciones del mosto, lo que se traduce en que la fermentación es conducida por levaduras nativas produciéndose una baja en la calidad del producto final. Además, otro problema microbiológico es la refermentación por *S. cerevisiae* en etapas posteriores a la fermentación alcohólica.

El PCR en tiempo real es una técnica cuantitativa y rápida que puede ser usada para determinar la cantidad de microorganismos en múltiples sustratos. El objetivo de este trabajo fue diseñar partidores y sondas específicos para *S. cerevisiae* y las principales cepas comerciales utilizadas por viñas en Chile con el propósito de establecer una metodología rápida y precisa para evaluar el desarrollo microbiológico de fermentaciones industriales. Con el fin de obtener secuencias de DNA específicas de cepas particulares que permitieran el diseño de partidores cepa específicos, se secuenciaron intrones del genoma nuclear y mitocondrial de 23 cepas. Los resultados obtenidos permitieron diferenciar cepas comerciales de *S. cerevisiae* pero no fue factible el diseño de partidores con las características buscadas. Como estrategia alternativa para resolver este problema, se utilizó la técnica de RAPD-PCR para

identificar fragmentos de DNA polimórficos especie y cepa específicos. La secuenciación de estos fragmentos de DNA polimórficos permitió obtener una secuencia específica para *S. cerevisiae*, sin embargo, no fue posible obtener secuencias específicas para cepas de esta especie. La secuencia especie específica obtenida permitió diseñar partidores y una sonda de hidrólisis para ensayos de PCR en tiempo real. La metodología desarrollada fue altamente reproducible, permitiendo la detección y cuantificación específica de *S. cerevisiae* en vinos con un límite de detección de 78 UFC/mL. El desarrollo de esta herramienta permitiría prevenir el riesgo de refermentación en vinos embotellados.

ABSTRACT

Because the main yeast responsible for alcoholic fermentation is *Saccharomyces cerevisiae*, strains of this yeast are frequently used as inocula during industrial fermentations. The inoculation of the musts supposes that this strain can impose and lead the fermentation assuring a suitable beginning and development of the process, as well as the reproducibility of the product's characteristics on the time. Nevertheless, a frequent microbiological problem in the wine industry is the not acclimatization of the commercial strains to the must conditions. This situation could be cause of the fermentation of the must by native yeasts, producing a loss in the quality of the final product. Another problem is the refermentation caused by *S. cerevisiae* at the end stages of the wine production process.

The real time PCR is a fast technique that can be used to the quantification of microorganisms in multiple substrates. The objective of this work was design specific primers and probes for *S. cerevisiae* and the main commercial strains used by Chilean wineries, with the aim of establishing a fast and accurate methodology to evaluate the microbiological development of industrial fermentations. With the purpose of obtaining specific DNA sequences for particular strains that would allow the design of strain specific primers, we sequenced introns from nuclear and mitochondrial genomes of 23 strains. The results obtained allowed the differentiation of *S. cerevisiae* commercial strains, but it was not feasible the design of primers with the wanted characteristics. As an alternative strategy to solve this problem, the RAPD-PCR technique was used to identify polymorphic fragments of DNA specific for species and strains. The

sequentionation of these polymorphic DNA fragments permitted to obtain a specific sequence for *S. cerevisiae*, nevertheless, it was not possible to obtain specific sequences for strain of this specie. The specie specific sequence obtained allowed to design primers and also a hydrolysis probe for real time PCR. The developed methodology was highly reproducible, allowing the detection and specific quantification of *S. cerevisiae* in wines, with a detection limit of 78 UFC/mL. The development of this tool would prevent the risk of refermentation in bottles wines.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Levaduras en la industria vitivinícola

La transformación del mosto de uva en vino es un proceso microbiológico complejo que involucra diferentes especies de levaduras y bacterias presentes en las uvas y en las instalaciones de las viñas (Bisson, 2004). Las levaduras de los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* y *Torulaspota* predominan en los estados tempranos de la fermentación y, con el incremento de la concentración de alcohol, el género *Saccharomyces* se convierte en la levadura dominante y principal responsable de la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000). Sin embargo, es necesario considerar que el género *Saccharomyces* lo componen varias especies, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la levadura más importante en la elaboración de vino.

El conjunto amplio de microorganismos que participan en la fermentación vínica es seleccionado naturalmente por sus características fisiológicas hasta predominar aquellas cepas que pueden adaptarse a las condiciones fermentativas particulares de dicha fermentación. Sin embargo, la incidencia de las diferentes levaduras dependerá de las condiciones del medio y de las condiciones operativas en que se desarrolle la fermentación. De esta manera, la distribución de estas especies varía a lo largo del proceso fermentativo, pudiéndose observar variaciones en los tipos de levaduras presentes en función de la etapa fitosanitaria del proceso.

La producción y uso de levaduras secas activas para adicionar al mosto es una práctica común en viticultura desde hace varias décadas (Querol y col, 1992). La selección de estas levaduras está determinada por la obtención de características enológicas deseadas, como alto poder fermentativo, resistencia a etanol, anhídrido

sulfuroso o temperatura. La incorporación de levaduras seleccionadas al mosto supone que ellas desplazan a las levaduras nativas y conducen la fermentación alcohólica, asegurando un comienzo y desarrollo adecuado de ésta, así como también dar reproducibilidad al producto a través del tiempo. Sin embargo, la falta de desarrollo de herramientas de análisis microbiológico altamente sensibles y que permitan diferenciar cepas entre sí, ha impedido profundizar en estudios relacionados con el desarrollo microbiológico de fermentaciones vínicas inoculadas. Los recientes avances en biotecnología han demostrado que, al contrario de lo que comúnmente se cree, no todas las fermentaciones vínicas inoculadas con levaduras son conducidas por éstas. Esteve-Zarzoso y col. (2001) encontraron que cepas nativas de *S. cerevisiae* estaban mejor adaptadas a las condiciones de fermentación que las cepas comerciales. En el mismo sentido Constantí y col. (1997) en un estudio de dos años observaron que la cepa inoculada en tanques de 1000 L no se impuso y, por el contrario, se impuso una cepa que fue usada el año inmediatamente anterior en esa bodega. De esta forma, la evidencia experimental sugiere que frecuentemente las levaduras propias de la región de producción, o establecidas en las bodegas, pueden desplazar a las levaduras inoculadas e imponerse en la fermentación impidiendo la acción de las levaduras seleccionadas sobre el producto final. Si bien en Chile no existen estudios en este sentido, antecedentes de nuestro laboratorio indican que el porcentaje de implantación de levaduras comerciales en mostos orgánicos de Isla de Maipo no supera el 60%.

En nuestro país no existe un registro detallado de las fermentaciones vínicas que presentan problemas en su desarrollo, como fermentaciones lentas o detenidas. Antecedentes en nuestro laboratorio indican que en el caso de una importante viña

nacional que presentaba fermentaciones con características propias de una fermentación enlentecida la cepa usada como inóculo no superó el 50% de implantación. Una encuesta realizada por nuestro laboratorio a 22 viñas nacionales permitió determinar que la fermentación alcohólica lenta o parada de fermentación es uno de los problemas microbiológicos de mayor importancia. Las paradas de fermentación, normalmente atribuidas a problemas relacionados a carencias nutritivas del mosto, se traducen en una baja o nula actividad fermentativa por parte de las levaduras inoculadas, las cuales no pueden imponerse en la fermentación y terminan siendo excluidas de esta por otros microorganismos presentes en el mosto. En este mismo sentido, algunos investigadores han planteado que en estos casos la levadura utilizada no posee las características fisiológicas adecuadas para desarrollarse en dichos mostos en particular (Bisson y col, 2002).

Por otra parte, la posibilidad de una nueva fermentación durante la maduración del vino en barricas o botellas es producto de la sobrevivencia de la levadura por largo tiempo después de la fermentación alcohólica y esto se traduce en una baja en la calidad del vino que es afectado por este fenómeno. Esta situación es conocida como refermentación y es producida principalmente por dos especies: *S. cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii* (Divol y col, 2006). Algunos autores han sugerido que la capacidad de sobrevivir de *S. cerevisiae* después de la fermentación alcohólica se debe a que permanece en un estado celular viable pero no cultivable (VBNC) (Bleve y col, 2003). El estado celular viable pero no cultivable se utiliza para definir a las células que han perdido la capacidad de expresar genes pero que pueden posteriormente volver a un estado cultivable (Del Mar Lleó y col, 2000). Alternativamente, define a las células que

son metabolitamente activas pero incapaces de entrar en división celular para crecer en medio líquido o agar (Oliver, 2000). Las células en VBNC se caracterizan por un menor tamaño celular y cambios en la composición de la membrana y pared celular (McDougald y col, 1998). En este mismo sentido, Divol y Lonvaud-Funel (2005) determinaron que meses después de la fermentación alcohólica es posible encontrar en el vino a las especies *S. cerevisiae*, *Candida stellata*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Z. bailii*, concluyendo que estas especies son capaces de sobrevivir en un estado viable pero no cultivable durante la maduración del vino y que la refermentación del vino se debe probablemente a que estas especies son capaces de salir de este estado.

1.2. Selección de levaduras comerciales.

S. cerevisiae en su forma haploide tiene 12-13 Mb de DNA nuclear distribuido en 16 cromosomas lineales que contienen aproximadamente 6000 genes y una baja cantidad de intrones (Querol y col, 2003). Las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son en su mayoría diploides homocigotas (Bradbury y col, 2006) con polimorfismos en sus cromosomas dados por la recombinación de transposones Ty o secuencias repetidas subteloméricas (Querol y col, 2003).

Las cepas comerciales de *S. cerevisiae* derivan de colectas de levaduras nativas que han sido evaluadas por sus capacidades fisiológicas y seleccionadas en base a características específicas como: tolerancia al alcohol, tolerancia al dióxido de sulfuro, reproducibilidad de la fermentación, azúcar residual en baja concentración, baja producción de sulfuro de hidrógeno, producción de ésteres deseables, capacidad de

controlar e imponerse en diversas condiciones de fermentación, tolerancia a otros microorganismos y mínimo impacto sobre las características de la variedad de la uva (Bisson, 2004). Además, deben ser capaces de soportar diversos factores de estrés en el mosto como la alta osmolaridad inicial (22-26% de azúcar), alta concentración de etanol (11-17%), bajo pH (3,0-3,9), competencia de otros organismos, baja cantidad de nutrientes (nitrógeno), alta temperatura y presencia de compuestos inhibitorios como el acetato. Si la cepa comercial no es capaz de adaptarse a las condiciones de estrés del mosto la fermentación será asumida por otra levadura, provocando que la fermentación sea lenta e incluso que se detenga, produciendo en todos los casos una baja en la calidad del vino.

1.3. Diferenciación de levaduras comerciales.

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido diferenciar y caracterizar cepas de *S. cerevisiae* destacando entre estas el RAPD-PCR, amplificación de secuencias intrónicas, RFLP-mtDNA, microarreglos de DNA y genotipificación por SNPs (polimorfismos de un nucleótido). En la técnica de RAPD-PCR se realiza una amplificación al azar del genoma utilizando un partidor corto (8-10 pb). Los fragmentos amplificados proveen un alto número de loci, algunos de ellos polimórficos, que hacen del RAPD-PCR una técnica muy útil para diferenciar especies con baja variabilidad genética (Fernández-Espinar y col, 2003). El RAPD-PCR también ha sido utilizado para diferenciar cepas de una misma especie, sin embargo, la diferenciación de cepas es dependiente del partidor utilizado y, por lo general, es necesario el uso de varios

partidores (Couto y col, 1996; Andrighetto y col, 2000). Las principales ventajas de esta técnica son la pequeña cantidad de DNA que utiliza como molde, es simple, relativamente rápida y de bajo costo. La principal desventaja es la baja reproducibilidad de los patrones de bandeo obtenidos de la amplificación, esto se asocia principalmente a amplificación inespecífica producto de las bajas temperaturas de hibridación.

Otra aplicación del PCR para la diferenciación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* es la amplificación de secuencias intrónicas del genoma. En *S. cerevisiae* las secuencias de corte y empalme son altamente conservadas, sin embargo, la secuencia intrónica es altamente variable observándose sustituciones, inserciones o escisiones. El diseño de partidores con un extremo 5' similar al sitio de corte y empalme permite la amplificación de algunos intrones del genoma, observándose bandas polimórficas que permiten diferenciar cepas comerciales (de Barros Lopes y col, 1996). En el mismo sentido, las diferencias en el número y posición de los intrones en el gen *cox1* hace que la amplificación de estos intrones permita diferenciar cepas comerciales de *S. cerevisiae* (López y col, 2003).

El DNA mitocondrial (mtDNA) en *S. cerevisiae* tiene un tamaño de 85,8 Kb y codifica para 8 genes. El genoma circular se caracteriza por un bajo contenido de G + C (17-18%) y la mayor parte corresponde a secuencias intergénicas e intrones (Foury y col, 1998; Groth y col, 2000). Entre diferentes especies de *Saccharomyces* existen diferencias en el ordenamiento de los genes, así como también hay diferencias en los tamaños de las secuencias intergénicas y presencia o ausencia de intrones (Langkjaer y col, 2003). En *S. cerevisiae* las secuencias intergénicas contienen pequeñas zonas ricas en G + C asociadas a recombinación (Piskur y col, 1998) donde recaen la mayoría de

los sitios de corte de las enzimas de restricción, esto sugiere que son altamente variables y podrían explicar los polimorfismos encontrados en RFLP-mtDNA. Otro factor de variabilidad del genoma mitocondrial en *Saccharomyces* es el alto grado de polimorfismo que se produce en la fermentación con el aumento de la concentración de alcohol, lo cual incluso puede producir la pérdida del DNA mitocondrial. El RFLP-mtDNA es una técnica donde el DNA mitocondrial es cortado con enzimas de restricción y el producto de la digestión es visualizado en geles de agarosa. La alta variabilidad del genoma mitocondrial hace del RFLP-mtDNA la herramienta mas utilizada para la diferenciación de cepas comerciales vínicas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar y col, 2001).

La técnica de microarreglos de DNA se basa en la hibridación de DNA en pequeños chips donde esta impreso un DNA de origen conocido. El uso de microarreglos de DNA y otras técnicas de expresión génica han permitido conocer la expresión de genes asociados al proceso fermentativo en *S. cerevisiae*, determinando que los genes relacionados a estrés y diversos tipos de transportadores son altamente expresados durante la fermentación (Pérez-Ortín y col, 2002; Varela y col, 2005; Pérez-Torrado y col, 2005). En el mismo sentido, Cavalieri y col. (2000) determinaron mediante microarreglos de DNA que el 6% del genoma de *S. cerevisiae*, aproximadamente 378 genes, aumentan por lo menos dos veces su nivel de expresión durante la fermentación. Los microarreglos de DNA no solo ha permitido conocer la expresión de genes asociados a la fermentación sino también diferenciar cepas comerciales de *S. cerevisiae* realizando hibridaciones de genomas completos (Dunn y col, 2005), logrando determinar que las diferencias entre cepas se deben al aumento en

el número de copias o escisiones de genes relacionados a transportadores de hexosas, transportadores de metales y genes involucrados en la respuesta a drogas.

La genotipificación de cepas de *S. cerevisiae* también permite diferenciarlas. La secuenciación de 147 genes en 30 cepas distintas demostró la existencia de 554 SNPs con una frecuencia promedio de 1 SNP cada 150 pb (Ben-Ari y col, 2005). Esto, al igual que los microarreglos de DNA, indica que aunque las cepas de *S. cerevisiae* son distintas estas tienen genomas altamente similares.

El desarrollo de las técnicas moleculares descritas no solo ha permitido diferenciar cepas comerciales de *S. cerevisiae*, sino que también ha permitido comprobar durante la fermentación la imposición de la levadura comercial inoculada así como su efectividad como responsable del vino producido (Querol y col, 1992; Esteve-Zarzoso y col, 2001; López y col, 2003). Sin embargo, este tipo de metodologías tiene un tiempo de respuesta lento, lo cual hace este tipo de control difícil de realizar durante una fermentación vínica que demora entre 10 y 21 días.

En este sentido el desarrollo de una metodología rápida y precisa podría ayudar a controlar la evolución de las fermentaciones vínicas para evitar detenciones, demoras o si otra cepa de la especie *S. cerevisiae* esta tomando el control de la fermentación. Es decir, monitorear las fermentaciones para comprobar que la levadura inoculada se está desarrollando según lo esperado y que la fermentación llegará a término correctamente, para así posibilitar la toma de decisiones oportunas que permitan corregir situaciones anormales a tiempo.

1.4. PCR en tiempo real.

Teóricamente, una reacción de PCR tiene tres fases. i) fase exponencial, la cantidad de producto aumenta exponencialmente y la eficiencia de la reacción es alta; ii) fase lineal, la cantidad de producto aumenta de forma lenta debido a que los componentes de la reacción se comienzan a consumir; iii) fase estacionaria, la reacción se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotan. Posteriormente, el producto de PCR es visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa cuando la reacción esta en fase estacionaria.

El PCR en tiempo real (QPCR) permite detectar de forma instantánea la cantidad de producto formado en la reacción permitiendo observar la cinética de la reacción y obtener resultados cuantitativos, puesto que teóricamente existe una correlación entre la cantidad inicial de DNA molde y el ciclo en el cual la reacción de PCR entra en fase exponencial.

La detección del producto de PCR en QPCR se realiza mediante tres formatos: "SYBR green", sondas de hibridación y sondas de hidrólisis. El "SYBR green" es una molécula que se une al surco mayor del DNA de doble hebra y emite fluorescencia a una longitud de onda de 540 nm. En una reacción de QPCR la detección con "SYBR green" se produce al final de la etapa de extensión, donde la mayor parte del producto de PCR se encuentra en forma de doble hebra. Este formato de detección es muy sensible, es el más económico y muy usado en ensayos rápidos de detección de productos de PCR. Sin embargo, es inespecífico puesto que se une a cualquier DNA de doble hebra como por ejemplo los dímeros de partidor, produciendo una

sobreestimación de la cantidad de producto de PCR. Por otro lado, la detección mediante sondas de hibridación está basada en la emisión de fluorescencia producto de la transferencia de energía resonante (FRET) entre dos sondas específicas para el DNA molde. Estas sondas están marcadas con diferentes fluoróforos, un dador que es generalmente fluoresceína y un aceptor. Durante la etapa de hibridación las sondas se unen al DNA molde quedando próximas entre sí, de modo que el dador al ser excitado transfiere su energía al aceptor, el cual emite fluorescencia. Esta emisión es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente en la reacción de PCR y, por lo tanto, solo la amplificación del producto específico producirá emisión de fluorescencia no afectando la presencia de dímeros de partidores. La principal ventaja de este formato de detección es su especificidad dada por la secuencia de las sondas. Finalmente, la detección mediante sondas de hidrólisis se basa en la actividad 5'-3' exonucleasa de la enzima DNA polimerasa usada en la reacción de PCR. Las sondas de hidrólisis poseen dos fluoróforos próximos uno de otro, un reportero y un apagador. La cercanía entre ambos fluoróforos hace que el apagador evite la emisión de fluorescencia del reportero (vía FRET). En la etapa de hibridación la sonda se une de forma específica al DNA molde y al comenzar la etapa de extensión de la nueva hebra de DNA la actividad 5'-3' exonucleasa de la enzima rompe la sonda separando al reportero del apagador produciéndose la emisión de fluorescencia por parte del reportero. Este formato permite detectar de forma específica el producto de PCR. Asociados a los formatos de detección, los equipos y programas utilizados en el QPCR son capaces de realizar los ciclos de amplificación en tiempos cortos y permiten observar de forma instantánea el resultado de la reacción sin la necesidad de un gel de agarosa.

La creciente demanda por detectar y cuantificar microorganismos de forma rápida y precisa ha hecho del QPCR una herramienta utilizada en diversas áreas de investigación, sin exceptuar la industria vitivinícola, donde el QPCR se utiliza para la detección de *Dekkera bruxellensis*, forma esporulada de la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, que produce mal olor al vino (Phister y Mills, 2003). Otra aplicación de la técnica de PCR en tiempo real es la detección y cuantificación de *S. cerevisiae* en vinos embotellados, puesto que la presencia de esta levadura puede producir una refermentación del vino afectando gravemente su calidad (Martorell y col, 2005).

El QPCR puede ser utilizado como un sistema eficiente de monitoreo microbiológico en fermentaciones vnicas. Sin embargo, es necesario diseñar partidores y sondas adecuados que permitan diferenciar entre una gran cantidad de especies de levaduras y entre cepas de *S. cerevisiae*, especialmente aquellas comerciales frecuentemente utilizadas en viñas y bodegas como cultivos iniciadores de la fermentación. En el presente trabajo se propuso desarrollar partidores y sondas específicos para cepas comerciales de *S. cerevisiae* que permitan la cuantificación de estas cepas durante la fermentación. La cuantificación por QPCR de cepas comerciales permitirá determinar de forma rápida el progreso de la fermentación a través de la evaluación cuantitativa de la cepa inoculada. Permitiendo a los enólogos corregir de forma rápida eventuales problemas durante el proceso.

2. HIPOTESIS

2.1. Hipótesis.

La acumulación natural de polimorfismos de secuencia entre cepas vínicas de *S. cerevisiae*, permitirá desarrollar partidores y sondas para la cuantificación de inóculos comerciales en fermentaciones industriales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Desarrollar partidores especie/cepa específicos para *S. cerevisiae* que permitan la cuantificación relativa de esta levadura en fermentaciones vínicas inoculadas, mediante PCR en tiempo real.

3.2. Objetivos específicos.

- Identificar secuencias cepa específicas para las principales cepas comerciales utilizadas en Chile, a partir de la información obtenida de sus secuencias intrónicas, secuencias de DNA mitocondrial y RAPD-PCR.
- Identificar secuencias específicas para la especie *S. cerevisiae* mediante RAPD-PCR.
- Establecer y estandarizar un protocolo para la utilización de la plataforma de PCR en tiempo real con los partidores especie/cepa específicos desarrollados.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Cepas utilizadas.

Se utilizaron 13 cepas de *S. cerevisiae* comerciales y 10 no comerciales. Además, se utilizaron 8 especies de levaduras encontradas frecuentemente en diferentes etapas de la fermentación (tabla 1). Las cepas comerciales de *S. cerevisiae* fueron seleccionadas según criterio de importancia a través de una encuesta realizada a enólogos de diferentes viñas Chilenas.

Todas las cepas utilizadas son parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile (LAMAP).

Tabla 1. Cepas de levaduras.

Especie	Cepa	Origen
<i>S. cerevisiae</i>	VL3*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	EC1118*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	Alg804*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	Fermivin PDM*	▲
<i>S. cerevisiae</i>	L-2056*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	F15*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	B2000*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	Killer K1*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	L-16	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-146	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-165	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-269	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-494	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	Zymaflore F10*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	UCLMS377*	España
<i>S. cerevisiae</i>	VR44*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	Fermivin 7013*	▲
<i>S. cerevisiae</i>	Alg100*	Francia
<i>S. cerevisiae</i>	L-281	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-757	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-958	Argentina
<i>S. cerevisiae</i>	L-1006	Chile
<i>S. cerevisiae</i>	L-1054	España
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CECT 1451**	Bélgica
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	L-1048	Chile
<i>Pichia anomala</i>	CECT 10320**	España
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	L-1823	Chile
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L-2131	Argentina
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L-2568	Chile
<i>Saccharomyces bayanus</i>	L-2581	USA
<i>Candida boidinii</i>	L-2595	Chile

(*) Cepas comerciales de *S. cerevisiae*.

(**) Colección Española de cultivos tipo, Valencia, España.

(▲) Sin información

4.2. Medios de cultivo y extracción de DNA.

Las cepas de levaduras fueron crecidas en medio YPD (ver anexo 1) por 15-18 horas a 28° C. La extracción de DNA se realizó utilizando el sistema “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Applied Science, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA fue cuantificado mediante espectrofotómetro a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001).

4.3. Análisis RAPD-PCR de las cepas de *S. cerevisiae*.

Las cepas fueron analizadas mediante RAPD-PCR utilizando 34 partidores RAPD (tabla 2). Las reacciones se realizaron utilizando el sistema “LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I” (Roche Applied Science, Alemania) con: 5 mM de MgCl₂, 3,2 μM de partidor RAPD, 0,5 ng de DNA y agua para 20 μL. Las amplificaciones RAPD-PCR se realizaron en un equipo de QPCR LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Alemania) bajo las siguientes condiciones: un paso preliminar de 10 min a 95° C; 40 ciclos de 95° C por 0 s, 37° C por 30 s, 72° C por 1,5 min y finalmente un enfriamiento a 40° C por 30 s. El producto de la amplificación fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% en TAE (ver anexo 1) a 90 V. Se utilizaron como marcadores de peso molecular un estándar de 100 pb y el fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas, USA). Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1 μg/mL y observados en un transiluminador de luz UV (Vilbert Lourmat, Francia).

Tabla 2. Partidores RAPD.

<u>NOMBRE *</u>	<u>SECUENCIA 5'-- 3'</u>
E04	CCAGCACTTC
E08	GGCAGGCAAG
E09	TGCCACGAGG
E12	CCGAGCAATC
E13	TGTGGACTGG
E20	TTGACCCAG
D11	CAATCGGGTC
R01	TGCGGGTCCT
R02	CACAGCTGCC
R03	ACACAGAGGG
R04	CCCGTAGCAC
R06	GTCTACGGCA
R07	ACTGGCCTGA
R08	CCCGTTGCCT
R09	TGAGCACGAG
R10	CCATTCCCCA
R11	GTAGCCGTCT
R12	ACAGGTGCGT
R13	GGACGACAAG
R14	CAGGATTCCC
R17	CCGTACGTAG
R19	CCTCCTCATC
R20	ACGGCAAGGA
S01	CTACTGCGCT
S02	CCTCTGACTG
S04	CACCCCCTTG
S05	TTTGGGGCCT
S11	AGTCGGGTGG
S13	GTCGTTCTTG
S18	CTGGCGAACT
D08	GGCAGGCAAG
E10	CTGAAGCGCA
F06	CCGCAGTCTG
F10	GGTTGGAGAC

* Operon Technologies, USA.

4.4. Separación y purificación de fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante RAPD-PCR.

Los fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante RAPD-PCR fueron cortados desde el gel de agarosa y el DNA fue purificado utilizando el sistema "AxyPrep DNA Gel Extraction Kit" (Axygen, USA). Los fragmentos de DNA purificados fueron cuantificados mediante espectrofotómetro a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001).

4.5. Amplificación, clonación y secuenciación de fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante RAPD-PCR.

Los productos amplificados por PCR en tiempo real tienen uracilo, debido a esto los fragmentos de DNA purificados debieron ser amplificados nuevamente mediante RAPD-PCR convencional. La mezcla de reacción contenía 2 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas, USA), 2 mM de MgCl₂, 3,2 μM de partidor RAPD, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 ng de DNA y agua para 50 μL. La amplificación se realizó utilizando un termociclador ThermalCycler (MJ. Research, USA) bajo las siguientes condiciones: un paso preliminar de 3 min a 95° C; 40 ciclos de 95° C por 1 min, 37° C por 2 min, 72° C por 2 min y una extensión final a 72° C por 7 min. Los fragmentos de DNA polimórficos amplificados nuevamente fueron purificados de la forma descrita en la sección 4.4.

La clonación de fragmentos polimórficos se realizó utilizando el sistema "pGEM-T Easy Vectors" (Promega, USA). Los fragmentos polimórficos clonados

fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* cepa JM109 (Promega, USA) mediante un golpe térmico a 42° C por 50 segundos. Las células transformadas fueron seleccionadas en placas con medio LB (ver anexo 1) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y crecidas a 37° C por 16 horas. Las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina a 37° C por 16-24 horas. La extracción de DNA plasmidial se realizó utilizando el sistema "Plasmid Miniprep Kit I" (E.Z.N.A. USA). La clonación de fragmentos polimórficos fue confirmada mediante PCR utilizando los partidores M13 Fw: 5' GTAAAACGACGGCCAG 3' y M13 Rs: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'. Las reacciones se realizaron con 2 U de Taq Go polimerasa (Promega, USA), 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada partidador, 0,1 mM de dNTPs, 0,6 ng de DNA y agua para 50µL. La amplificación se realizó utilizando un termociclador ThermalCycler (MJ. Research, USA) bajo las siguientes condiciones: un paso preliminar de 10 minutos a 95° C; 40 ciclos de 95° C por 1 min, 55° C por 1 min, 72° C por 1 min y una extensión final a 72° C por 7 min.

La secuenciación del DNA plasmidial se realizó a través del servicio de secuenciación automática de DNA del Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

4.6. Análisis de secuencias.

El análisis y alineamiento de secuencias intrónicas, secuencias de mtDNA y los fragmentos de DNA polimórficos obtenidos por RAPD-PCR se realizó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall T, 1999). La identidad de las secuencias fue confirmada en todos los casos mediante análisis en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.7. Selección de secuencias intrónicas.

La selección de secuencias intrónicas de *S. cerevisiae* se realizó utilizando el programa Ares Intrón Yeast Database versión 3.0, (http://www.cse.ucsc.edu/research/compbio/yeast_introns.html). Los partidores diseñados fueron sintetizados por TibMolBiol (Adelphia, USA).

4.8. Amplificación de secuencias intrónicas

La amplificación por PCR de las secuencias intrónicas de *S. cerevisiae* se realizó de forma similar a lo descrito en la sección 4.5 para la amplificación con los partidores M13. En la amplificación de los intrones YDR064, YIL148 y YLR287 la temperatura de hibridación de los partidores fue 55, 57 y 58° C, respectivamente. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el sistema "AxyPrep PCR Clean-up Kit" (Axygen,

USA). El producto de PCR purificado fue clonado y secuenciado de forma similar a lo descrito en la sección 4.5.

4.9. Selección de secuencias de DNA mitocondrial.

La selección de secuencias del mtDNA se realizó en base a la información contenida en la base de datos del proyecto SGRP (proyecto de resecuenciación del genoma de *Saccharomyces*) del Institute of Genetics, University of Nottingham (<http://www.sanger.ac.uk/Teams/Team71/durbin/sgrp/index.shtml>). Las síntesis de partidores para las regiones del genoma mitocondrial seleccionadas fueron realizadas por TibMolBiol (Adelphia, USA).

4.10. Amplificación del genoma mitocondrial

La amplificación por PCR de las zonas del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* se realizó de forma similar a lo descrito en la sección 4.5 para la amplificación con los partidores M13. El producto de PCR de cada zona del genoma mitocondrial fue purificado y secuenciado de forma similar a lo descrito en la sección 4.5.

4.11. PCR en tiempo real para *S. cerevisiae*.

El diseño de los partidores y la sonda de hidrólisis fueron realizados utilizando el programa LightCycler Probe Design 2.0 (Roche Applied Science, Alemania) y su síntesis fue realizada por TibMolBiol (Adelphia, USA). Las reacciones se realizaron utilizando el sistema "LightCycler TaqMan Master" (Roche Applied Science, Alemania) con: 0,5 μ M de cada partidor, 0,33 nM de sonda de hidrólisis, 0,6 ng de DNA, 0,5 U de Uracil-DNA glicosidasa (UNG) por reacción (Roche Applied Science, Alemania) y agua para 20 μ L. Las amplificaciones se realizaron en un equipo LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Alemania) bajo las siguientes condiciones: activación de la UNG 10 min a 40° C, 10 min a 95° C; 40 ciclos de 95° C por 10 s, 62° C por 10 s, 72° C por 1 s y finalmente enfriamiento a 40° C por 30 s. El tamaño del producto de PCR fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa de forma similar a lo descrito en la sección 4.3.

La sensibilidad del método en cultivo puro se determinó realizando diluciones seriadas desde un cultivo de la cepa EC1118 de *S. cerevisiae* con una concentración inicial de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL. Cada dilución se realizó en un volumen final de 100 mL el cual fue centrifugado 15 minutos a 9000 rpm a 4° C para luego realizar la extracción de DNA de forma similar a lo descrito en la sección 4.2 y el DNA fue usado como molde para su análisis por QPCR.

La sensibilidad del método en mosto y vino se realizó contaminando artificialmente muestras de mosto y vino. En el caso de mosto, 1 mL de mosto de uva fue contaminado artificialmente con un cultivo de la cepa EC1118 con 1×10^2 hasta

1×10^7 UFC/mL. En vino, 100 mL fueron contaminados con $7,8 \times 10^1$ hasta $7,8 \times 10^7$ UFC/mL. La extracción de DNA de las muestras contaminadas artificialmente de mosto y vino se realizó de forma similar a lo descrito en la sección 4.2 y el DNA fue usado como molde para su análisis mediante QPCR.

Las muestras de vino proporcionadas por viñas nacionales fueron analizadas utilizando 100 mL de vino para la extracción de DNA, el que fue usado como molde para el QPCR para *S. cerevisiae*. Las muestras también fueron analizadas por conteo en placas en medio YPD suplementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina.

5.RESULTADOS

5.1. Definición de las cepas comerciales más utilizadas.

Con el objeto de conocer cuales son las cepas comerciales de *S. cerevisiae* más utilizadas en el país, se realizó una encuesta a enólogos de 14 viñas nacionales. Se recopiló información acerca de la levadura comercial de *S. cerevisiae* que utilizan en sus fermentaciones y la cantidad aproximada de levadura (tabla 3). De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió incluir en los análisis posteriores a ocho de las cepas comerciales de *S. cerevisiae* con alto volumen de uso y de fácil disponibilidad en el mercado.

Tabla 3. Volumen estimado anual de levadura comercial utilizado por las viñas.

Levadura	Cantidad estimada de uso anual (kilos)
FERMIVIN PDM*	1532
FERMIVIN PVD	400
VR44	400
CHP	900
ALG804*	1700
EC1118*	1000
VL3 (zymaflore)*	630
L2056*	180
Killer K1*	500
VL1 (zymaflore)	600
F15 (zymaflore)*	175
F10	50
B2000*	600
FREDO	300
UY4	300
VR8000	300
EXCELLENT XR	18
LA CEREVISIAE	70
F5	50
ACTIFLORA	25

* Cepas comerciales de levadura incluidas en este trabajo.

5.2. Amplificación y secuenciación de intrones de *S. cerevisiae*.

Con el objeto de obtener secuencias específicas para las cepas vínicas comerciales utilizadas en este trabajo, se realizó una búsqueda en la base de datos "Ares Intron Yeast Database" de los intrones con secuencias más variables. La selección de los intrones se realizó comparando las secuencias de las cepas de *S. cerevisiae* S288C (laboratorio), RM11-1 α (zona vitivinícola de California) y YJM789 (pulmón de paciente con SIDA), todas presentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Como resultado de este análisis bioinformático se seleccionaron los intrones YDR064, YIL148 e YLR287, donde las diferencias entre estas cepas de *S. cerevisiae* corresponden a polimorfismos de un nucleótido (SNP) y escisiones de secuencias, haciendo de estas secuencias intrónicas un posible blanco para la obtención de secuencias específicas para las cepas vínicas comerciales de interés. Los partidores diseñados para las secuencias intrónicas seleccionadas se presentan en la tabla 4. El intrón YDR064 se encuentra en el cromosoma IV, específicamente en el gen que codifica para la proteína ribosómica S13 ubicada en la subunidad 40S del ribosoma. El intrón YIL148 se encuentra en el cromosoma IX, en el gen que codifica para la proteína ribosómica L40A ubicada en la subunidad 80S del ribosoma. Finalmente, el intrón YLR287 se encuentra en el cromosoma XII, en el gen que codifica la proteína ribosómica S30A ubicada en la subunidad 40S del ribosoma.

La amplificación por PCR de las tres secuencias intrónicas seleccionadas se realizó en las 23 cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. El producto de amplificación de los intrones YDR064, YIL148 e YLR287 fue de 540 pb, 406 pb y 364

pb respectivamente y el resultado de la amplificación de los intrónes se ejemplifica en la figura 1.

Tabla 4. Partidores diseñados para secuencias intrónicas.

Intrón	Partidor directo 5'--3'	Partidor reverso 5'--3'
YDR064	GTATGTTTATTAACACCATAGC	GAAGAAGAAATACCTTTAC
YIL148	GTATGCACCATATCCATTCT	TGACAAGTTAGTAAGGATATCA
YLR287	GTACGTAAGCCTCATTAGG	GGCGTATCAGCAAGGATGC

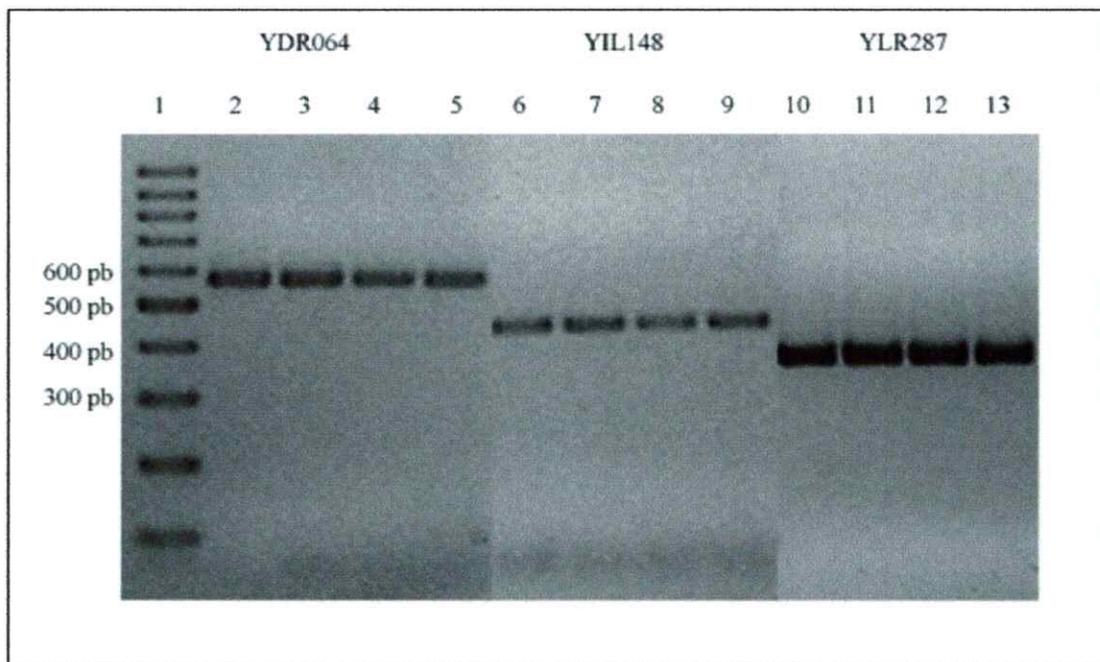


Figura 1. Amplificación por PCR de los intrones YDR064, YIL148 e YLR287.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación de tres intrones en cuatro cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Carriles: 1, marcador de peso molecular 100 pb; 2, VL3; 3, EC1118; 4, Alg804, 5; Fermivin PDM; 6, VL3; 7, EC1118; 8, Alg804, 9; Fermivin PDM; 10, VL3; 11, EC1118; 12, Alg804, 13; Fermivin PDM.

5.3. Análisis de las secuencias intrónicas.

El producto de amplificación de las tres secuencias intrónicas realizado en las 23 cepas de *S. cerevisiae* fue clonado y posteriormente secuenciado. Con el objeto de determinar si existían diferencias entre las secuencias intrónicas de las cepas comerciales, las 23 secuencias obtenidas para cada intrón fueron alineadas mediante el programa ClustalW. El resultado de estos alineamientos se ejemplifica en la figura 2 para el intrón YLR287, donde se observa que esta secuencia intrónica es muy similar en todas las cepas de analizadas, observándose solo diferencias puntuales de 1 o 2 pb. Este resultado no permite el diseño de partidores y sondas específicas para las cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Resultados similares se obtuvieron del análisis de las secuencias de los intrones YDR064 e YIL148.

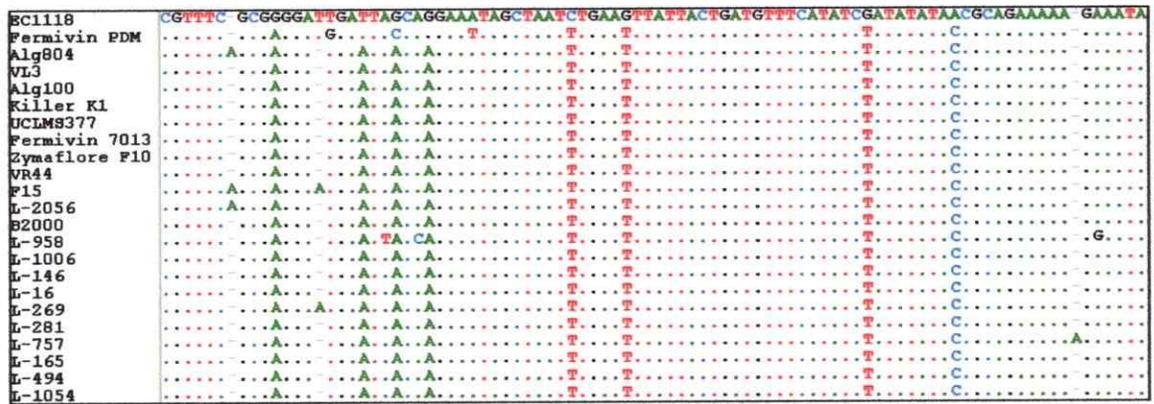


Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias para el intrón YLR287.

A la izquierda de la figura se indica el nombre de cada cepa. Los puntos corresponden a bases idénticas entre las secuencias alineadas. Se muestran las primeras 90 pb.

5.4. Amplificación y secuenciación de regiones del genoma mitocondrial.

Otra aproximación a la búsqueda de secuencias específicas para cepas comerciales de *S. cerevisiae* fue la amplificación de zonas del DNA mitocondrial con alta variabilidad en su secuencia. La selección de zonas del genoma mitocondrial se realizó utilizando la información entregada por la base de datos del proyecto SGRP (proyecto de resecuenciación del genoma de *Saccharomyces*). Esta base de datos cuenta con la secuencia genómica y mitocondrial de 37 cepas de *S. cerevisiae* de las cuales 5 son cepas vínicas. Esta base de datos tiene alineadas las secuencias de las 37 cepas respecto de la cepa tipo S288C entregando información respecto de las zonas del genoma con polimorfismos de un nucleótido (SNP). En la tabla 5 se presentan los partidores diseñados para la amplificación de diferentes zonas del DNA mitocondrial, estos partidores fueron diseñados en base a la secuencia del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* disponible en el NCBI para la cepa S288C, número de acceso NC_001224. Las zonas del genoma mitocondrial seleccionadas fueron 6 regiones intergénicas y el intrón ai5 α del gen *cox1* (tabla 5). De las 7 zonas del genoma mitocondrial seleccionadas, la amplificación de las 6 secuencias intergénicas presentaron amplificación inespecífica y solo la amplificación del intrón ai5 α del gen *cox1* permitió la obtención de un producto específico de 200 pb.

Tabla 5. Partidores diseñados para la amplificación de regiones del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Regiones del genoma mitocondrial*	Partidor (directo) 5' → 3'	Partidor (reverso) 5' → 3'	Tamaño esperado del producto de PCR (pb)	Temperaturas de hibridación para la reacción de PCR. (°C)
(8195-9373 pb)	CTTAGTATGATCACATCATA	ACCCATTGTGAATAAGAATA	1178	55
(27812-28486 pb)	TGCGGTGGGCTTATAAATATCT	GAGATTCGAACTCCTAATGATTG	873	60
(35445-36539 pb)	TCTCACAAATCTTTTTTACCTATG	GATCTAATGGTGATGTAATATATG	1094	60
(48291-48900 pb)	CGGTTCGATCCGATTAAGG	GATGATGGTTGTGGTGAATC	609	60
(72706-73757 pb)	GGCTACGTAGGTTCAAATCC	AATCCGGTGAACAACCCGGATTG	869	60
(78608-79212 pb)	TCCTCCTAGCAGGATTCACATC	TGGTGTGCTGAATCCTG	603	60
Intrón ai5α del gen <i>cox1</i>	GGTTCGAACCCTATATTTCCT	CTACTTCITTTCTAAATGTGTC	200	60

5.5. Análisis de secuencias del genoma mitocondrial.

El intron ai5 α del gen *cox1* fue amplificado por PCR para 18 cepas de *S. cerevisiae* y el producto de PCR fue purificado y secuenciado. El análisis mediante BLAST de las secuencias indicó que estas corresponden al gen mitocondrial de la citocromo oxidasa. Las secuencias obtenidas para las 18 cepas de *S. cerevisiae* fueron alineadas mediante el programa ClustalW como se muestra en la figura 3, donde se observa que la secuencia del gen *cox1* es muy similar en todas las cepas de *S. cerevisiae*, encontrándose diferencias puntuales de 1 o 2 pb entre las secuencias. Al igual que para las secuencias intrónicas, este resultado no permite el diseño de partidores y sondas específicas para las cepas comerciales de *S. cerevisiae*.

Las múltiples amplificaciones inespecíficas obtenidas para zonas intergénicas del mtDNA se mantuvieron incluso aumentando la temperatura de hibridación de los partidores en la reacción de PCR, por lo que se decidió purificar desde el gel de agarosa varios de los productos de PCR y secuenciarlos. Sin embargo, las secuencias obtenidas no correspondieron a la zona del mtDNA esperada sino que presentaron alta identidad con secuencias de DNA genómico, resultado que se ejemplifica en la tabla 6 para la región intergénica 27812. A excepción de los resultados para el análisis del intrón ai5 α del gen *cox1*, no se descarta la presencia de secuencias cepa específica en regiones intergenicas del genoma mitocondrial. Las dificultades técnicas en la amplificación de regiones intergénicas se deberían al bajo contenido GC del genoma mitocondrial, lo cual dificulta el diseño de partidores, los cuales hibridan de forma inespecífica con DNA genómico.

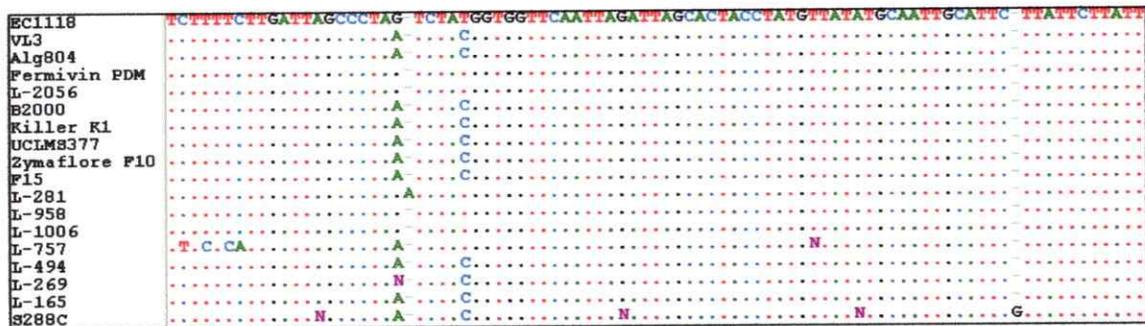


Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias para el intron ai5a del gen *cox1*.

A la izquierda de la figura se indica el nombre de cada cepa. Los puntos corresponden a bases idénticas entre las secuencias alineadas. Se muestra la región de 65- 150 pb del intrón.

Tabla 6. Ubicación en el genoma nuclear de las secuencias amplificadas inespecíficamente en la reacción de PCR para la región intergénica 27812 del genoma mitocondrial.

Cepa	Tamaño (pb)	Ubicación en el genoma nuclear
EC1118	1300	Cromosoma XIV, proteína HXT17-Transportador de Hexosa
Alg804	1300	Cromosoma XIV, proteína HXT17-Transportador de Hexosa
F15	1300	Cromosoma XIV, proteína HXT17-Transportador de Hexosa
F15	380	Cromosoma XII, proteína ERV41
L-1006	1300	Cromosoma XIV, proteína HXT17-Transportador de Hexosa
L-146	380	Cromosoma VII baja identidad.

5.6. RAPD-PCR para *S. cerevisiae*.

El objetivo de realizar un análisis de RAPD-PCR fue obtener fragmentos de DNA polimórficos presentes en todas las cepas de *S. cerevisiae* y fragmentos de DNA presentes solo en cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Las reacciones de RAPD-PCR se realizaron con 34 partidores diferentes de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3. Las figuras 4 y 5 ejemplifican la obtención de fragmentos de DNA específicos para la especie *S. cerevisiae* y las figuras 6 y 7 ejemplifican la obtención de fragmentos de DNA polimórficos específicos para cepas de esta especie.

Los fragmentos de DNA polimórficos especie específicos, presentes en todas las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas fueron seleccionados por su menor tamaño y mayor intensidad. El total de fragmentos polimórficos seleccionados fueron siete (tabla 7). Todos los fragmentos polimórficos entre especies fueron cortados y purificados desde el gel de agarosa, amplificados nuevamente por PCR y clonados de acuerdo a lo descrito en la sección 4.5. El fragmento polimórfico especie específico obtenido con el partidor R12 fue seleccionado por su menor tamaño (170 pb) y mayor intensidad en ensayos de electroforesis, este fragmento esta presente en las 23 cepas de *S. cerevisiae* y ausente en otras especies de levaduras (figura 4), y fue finalmente secuenciado para la cepa EC1118.

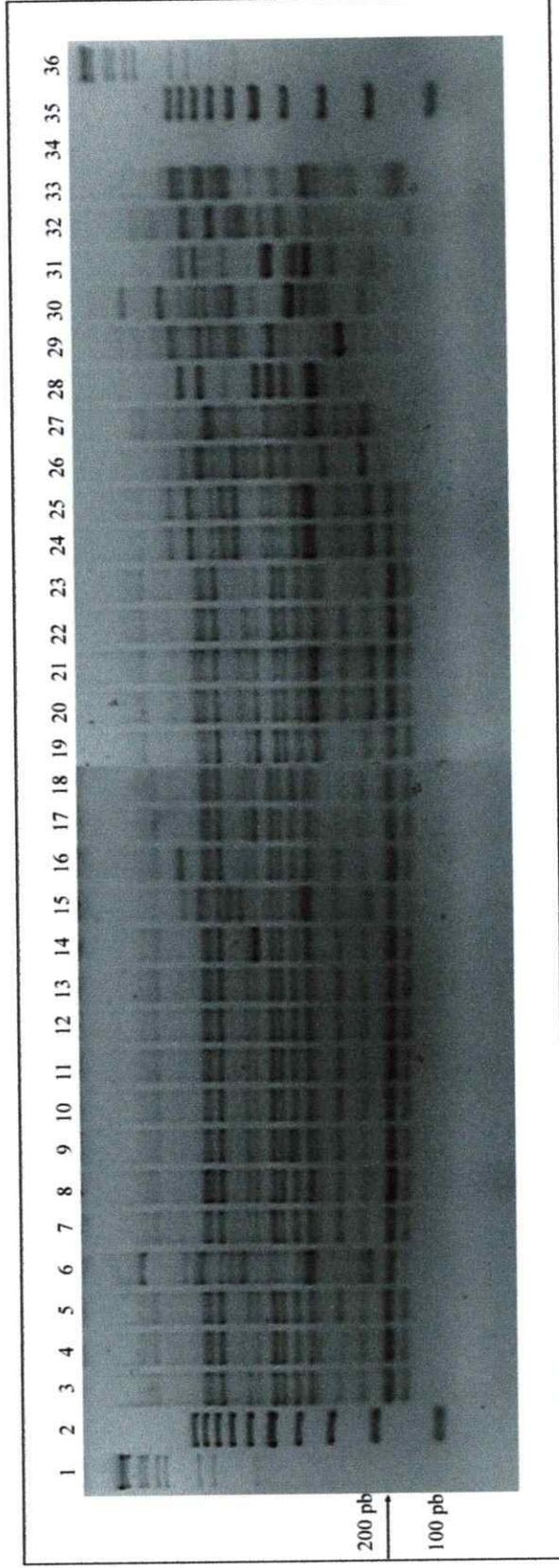


Figura 4. RAPD-PCR para las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con el partidor R12. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación con el partidor R12. La flecha indica un fragmento de 170 pb presente en todas las cepas de *S. cerevisiae* analizadas. Carriles: 1, Marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII; 2, marcador de peso molecular 100 pb; 3, VL3; 4, EC1118; 5, Alg804; 6, Fermivin PDM; 7 L-2056; 8, F15; 9, B2000; 10, Killer K1; 11, L-16; 12, L-146; 13, L-165; 14, L-269; 15, L-494; 16, Zymaflore F10; 17, UCLMS377; 18, VR44, 19, Fermivin 7013; 20, Alg100; 21, L-281; 22, L-757; 23, L-958; 24, L-1006; 25, L-1054; 26, *Brettanomyces bruxellensis*; 27, *Metschnikowia pulcherrima*; 28, *Pichia anomala*; 29, *Torulasporea delbrueckii*; 30, *Kluyveromyces thermotolerans*; 31, *Zygosaccharomyces bailii*; 32, *Saccharomyces bayanus*; 33, *Candida boidinii*; 34, control negativo; 35, marcador de peso molecular 100 pb; 36, marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII.

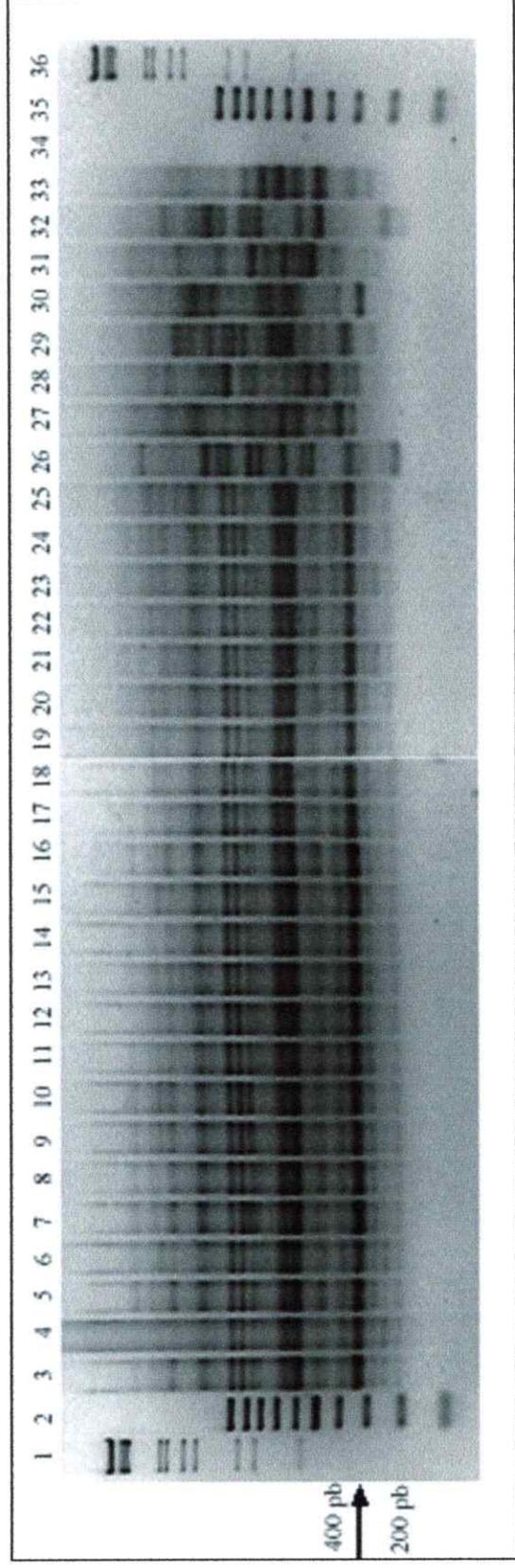


Figura 5. RAPD-PCR para las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con el partidor R14.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación con el partidor R14. La flecha indica un fragmento de DNA presente en todas las cepas de *S. cerevisiae* analizadas. Carriles: 1, Marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII; 2, marcador de peso molecular 100 pb; 3, VL3; 4, EC1118; 5, Alg804; 6, Fermivin PDM; 7 L-2056; 8, F15; 9, B2000; 10, Killer K1; 11, L-16; 12, L-146; 13, L-165; 14, L-269; 15, L-494; 16, Zymaflore F10; 17, UCLMS377; 18, VR44; 19, Fermivin 7013; 20, Alg100; 21, L-281; 22, L-757; 23, L-958; 24, L-1006; 25, L-1054; 26, *Brettanomyces bruxellensis*; 27, *Metschnikowia pulcherrima*; 28, *Pichia anomala*; 29, *Torulasporea delbrueckii*; 30, *Kluyveromyces thermotolerans*; 31, *Zygosaccharomyces bailii*; 32, *Saccharomyces bayanus*; 33, *Candida boidinii*; 34, control negativo; 35, marcador de peso molecular 100 pb; 36, marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII.

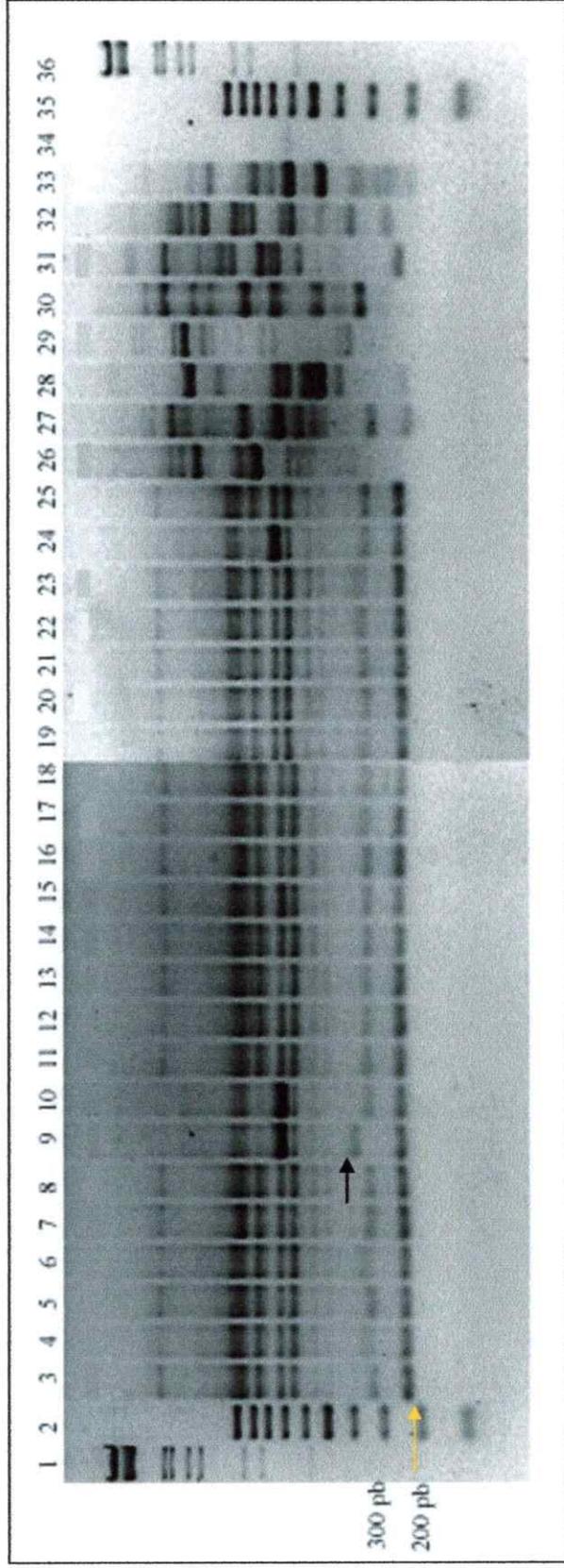


Figura 6. RAPD-PCR para las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con el partidor R03.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación con el partidor R03. La flecha de color negro indica un fragmento de DNA específico para la cepa comercial B-2000, carril 9. La flecha de color amarillo indica un fragmento de DNA presente en todas las cepas de *S. cerevisiae* incluidas en el análisis. Carriles: 1, Marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII; 2, marcador de peso molecular 100 pb; 3, VL3; 4, EC1118; 5, Alg804; 6, Fermivin PDM; 7 L-2056; 8, F15; 9, B2000; 10, Killer K1; 11, L-16; 12, L-146; 13, L-165; 14, L-269; 15, L-494; 16, Zymaflore F10; 17, UCLMS377; 18, VR44; 19, Fermivin 7013; 20, Alg100; 21, L-281; 22, L-757; 23, L-958; 24, L-1006; 25, L-1054; 26, *Brettanomyces bruxellensis*; 27, *Metschnikowia pulcherrima*; 28, *Pichia anomala*; 29, *Torulasporea delbrueckii*; 30, *Kluyveromyces thermotolerans*; 31, *Zygosaccharomyces bailii*; 32, *Saccharomyces bayanus*; 33, *Candida boidinii*; 34, control negativo; 35, marcador de peso molecular 100 pb; 36, marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII.

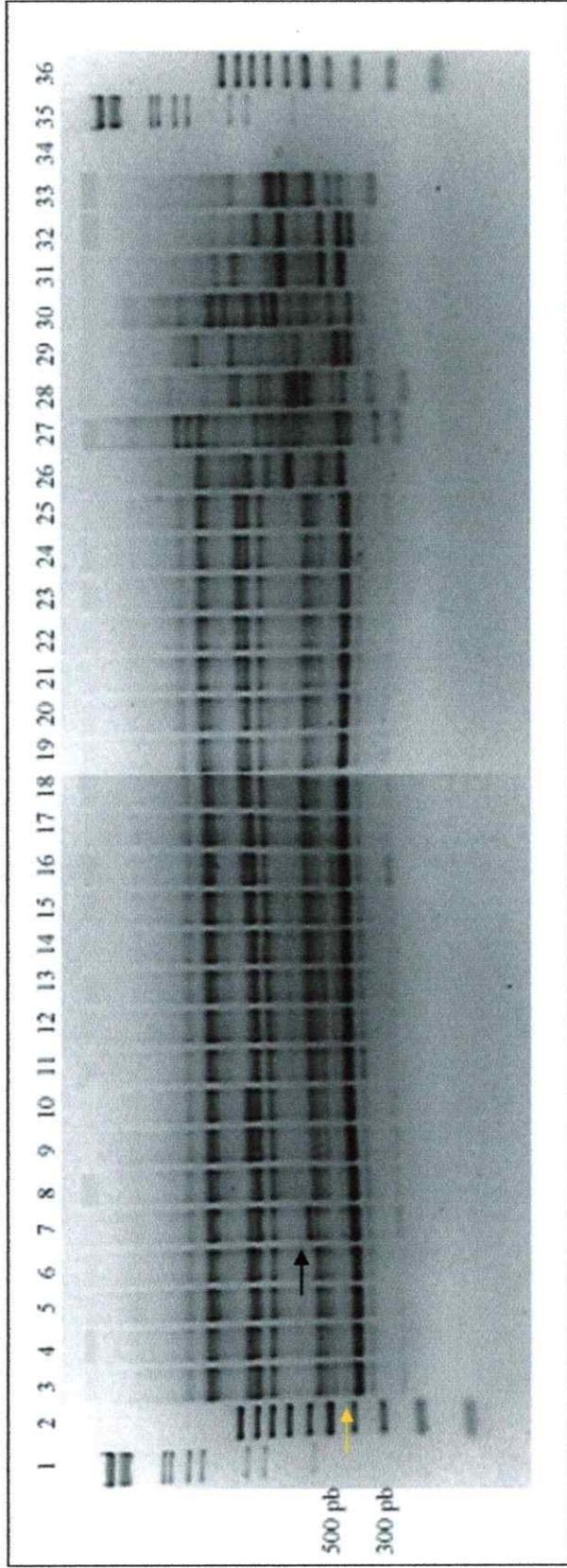


Figura 7. RAPD-PCR para las diferentes cepas de *S. cerevisiae* con el partidor R01.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación con el partidor R01. La flecha de color negro indica un fragmento de DNA específico para la cepa comercial L-2056 carril 7. La flecha de color amarillo indica un fragmento de DNA presente en todas las cepas de *S. cerevisiae* incluidas en el análisis. Carriles: 1, Marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII; 2, marcador de peso molecular 100 pb; 3, VL3; 4, EC1118; 5, Alg804; 6, Fermivin PDM; 7 L-2056; 8, F15; 9, B2000; 10, Killer K1; 11, L-16; 12, L-146; 13, L-165; 14, L-269; 15, L-494; 16, Zymaflore F10; 17, UCLMS377; 18, VR44; 19, Fermivin 7013; 20, Alg100; 21, L-281; 22, L-757; 23, L-958; 24, L-1006; 25, L-1054; 26, *Brettanomyces bruxellensis*; 27, *Metschnikowia pulcherrima*; 28, *Pichia anomala*; 29, *Torulasporea delbrueckii*; 30, *Kluyveromyces thermotolerans*; 31, *Zygosaccharomyces bailii*; 32, *Saccharomyces bayanus*; 33, *Candida boidinii*; 34, control negativo; 35, marcador de peso molecular 100 pb; 36, marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII.

Tabla 7. Fragmentos de DNA polimorficos especie específicos.

Partidor	Tamaño (pb)
R12	170*
R01	380
E13	450
D11	300
R01	380
R03	220
R06	400

* Fragmento de DNA polimórfico secuenciado para la cepa EC1118.

Por otro lado, los fragmentos de DNA polimórficos cepa específicos encontrados mediante el análisis de RAPD-PCR se resumen en la tabla 8. Sin embargo, no fue posible encontrar un fragmento polimórfico específico para la cepa Alg804. Todos los fragmentos fueron purificados desde el gel de agarosa, amplificados nuevamente por PCR, clonados y secuenciados de acuerdo a lo descrito en la sección 4.5,

Tabla 8. Fragmentos de DNA polimórficos cepa específicos.

Partidor	Tamaño (pb)	Cepa *
R01	600	L-2056
R03	280	VR44
R06	200	EC1118
R06	310	Killer K1
R09	300	L-2056
R09	280	Zymaflore F10
S04	1100	VL3
S04	1200	F15
S05	450	F15
S11	1100	B2000
S11	1100	Killer K1
S18	650	L-2056
D11	920	Fermivin PDM

* Todos los fragmentos de DNA polimórficos cepas específicos encontrados mediante el análisis RAPD-PCR fueron secuenciados.

5.7. Análisis de secuencias especie y cepa específicas.

La secuencia especie específica obtenida con el partidor R12 correspondió a parte del gen nuclear *mrp2* que codifica para una proteína del ribosoma mitocondrial. Esta secuencia esta presente solo en *S. cerevisiae* de acuerdo al análisis bioinformático mediante BLAST y fue escogida para desarrollar el ensayo de PCR en tiempo real específico para *S. cerevisiae* debido a que el pequeño tamaño de la secuencia (170 pb) permite ciclos de amplificación más cortos.

Por otra parte, el resultado del análisis mediante BLAST de las secuencias cepa específicas obtenidas del RAPD-PCR se presenta en la tabla 9. El alineamiento de las secuencias cepa específicas con las secuencias de *S. cerevisiae* presentes en bases de datos demuestra que los fragmentos seleccionados no corresponden a secuencias específicas para cada cepa. En la figura 8 se puede observar que la probable secuencia específica para la cepa EC1118 obtenida con el partidor R06 tiene gran similitud con las cepas de las bases de datos aun cuando estas tienen un origen distinto, encontrándose las principales diferencias entre estas cepas en los extremos de las secuencias, zonas que corresponden al partidor RAPD utilizado para su amplificación.

Los resultados obtenidos para las otras posibles secuencias cepa específicas (tablas 9) fueron similares al obtenido para el fragmento amplificado con el partidor R06 en la cepa EC1118, por lo que la técnica de RAPD-PCR no permitió la obtención de secuencias cepa específicas que permitieran desarrollar partidores específicos para cada cepa.

Tabla 9. Ubicación en el genoma de *S. cerevisiae* de las secuencias cepa específicas obtenidas.

Partidor	Tamaño (pb)	Cepa	Resultado del análisis BLAST
R01	600	L-2056	Parte del gen que codifica la subunidad beta de la fenilalanil-tRNA sintetasa (FRS1)
R03	280	VR44	Parte del gen que codifica para el RNA ribosomal 26S
R06	200	EC1118	Parte del marco de lectura YPL277c, cromosoma XVI
R06	310	Killer K1	Parte del cromosoma V
R09	300	L-2056	Parte del cromosoma XII cosmido 9672
R09	280	Zymaflore F10	Parte del cromosoma XII cosmido 9672
S04	1100	VL3	Parte del cromosoma V cosmido 9537
S04	1200	F15	Parte del cromosoma V cosmido 9537
S05	450	F15	Parte del marco de lectura YOR043w, cromosoma XV
S11	1100	B2000	Parte del marco de lectura YJR148w, cromosoma X
S11	1100	Killer K1	Parte del marco de lectura YJR148w, cromosoma X
S18	650	L-2056	Parte del gen que codifica la adrenodoxina oxidoreductasa
D11	920	Fermivin PDM	Parte del cromosoma VI

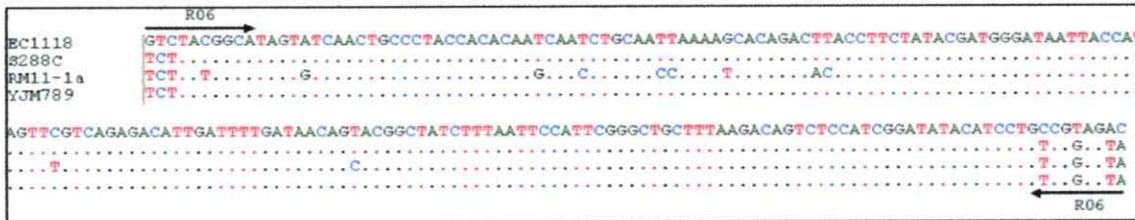


Figura 8. Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida con el partidor R06 seleccionada como específica para la cepa comercial EC1118. A la izquierda de la figura se indica el nombre de cada cepa. Las flechas indican la ubicación y el sentido del partidor R06 en la secuencia. Los puntos corresponden a bases idénticas entre las secuencias alineadas.

5.8. PCR en tiempo real para *S. cerevisiae*.

Los partidores y la sonda de hidrólisis fueron diseñados a partir de la secuencia especie específica para *S. cerevisiae*. Los partidores y la sonda se diseñaron utilizando el programa LightCycler Probe Design 2.0 (Roche Applied Science, Alemania) y su secuencia se presenta en la tabla 10. La ubicación de los partidores y la sonda en la secuencia de 170 pb obtenida con el partidor R12 se presenta en la figura 9.

El QPCR para *S. cerevisiae* fue estandarizado en base a especificidad, reproducibilidad y sensibilidad del ensayo. El QPCR desarrollado resultó ser específico para *S. cerevisiae*, no observándose amplificación en especies de levaduras comúnmente encontradas al inicio de la fermentación o en la etapa de maduración del vino (figura 10). El QPCR permitió la amplificación de las cepas comerciales y no comerciales de *S. cerevisiae* incluidas en este estudio (figura 11) y los tamaños de los productos de amplificación fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa observándose un fragmento del tamaño esperado de 104 pb para *S. cerevisiae* (figura 12).

Utilizando el vector pGEM-T (Promega, USA), donde se clonó el fragmento de 104 pb, se determinó que el límite de sensibilidad teórico del ensayo para DNA plasmidial fue de 1 copia/ μ L y el límite de sensibilidad teórico del ensayo para DNA genómico fue de 10 pg. La reproducibilidad del ensayo en DNA plasmidial se realizó amplificando diferentes diluciones de DNA plasmidial en triplicado, observándose una desviación estándar pequeña y un coeficiente de variación de las muestras menor al 1%,

resultados que se presentan en la tabla 12 y que demuestran la alta reproducibilidad del QPCR desarrollado incluso a bajas concentraciones.

Tabla 10. Partidores y sonda de hidrólisis diseñados para el PCR en tiempo real de *S. cerevisiae*.

Nombre	Secuencia 5'--3'	Tm (°C)
SCF1	GGACTCTGGACATGCAAGAT	53.3
SCR1	ATACCCTTCTTAACACCTGGC	54.4
SCTM	6FAM-CCCTTCAGAGCGTTTTCTCTAAATTGATAC-BBQ	62.5

6FAM: 6-carboxifluoresceína
 BBQ: Blackberry® Quenchers

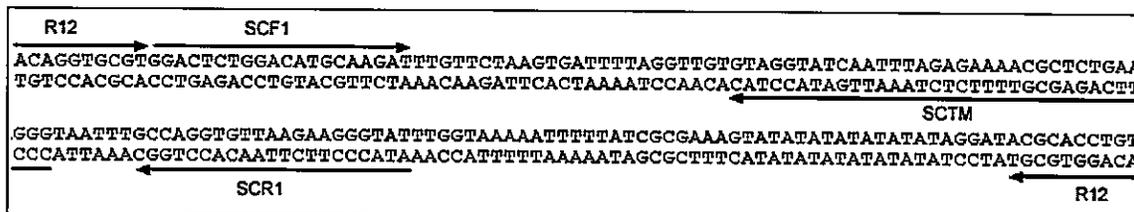


Figura 9. Posición de los partidores y la sonda en la secuencia de 170 pb obtenida con el partidor R12. Se destaca con flechas la ubicación y el sentido de los partidores R12, SCF1 y SCR1, así como también la sonda SCTM.

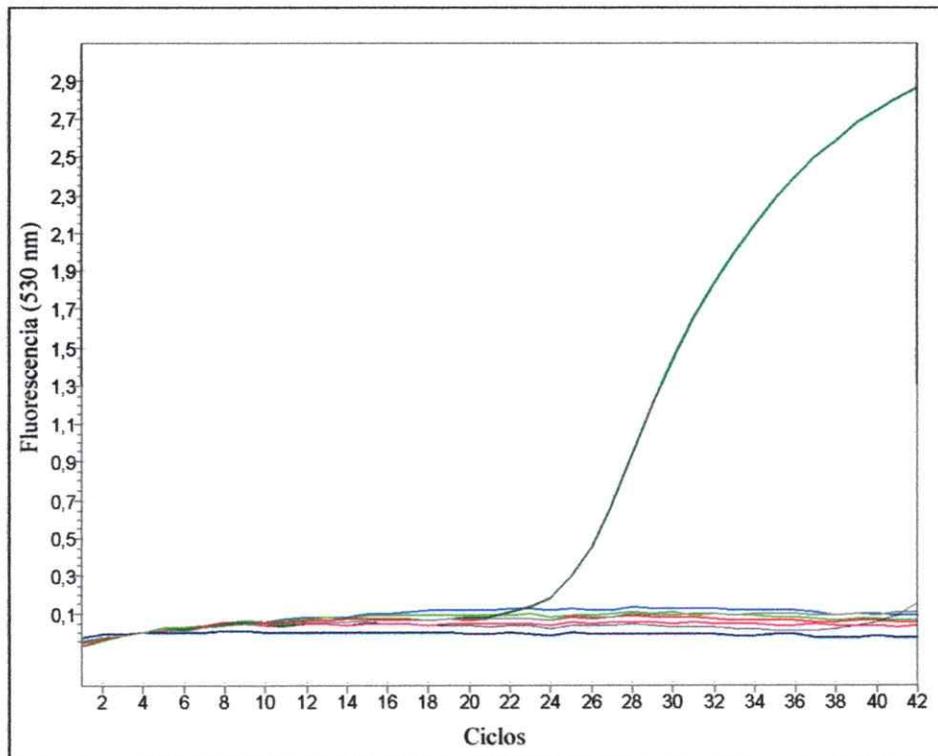


Figura 10. Especificidad del PCR en tiempo real para *S. cerevisiae*.

Curvas de amplificación de la cepa comercial EC1118 de *S. cerevisiae* y otras levaduras vínicas incluidas en el análisis. Colores: ■ EC1118, ■ *Brettanomyces bruxellensis*, ■ *Metschnikowia pulcherrima*, ■ *Pichia anomala*, ■ *Zygosaccharomyces bailii*, ■ *Saccharomyces bayanus*, ■ *Candida boidinii*, ■ control negativo.

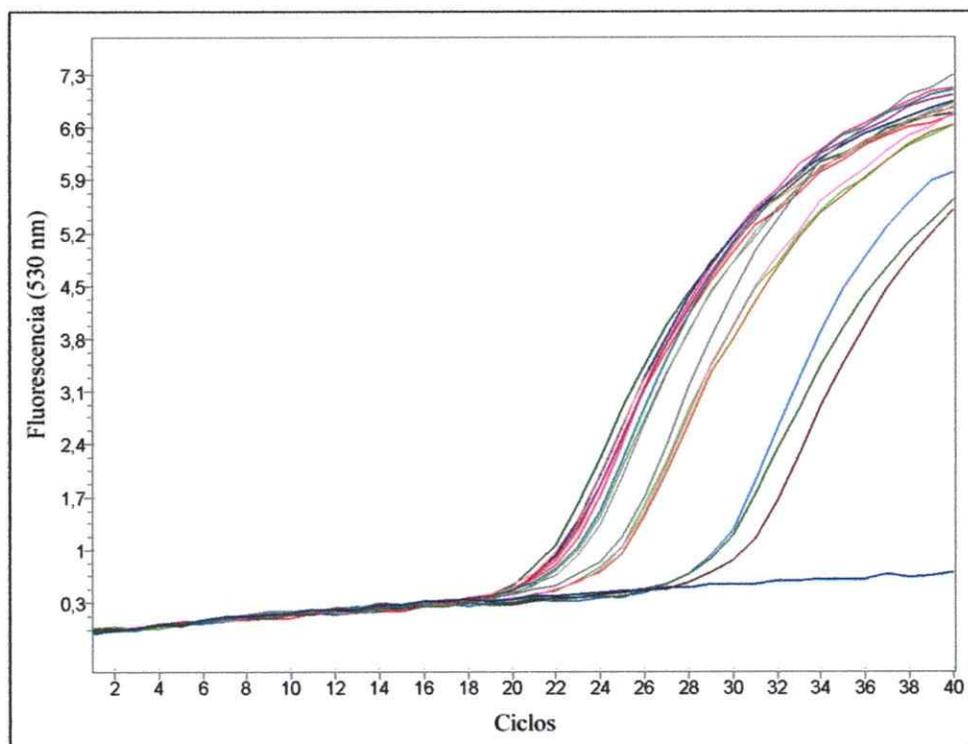


Figura 11. Amplificación por PCR en tiempo real de cepas de *S. cerevisiae*.

Curvas de amplificación para las diferentes cepas comerciales y no comerciales de *S.*

cerevisiae. Colores: ■ VL3, ■ EC1118, ■ Alg804, ■ Fermivin PDM, ■ L-2056, ■ F15,

■ B2000, ■ Killer K1, ■ L-16, ■ L-269, ■ Zymaflore F10, ■ Fermivin 7013, ■ L-281,

■ L-1006, ■ L-1054, ■ Alg100, ■ control negativo.

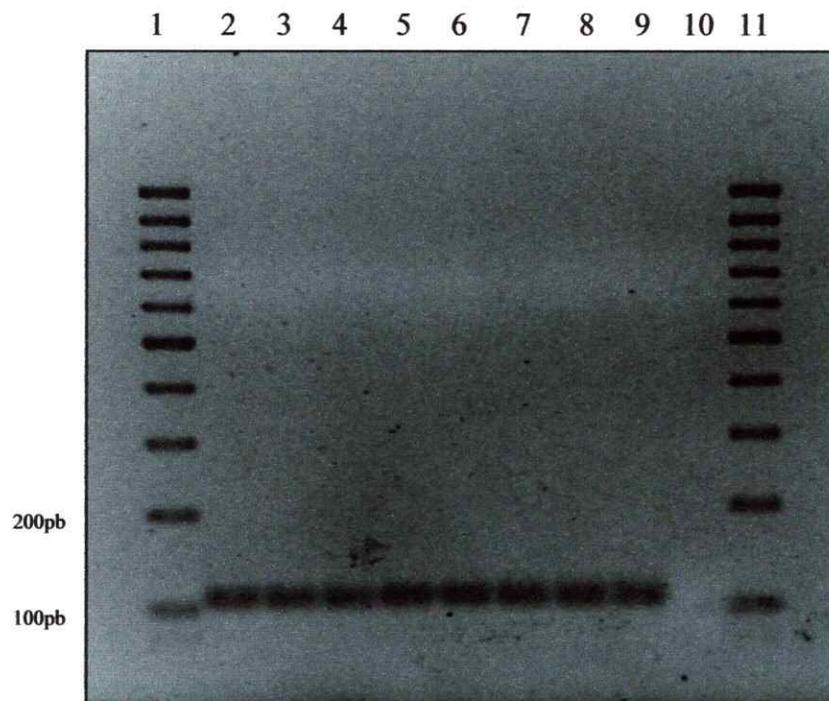


Figura 12. Productos de amplificación por PCR en tiempo real para *S. cerevisiae*.

Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación obtenidos por QPCR para cepas de *S. cerevisiae*. Carriles: 1, marcador de peso molecular de 100 pb; 2, VL3; 3, EC1118; 4, Alg804, 5; Fermivin PDM; 6, L-2056; 7, F15; 8, B2000; 9, Killer K1; 10, control negativo; 11, marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 11. Reproducibilidad del PCR en tiempo real para DNA plasmidial.

Copias/ μ L	Cp* promedio	Desviación estándar del Cp*	Coefficiente de variación **
10^5	21,11	0,07	0,3%
10^4	24,68	0,05	0,2%
10^3	28,03	0,01	0,03%
10^2	31,39	0,21	0,67%

* Cp es el ciclo de amplificación donde la reacción de PCR entra a fase exponencial.

** En cada dilución de DNA plasmidial realizada por triplicado el programa Light Cycler 4.0 (Roche Applied Science, Alemania) calcula el Cp promedio y la desviación estándar. El coeficiente de variación se calcula dividiendo la desviación estándar por el Cp promedio multiplicado por 100.

Con el propósito de obtener curvas de calibración para el ensayo de QPCR desarrollado que permitieran la cuantificación de muestras, se realizaron diluciones seriadas en duplicado desde cultivos puros en medio YPD de la cepa EC1118 con $3,4 \times 10^7$ UFC/mL. El DNA obtenido desde cada dilución fue utilizado como molde para ser amplificado por QPCR observándose amplificación hasta 34 UFC/mL (figura 13). Por otra parte, muestras de mosto y vino fueron artificialmente contaminadas con la cepa EC1118. El mosto fue contaminado con 1×10^7 hasta 1×10^2 UFC/mL y el vino fue contaminado con $7,8 \times 10^6$ hasta 7,8 UFC/mL. El DNA obtenido desde las muestras contaminadas de mosto y vino fue utilizado como molde para la amplificación por QPCR obteniéndose un límite de sensibilidad para mosto y vino de 1000 y 78 UFC/mL, respectivamente. Las curvas de calibración obtenidas para cultivo puro, mosto y vino se presentan en la figura 14 donde se observan los coeficientes de correlación de las curvas. La capacidad cuantitativa del método desarrollado fue evaluada determinando la relación entre la cantidad de levadura cuantificada por QPCR y aquella determinada por conteo en placa, tanto para cultivo puro como muestras de vino contaminadas artificialmente. El resultado obtenido demuestra una correlación entre ambos métodos cuantitativos, lo que indica que el QPCR desarrollado permite una buena determinación de células totales (figura 15).

Finalmente, la aplicación del método fue evaluada en muestras de vinos obtenidos desde viñas nacionales. La cantidad de levadura determinada por QPCR y conteo en placa de cada muestra se presenta en la tabla 13, demostrando la alta capacidad del método de cuantificar la totalidad de células de levaduras presentes en las muestras de vino.

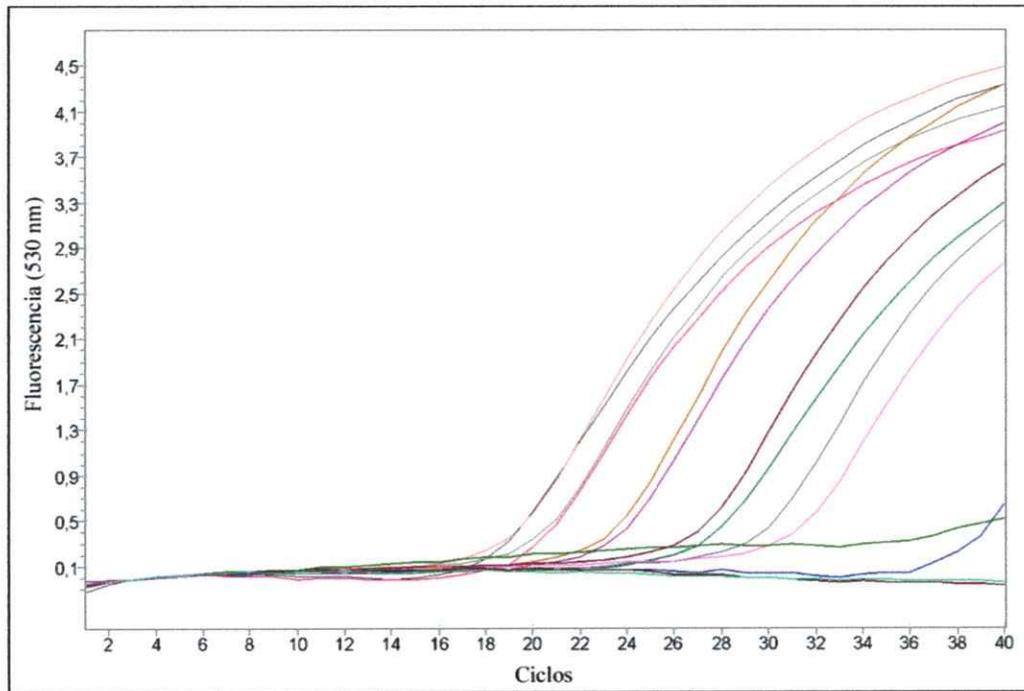


Figura 13. Curvas de amplificación para diluciones seriadas de cultivos puros de *S. cerevisiae* cepa EC1118. Colores de curvas en duplicado (UFC/mL): $3,4 \times 10^6$, $3,4 \times 10^6$, $3,4 \times 10^5$, $3,4 \times 10^5$, $3,4 \times 10^4$, $3,4 \times 10^4$, $3,4 \times 10^3$, $3,4 \times 10^3$, $3,4 \times 10^2$, $3,4 \times 10^2$, $3,4 \times 10^1$, $3,4 \times 10^1$, control negativo de extracción de DNA, control negativo.

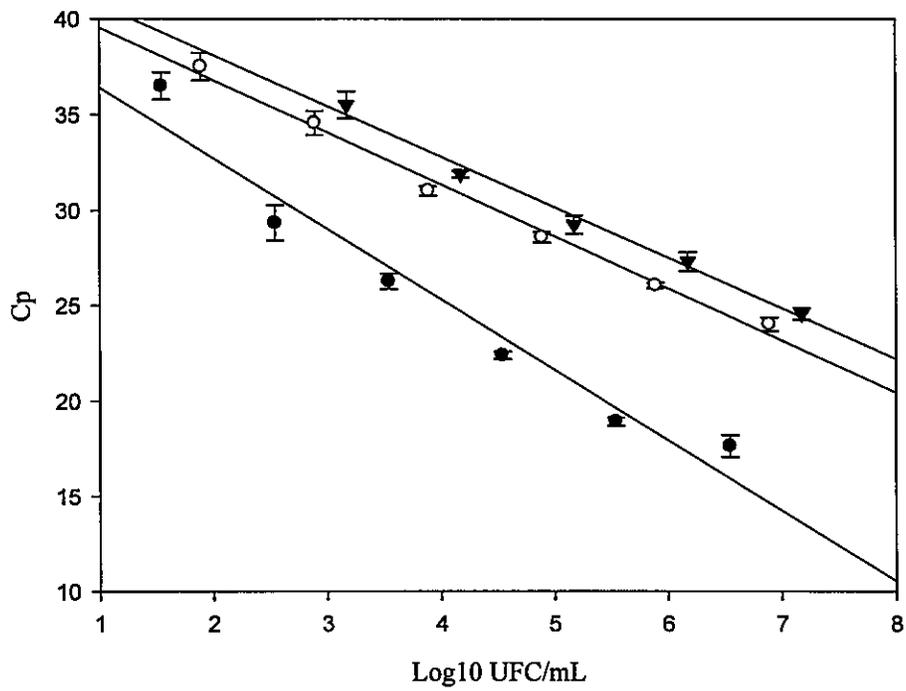


Figura 14. Curva de calibración para *S. cerevisiae* en cultivo puro, mosto y vino.

Se grafica el promedio de los duplicados con su desviación estándar. Los valores de R^2 para cultivo puro (●), mosto (▼) y vino (○) son 0,9632, 0,9969 y 0,9974 respectivamente.

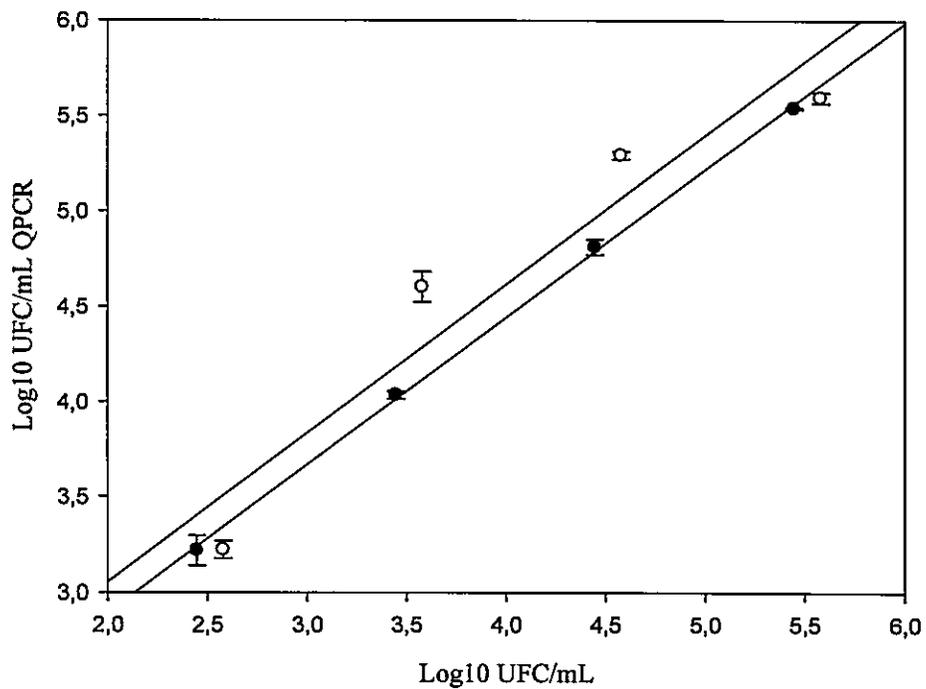


Figura 15. Correlación entre métodos cuantitativos para *S. cerevisiae*.

Cuantificación de *S. cerevisiae* por QPCR y conteo en placa en muestras de vino artificialmente contaminadas. Los valores de R^2 para cultivo puro (●) y vino (○) son 0,9993 y 0,9119 respectivamente. Se grafica el promedio de los duplicados con su desviación estándar.

Tabla 12. Cuantificación de levaduras en muestras de vino mediante conteo en placa y PCR en tiempo real.

Muestra de vino	Conteo en placa*	QPCR*
A	< 1**	1,16x10 ⁴
B	6	8,39x10 ²
C	< 1**	1,09x10 ³
D	< 1**	4,07x10 ¹
E	< 1**	1,1x10 ²
F	440	7,4x10 ³
G	23	8,7x10 ⁴
H	11	1,0x10 ⁵
I	400	5,3x10 ⁴
J	450	1,2x10 ⁴

* Valores en UFC/mL

** No se observa crecimiento en el medio de cultivo.

6.DISCUSION

6.1. Secuencias Intrónicas

S. cerevisiae tiene cerca de 6000 genes y aproximadamente 240 intrones en su genoma, los cuales pueden sufrir cambios en su estructura tales como sustitución de nucleótidos, escisiones, inserciones e incluso presencia o ausencia completa del intrón. La amplificación de intrones ha permitido obtener patrones polimórficos capaces de diferenciar cepas vínicas de *S. cerevisiae* (de Barros Lopes y col, 1996), lo cual hace que las secuencias intrónicas sean un blanco adecuado para la búsqueda de secuencias específicas para cepas en esta especie. Los intrones YDR064, YIL148 e YLR287 fueron seleccionados en base a que el análisis bioinformático demostró que en cepas RM11-1a y YJM789 presentan secuencias que no están en la cepa S288C, además de polimorfismos de un nucleótido (SNP). Sin embargo, la secuenciación de estos intrones en 23 cepas vínicas demostró que aunque existen diferencias puntuales entre sus secuencias, estas diferencias no son suficientes para diseñar partidores y sondas específicas para las cepas vínicas comerciales de interés. Es importante destacar que en la técnica de PCR la especificidad del partidador esta dada principalmente por la hibridación de los 3 o 4 nucleótidos del extremo 3', lo que hace necesaria la búsqueda de 3 o 4 SNPs consecutivos para que el partidador sea específico.

El hecho de que *S. cerevisiae* sea un organismo diploide no hace más compleja la búsqueda de secuencias cepa específicas en el DNA genómico, puesto que un gran número de cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae* son homocigotas (Bradbury y col, 2006) y, por lo tanto, es poco probable que los SNPs se encuentren solo en uno de los cromosomas. Análisis bioinformáticos del genoma nuclear de cepas vínicas utilizando

la base de datos SGRP sugieren la presencia de una alta densidad de SNPs en zonas teloméricas y subteloméricas que podrían ser utilizadas para la obtención de las secuencias deseadas.

6.2. Secuencias del genoma mitocondrial.

La amplificación de diferentes regiones del genoma mitocondrial no permitió obtener productos de amplificación específicos a excepción de la amplificación del intrón *ai5 α* del gen *cox1*. Las secuencias de los productos inespecíficos obtenidos de la amplificación de las regiones intergénicas (8195-9373 pb), (27812-28486 pb), (35445-36539 pb), (48291-48900 pb), (72706-73757 pb) y (78608-79212 pb), no correspondieron a DNA mitocondrial, lo cual se debería a que los partidores diseñados hibridan de forma parcial con zonas del genoma nuclear. El diseño de los partidores se ve afectado por el bajo contenido G+C del genoma mitocondrial, especialmente en zonas intergénicas. Una estrategia alternativa puede ser la purificación del DNA mitocondrial para su uso como molde en las reacciones de PCR, o bien amplificar las zonas intergénicas más pequeñas utilizando partidores que hibriden en zonas codificantes aledañas las cuales tienen un contenido de G+C cercano al 50%. El resultado obtenido no permite descartar que la secuenciación de zonas intergénicas permitan obtener secuencias cepa específicas puesto que estas zonas están involucradas en recombinaciones en el DNA mitocondrial lo cual sugiere la existencia de variabilidad (Piskur y col, 1998).

Las diferencias en el número y posición de los intrones del gen *cox1* utilizado por López y col. (2003) para diferenciar cepas vínicas de *S. cerevisiae* y la información de SNPs entregada por la base de datos del proyecto SGRP hicieron del gen *cox1* un blanco adecuado para la búsqueda de secuencias cepa específicas que permitieran el diseño de los partidores deseados. En el caso del intrón ai5a del gen *cox1*, la amplificación fue específica y la secuenciación de los productos amplificados para las diferentes cepas vínicas correspondió efectivamente al gen *cox1* confirmando que la amplificación de intrones resulta ser mas simple a partir de regiones del DNA mitocondrial que codifican genes, por su mayor contenido de G+C. Lamentablemente, los resultados obtenidos sugieren que las diferencias entre las secuencias del intrón ai5a del gen *cox1* no son suficientes para el diseño de partidores y sondas específicas para las cepas vínicas comerciales de interés, que permitan la cuantificación por QPCR de estas cepas en fermentaciones industriales.

6.3. Secuencias especie y cepa específicas para *S. cerevisiae* mediante RAPD-PCR.

La técnica de RAPD-PCR demostró ser eficiente para la obtención de fragmentos de DNA presentes en todas las cepas de *S. cerevisiae* analizadas, es decir, fragmentos especie específicos. La selección de estos fragmentos polimórficos se realizó en base a tamaño e intensidad, seleccionándose finalmente el obtenido con el partidor R12 de 170 pb (figura 4). El clonamiento y posterior secuenciación de este fragmento permitió obtener una secuencia específica para *S. cerevisiae*, confirmada mediante BLAST. La secuencia obtenida es 100% idéntica a la secuencia encontrada en

las tres cepas de *S. cerevisiae* presentes en bases de datos (S288C, RM11-1α y YJM789). La especificidad de la secuencia a nivel de especie permitió desarrollar partidores y una sonda específica para la especie *S. cerevisiae* que permite la cuantificación de esta levadura mediante QPCR.

Los resultados obtenidos mediante RAPD-PCR permitieron diferenciar a *S. cerevisiae* de otras levaduras (figuras 4 a 7), de acuerdo con lo descrito por otros autores (Andrighetto y col, 2000; Fernández-Espinar y col, 2003). La técnica de RAPD-PCR también ha sido utilizada para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*, sin embargo, es necesario usar un gran número de partidores (Grando y col, 1994; Cocolin y col, 2004). En este trabajo los 34 partidores utilizados lograron diferenciar 7 cepas comerciales, obteniéndose fragmentos de DNA polimórficos cepa específicos que resultaron ser poco reproducibles, constituyéndose en la principal desventaja de la técnica de RAPD-PCR. Las secuencias de los fragmentos cepa específicos poseen diferencias respecto de las secuencias de cepas presentes en las bases de datos, estas diferencias se encuentran en la zona del partidador RAPD (figura 8). Esto permite concluir que la hibridación del partidador fue inespecífica lo que explica la baja reproducibilidad de los fragmentos de DNA polimórficos cepa específicos y que la secuencia de estos se encuentre en otras cepas de la misma especie.

La diferenciación de cepas de *S. cerevisiae* mediante otras técnicas como RFLP del mtDNA (Fernández-Espinar y col, 2001), microsátélites (Bradbury y col, 2006) y amplificación de secuencias interdelta (Legras y Karst, 2003) están ampliamente descritas en la literatura. Sin embargo, estas técnicas se basan en diferencias en sitios de restricción, presencia o ausencia de un locus y número de repetidos de una secuencia en

el genoma, por lo cual estas técnicas al igual que el RAPD-PCR no aseguran que un fragmento de DNA polimórfico entre cepas corresponda a una secuencia cepa específica.

6.4. PCR en tiempo real para *S. cerevisiae*.

La obtención de un fragmento de DNA polimórfico entre especies permitió el diseño de partidores y una sonda de hidrólisis específica para *S. cerevisiae*. El objetivo inicial de desarrollar un QPCR para *S. cerevisiae* fue cuantificar la proporción de levadura comercial respecto del total permitiendo su monitoreo en la fermentación. Sin embargo, las dificultades para encontrar secuencias específicas que favorecieran el diseño de partidores específicos para cada cepa comercial no permitieron desarrollar la metodología en su totalidad, sin embargo, fue posible desarrollar una metodología para cuantificar *S. cerevisiae*.

El ensayo de QPCR desarrollado resultó ser específico para *S. cerevisiae* no observándose amplificación en levaduras como *Brettanomyces bruxellensis* y *Zygosaccharomyces bailii* (figura 10), especies que junto a *S. cerevisiae* se pueden encontrar durante la maduración del vino (Millet y Lonvaud-Funel, 2000; Divol y Lonvaud-Funel, 2005). La sensibilidad del método para DNA plasmidial y DNA genómico de *S. cerevisiae* fue alta alcanzando un límite de detección de 1 copia/ μ L y 10 pg respectivamente. El límite de detección del método para cultivo puro, mosto y vino fue de 34, 1000 y 78 UFC/mL, respectivamente (figura 14). En el caso de cultivo puro y vino el límite de sensibilidad fue similar al descrito por otros autores en reacciones de

QPCR para *S. cerevisiae*, levaduras totales en vino y alimentos pasteurizados (Bleve y col. 2003; Martorell P, y col. 2005; Hierro y col. 2006). Sin embargo, en estos trabajos se utilizó SYBR green como formato de detección, el cual es inespecífico puesto que se une al DNA de doble hebra. El QPCR desarrollado en este trabajo utiliza una sonda de hidrólisis específica para *S. cerevisiae* como formato de detección, lo que representa una ventaja puesto que permite la cuantificación específica del producto de PCR para *S. cerevisiae*. Otra ventaja comparativa del método desarrollado en este trabajo, respecto de los anteriormente mencionados, es su rapidez, el ensayo de QPCR desarrollado solo demora 45 minutos, realizándose el análisis de una muestra de vino en solo 2 horas.

En Chile no existe regulación sobre los niveles de levadura presente en vinos, sin embargo, de acuerdo a la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), de la cual Chile es miembro, un vino se considera libre de microorganismos si la carga es menor a 10^4 - 10^5 UFC/mL para microorganismos que producen sedimentos en suspensión y 10^2 - 10^3 UFC/mL para microorganismos que producen sedimentos floculentos. El método desarrollado en este trabajo es útil para la detección de *S. cerevisiae* en vino puesto que el límite de detección del método está en el rango recomendado por la OIV. En el caso particular de mostos, el límite de detección del método podría considerarse bajo, sin embargo, resulta adecuado considerando que la cantidad de levadura en el mosto al inicio de la fermentación es aproximadamente 10^3 - 10^4 UFC/mL (Xufre y col, 2006).

La reproducibilidad del método para DNA plasmidial resultó ser alta obteniendo coeficientes de variación menores al 1% para las diferentes diluciones de DNA plasmidial (tabla 11). Esto indica que las diferencias de Cp entre los triplicados de cada

dilución son muy bajos demostrando la alta reproducibilidad de la técnica para DNA plasmidial. La reproducibilidad del método en cultivo puro, mosto y vino también fue adecuada según lo sugiere la baja desviación estándar del Cp entre los duplicados (figura 14), esto hace que el coeficiente de correlación (r^2) de las diferentes curvas de calibración sea cercano a 1 (figura 14).

El QPCR desarrollado no discrimina entre células vivas y muertas, sin embargo presenta una buena correlación con la cuantificación mediante conteo en placa de células vivas para muestras artificialmente contaminadas (figura 15). En el caso de muestras de vino obtenidas de viñas, la cuantificación por QPCR sobreestimaría el número de células, cuantificando también las células muertas presentes en la muestra (tabla 12). Sin embargo, la capacidad de *S. cerevisiae* de sobrevivir durante la maduración del vino en un estado VBNC podría explicar en parte las diferencias entre los resultados obtenidos mediante conteo en placa y QPCR. En este mismo sentido, Divol y Lonvaud-Funel (2005) propusieron que la refermentación de los vinos en maduración puede deberse a la capacidad de las levaduras de salir del estado VBNC, lo cual hace del QPCR desarrollado una herramienta útil para prevenir este tipo de problemas en vino.

El método de cuantificación de *S. cerevisiae* en vino desarrollado en este trabajo resultó ser específico, reproducible, sensible y rápido. El límite de detección alcanzado por el método en vino permite cumplir con las recomendaciones de la OIV y aunque el método desarrollado está enfocado a la detección y cuantificación de *S. cerevisiae* en vino, este podría ser adaptado a otros alimentos como yogurt, jugos de frutas y

alimentos pasteurizados, donde la presencia de *S. cerevisiae* produce una baja en la calidad del producto.

7. CONCLUSIONES

- La secuenciación de intrones tanto en el genoma nuclear como mitocondrial permitió diferenciar cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae*, sin embargo, las diferencias de secuencia entre cepas vínicas no son suficientes para el diseño de partidores y sondas específicas para cada cepa comercial seleccionada.

- La técnica de RAPD-PCR permitió diferenciar cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae* obteniendo fragmentos de DNA polimórficos especie específicos y cepa específicos. La secuenciación de los fragmentos de DNA polimórficos permitió obtener una secuencia específica para *S. cerevisiae*, sin embargo, no fue posible encontrar secuencias que permitan el diseño de partidores y sondas específicas para las cepas comerciales seleccionadas.

- El PCR en tiempo real desarrollado permite la detección y cuantificación específica de *S. cerevisiae* de forma rápida, con una sensibilidad que permite la aplicación de la metodología a vinos en maduración, donde la presencia de *S. cerevisiae* produce refermentación del vino disminuyendo su calidad.

8. BIBLIOGRAFIA

Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:5-9.

Ben-Ari G, Zenvirth D, Sherman A, Simchen G, Lavi U, Hillel J. 2005. Application of SNPs for assessing biodiversity and phylogeny among yeast strains. *Heredity* 95:493-501

Bisson, L., Waterhouse, A., Ebeler, S., Walker, M. y Lapsley, J. 2002. The present and Future of the international wine industry. *Nature* 418: 696-699.

Bisson L. 2004. The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology.* 18: 63-69.

Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F, Torriani S. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4116-22.

Bradbury JE, Richards KD, Niederer HA, Lee SA, Rod Dunbar P, Gardner RC. 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89:27-37.

Cavaliere D., Townsend JP., Hartl DL. 2000. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:12369-74.

Cocolin L., Pepe V., Comitini F., Comi G., Ciani M. 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res.* 5:237-45.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A y Guillamón, J. 1997. Analysis of yeast Population during alcoholic fermentation in newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:339-344

Couto B, Eijsma B, Hofstra H, Huis in't Veld JH, van der Vossen JM. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:41-6.

de Barros Lopes M, Soden A, Henschke PA, Langridge P. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4514-20.

- Del Mar Lleo', M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto, P. Canepari. 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4564-4567.
- Divol B, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A. 2006. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *J. Appl. Microbiol.* 100:516-26.
- Divol B, Lonvaud-Funel A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99:85-93.
- Dunn B, Levine RP, Sherlock G. 2005. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics* 16:6-53.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M., Garcia-Maiquez, E., Uruburo, F. Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2056-2061.
- Fernandez-Espinar MT, Lopez V, Ramon D, Bartra E, Querol A. 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70:1-10.
- Fernandez-Espinar M., Barrio E., Querol A. 2003. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast.* 20: 1213-26
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440:325-31.
- Grando M.S., Ubeda J., Briones A.I. 1994. RAPD analysis of wine *Saccharomyces cerevisiae* strain differentiated by field gel electrophoresis. *Biot. Techniques* 8: 557-560.
- Groth C, Petersen RF, Piskur J. 2000. Diversity in organization and the origin of gene orders in the mitochondrial DNA molecules of the genus *Saccharomyces*. *Mol. Biol. Evol.* 17:1833-41.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hierro N, Esteve-Zarzoso B, Gonzalez A, Mas A, Guillamon JM. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7148-55.

- Martorell P, Querol A, Fernandez-Espinar MT. 2005. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6823-30.
- McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and Kjellberg, S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 1-9.
- Millet V, Lonvaud-Funel A. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:136-41.
- Langkjaer RB, Casaregola S, Ussery DW, Gaillardin C, Piskur J. 2003. Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among *Saccharomyces* yeasts. *Nucleic Acids Res.* 31:3081-91.
- Legras JL, Karst F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:249-55.
- Lopez V, Fernandez-Espinar MT, Barrio E, Ramon D, Querol A. 2003. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 81:63-71.
- Oliver, J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. *In* R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Perez-Ortin JE, Garcia-Martinez J, Alberola TM. 2002. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* 98:227-41.
- Perez-Torrado R, Bruno-Barcena JM, Matallana E. 2005. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6831-7.
- Phister TG, Mills DA. 2003 Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7430-4.
- Piskur J, Smole S, Groth C, Petersen RF, Pedersen MB. 1998. Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1015-24.
- Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
- Querol, A., Barrios, E., Huerta, T. y Ramón, D. 1992. Molecular monitoring of the wine Fermentation conducted by active dry yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.

Querol A, Fernandez-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 86:3-10.

Sambrook, J. y Russell, W. D., 2001. "Molecular Cloning", Tercera edición, vol 3-A2.12; A8.19-A8.21.

Varela C, Cardenas J, Melo F, Agosin E. 2005. Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. *Yeast.* 22:369-83.

Xufre A, Albergaria H, Inacio J, Spencer-Martins I, Girio F. 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108:376-84.

9. ANEXO

Anexo 1: Soluciones y medios de cultivo.

i

1. Medio YPD.

Extracto de Levadura	0,5%
Peptona	0,5%
Glucosa	2,0%
Agar*	2,0%
Estreptomicina	200 µg/mL

* Solo para medio sólido

El volumen final es dado con agua destilada y el medio es autoclavado por 15 minutos a 15 psi.

2. Medio LB.

Extracto de Levadura	0,5%
Triptona	1,0%
NaCl	1,0%
Agar*	2,0%
Ampicilina	200 µg/mL

* Solo para medio sólido

El volumen final es dado con agua destilada y el medio es autoclavado por 15 minutos a 15 psi.

3. Solución TAE (Tris-acetato EDTA) 50X.

2M Tris base	242,2 g de tris base
2M Acido acético glacial	57,1 mL de Acido acético glacial
50mM EDTA	18,61 g de Na ₂ EDTA • 2H ₂ O

Ajustar el volumen a 1L con agua destilada.