



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Oenococcus oeni* PRESENTES EN VINOS CHILENOS

Tesis para optar al Grado de Magister en Enología y Vitivinicultura

JULIA ANDREA ROJAS MUÑOZ

Directores de Tesis
CARLA JARA CAMPOS
JAIME ROMERO ORMAZÁBAL

Profesores consejeros
CARMEN PRIETO DURÁN
ÍTALO CHIFFELLE GÓMEZ

SANTIAGO – CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Oenococcus oeni*
PRESENTES EN VINOS CHILENOS

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magister en
Enología y Vitivinicultura

JULIA ANDREA ROJAS MUÑOZ

DIRECTORES DE TESIS

Calificaciones

Carla Jara Campos

Aprobado

Dr. Ingeniero Agrónomo-Enóloga

Jaime Romero Ormazábal

Aprobado

Dr. Bioquímico

PROFESORES CONSEJEROS

Carmen Prieto Durán

Aprobado

Mg. Cs. Ingeniero Agrónomo

Ítalo Chiffelle Gómez

Aprobado

Dr. Bioquímico

Santiago, Chile

2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a dios por su gran misericordia conmigo y mi familia, porque gracias a él todo es posible, aun, cuando las cosas se ven más negras que nunca.

A mi marido, que siempre está a mi lado dándome su apoyo, haciéndome ver cada día que puedo hacer esto y mucho más. A mi pequeña Alfonsina, solo por el hecho de haber llegado a mi vida, llenarla de luz, amor y alegría.

Agradezco a mis padres y hermanos porque siempre y a pesar de todo, están dándome su apoyo, ayudándome desde donde estén.

Quiero agradecer infinitamente a quienes me entregaron el conocimiento y las herramientas durante todo el proceso de magister. Además, agradecer a Carolina Ilabaca por la paciencia y por el apoyo que me brindo durante el periodo de laboratorio. Finalmente y no por ello menos importante, agradezco a los profesores Carla Jara y Jaime Romero por el tiempo que me brindaron durante mi periodo de tesis.

DEDICATORIA

Dedicada a mi familia que son lo más importante en mi vida....

ÍNDICE

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Fermentación maloláctica	1
Bacterias lácticas	2
<i>Oenococcus oeni</i> y la fermentación maloláctica	2
Identificación de bacterias lácticas, mediante técnicas moleculares	3
Diversidad genética a nivel genómico	4
LITERATURA CITADA	6
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE OENOCOCCUS OENI PRESENTES EN VINOS CHILENOS	9
RESUMEN	9
Palabras claves	10
ABSTRACT	11
Keywords	11
INTRODUCCIÓN	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Lugar de estudio	15
Materiales y Equipamiento	15
MÉTODO	17
Muestras de vino	17
Medios y condiciones de cultivo	20
Cepas de referencia y cepas comerciales	21
Extracción de DNA	22
Amplificación de gen 16S rRNA	22
Análisis de restricción de los amplificados de 16S rRNA por	23
PCR-RFLP	
Comparación de aislados chilenos con Cepas Tipo de referencia	23
Secuenciación de los amplificados del gen 16S rRNA	23
Análisis del gen <i>rpoB</i>	23
Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	24
Comparación de aislados chilenos con cepas comerciales	24
Análisis Filogenético	24
RESULTADOS	25
Obtención de aislados de bacterias lácticas de vinos tintos	25

durante fermentación maloláctica espontánea.

Identificación taxonómica de los aislados de bacterias lácticas y
elección de las cepas *Oenococcus oeni*. 26

Caracterización molecular de los aislados chilenos de
Oenococcus oeni mediante secuenciación génica y diferenciación
con cepas comerciales. 28

Análisis Filogenético	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIÓN	36
LITERATURA CITADA	37
APÉNDICES	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Muestras analizadas, Valles Vitivinícolas, Viñas y Cultivar de vino tinto	18
Cuadro 2. Cepas de referencia de bacterias lácticas de la Colección del Laboratorio de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia	21
Cuadro 3. Cepas comerciales de la especie <i>Oenococcus oeni</i> utilizadas en Chile	21
Cuadro 4. Aislados de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea	25
Cuadro 5. Alineamiento de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los 43 aislados nativos de <i>Oenococcus oeni</i> que difieren genéticamente de VP41 (cepa comercial)	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación en diagrama de Venn de <i>O. oeni</i> PSU-1 (rojo), BAA-1163 (amarillo), y AWRI-B429 (azul).	5
Figura 2. Amplificados del gen 16S rRNA de los aislados nativos de bacterias lácticas de valles vitivinícolas de Chile.	26
Figura 3. Análisis de restricción (RFLP) de aislados nativos de bacterias lácticas de valles vitivinícolas chilenos.	27
Figura 4. Amplificación PCR- <i>rpoB</i> de aislados nativos de bacterias lácticas.	28
Figura 5. Árbol filogenético construido a partir de las 43 secuencias de aislados <i>Oenococcus oeni</i> diferentes genéticamente a la cepa comercial VP41.	32

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso clave en la elaboración de vinos que implica la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico y CO₂, resultando una disminución de la acidez total, mayor estabilidad microbiológica y mayor complejidad del vino (Renouf *et al.*, 2006).

La FML puede ocurrir en forma espontánea, permitiendo que actúen las bacterias nativas de la materia prima y del ambiente de producción, o bien, puede ser inducida mediante la inoculación de bacterias lácticas comerciales. La FML espontánea, es a menudo impredecible, pudiendo ocurrir varios meses después de la finalización de la fermentación alcohólica, como también puede que no se lleve a cabo. Este escenario se puede deber a la baja tolerancia de las bacterias lácticas a las condiciones estresantes del vino tales como; bajo pH ($\leq 3,5$), alta concentración de etanol (sobre 12,5% v/v siendo el límite superior tolerado de 14% v/v) y SO₂ (5-10 ppm) (Solieri *et al.*, 2010).

Desde una perspectiva enológica, cada vez es más necesario el control de la FML, con la finalidad de permitir una precisa aplicación de bacterias lácticas o la prevención ante la formación de subproductos que impacten de forma negativa las características organolépticas del vino. Una estrategia de control realizar el proceso de fermentación en forma dirigida (Mills *et al.*, 2005).

En Chile, la fermentación maloláctica es realizada en forma espontánea en la mayoría de las bodegas de vinificación, debido a la falta de cepas de bacterias lácticas seleccionadas que lleven a cabo esta fermentación de manera satisfactoria.

Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (BL) que se encuentran tanto en la uva, instalaciones de vinificación como en los mostos. Pertenecen a un diverso grupo de bacterias que presentan las siguientes características: Gram positivas, no esporuladas y con actividad catalasa negativa. Además las bacterias lácticas, pueden clasificarse según el metabolismo de los azúcares (esencialmente hexosas) en; heterofermentativos, los que sólo producen 50% de ácido láctico más ácido acético, etanol y CO₂; o bien en homofermentativos con un porcentaje de formación de ácido láctico $\geq 85\%$ (Rodas *et al.*, 2003).

Los géneros de bacterias lácticas que se encuentran en el mosto corresponden a *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*. La mayoría de estas especies tienen la capacidad de realizar la fermentación maloláctica. Sin embargo, debido a las condiciones tecnológicas del vino (bajo pH, alta concentración de sulfuroso y etanol), no todas logran proliferar durante la fermentación alcohólica, siendo *Oenococcus oeni* la especie predominante durante la fermentación maloláctica espontánea (Solieri *et al.*, 2010; Izquierdo *et al.*, 2009).

***Oenococcus oeni* y la fermentación maloláctica**

Hasta el año 1995, la especie *Oenococcus oeni*, correspondía a la especie *Leuconostoc oenos*. Sin embargo, ese año Dicks *et al.* (1995) proponen la reclasificación a un nuevo género llamado *Oenococcus* (Mills *et al.*, 2005). Hoy en día, este género está compuesto de dos especies, *Oenococcus oeni* y *Oenococcus kitaharae* (Bridier *et al.*, 2010; Borneman *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, el uso de cultivos comerciales iniciadores de la fermentación maloláctica se ha generalizado con la finalidad de controlar el proceso fermentativo. Siendo *Oenococcus oeni*, la especie más utilizada con este propósito por las empresas de insumos enológicos (Lallemand, Hansen, Lamothe).

La fermentación maloláctica inducida con inóculos seleccionados comerciales disponibles en el mercado, no siempre tienen éxito, ya que las condiciones tecnológicas del vino son muy hostiles para el crecimiento bacteriano. Es por esto, que se recomienda la búsqueda de cultivos nativos de bacterias lácticas *Oenococcus oeni*, con el potencial de adaptarse a las condiciones tecnológicas del vino de una área vitivinícola específica (Ruiz *et al.*, 2010).

En Chile, no se han realizado estudios exhaustivos acerca de la microbiota láctica involucrada en la fermentación maloláctica. Por ello, el presente estudio se enfoca en la identificación y caracterización molecular de aislados nativos de bacterias lácticas de la especie *Oenococcus oeni*, con la finalidad de obtener cepas que puedan ser utilizadas como iniciadoras de la FML en los vinos chilenos.

Identificación de bacterias lácticas, mediante técnicas moleculares

Tradicionalmente, la identificación de especies de bacterias lácticas se ha basado en los rasgos fenotípicos, que incluyen aspectos tales como; morfología, agrupamiento celular, características fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, tras el desarrollo de biología molecular, la mayoría de estas estrategias hoy se encuentran prácticamente en desuso, debido a que son muy laboriosas y la certeza de identificación es limitada (Jara, 2009).

Durante los últimos años, se han desarrollado nuevas estrategias de identificación molecular, basadas en el análisis del DNA (Rodas *et al.*, 2003). La estrategia de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la más utilizada (Blasco, 2009). De acuerdo a lo anterior, se hace necesario mencionar el caso del análisis de restricción de amplificadores del gen 16S rDNA (PCR-RFLP), el cual se ha utilizado para la diferenciación de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos bacterias lácticas en los vinos. El gen 16S rDNA debido a su ubicuidad, es por lo general utilizado para la identificación molecular de las bacterias lácticas (Rodicio y Mendoza, 2004).

La metodología de PCR-RFLP se basa en el desarrollo del PCR que consta del amplificado del DNA, mediante ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Posteriormente, se lleva a cabo el RFLP donde los amplificados son sometidos a digestión por medio de enzimas endonucleasas de restricción (Renouf *et al.*, 2006). Esta estrategia permite diferenciar un número discreto de grupos bacterianos en un ambiente. Generalmente, se puede distinguir a nivel de género. Cabe destacar, que estas técnicas pueden dar como resultado agrupamientos microbianos que no resultan concluyentes taxonómicamente, por lo que se requiere de la comprobación de algunos miembros del grupo mediante procesos como la secuenciación de genes ribosomales (Jara, 2009).

Una estrategia que permite la diferenciación entre cepas, es la secuenciación de genes variables como *rpoB*, que codifican proteínas claves para la replicación del DNA. El gen *rpoB* codifica la subunidad β de la polimerasa, se observa en todas las especies y sólo presenta una copia por cada una, a diferencia del gen 16S que presenta varias copias en una bacteria determinada (Vos *et al.*, 2012). La elección de estos genes se debe a que un análisis de las mutaciones en ellos es más probable que refleje adecuadamente una diferencia genética de las cepas bacterianas, cuando éstas no son distinguibles por 16S (De las Rivas *et al.*, 2004).

Diversidad genética a nivel genómico

Los avances tecnológicos en la secuenciación de genomas han permitido realizar estudios comparativos en los microorganismos, utilizando para ello los datos de secuencia de todo el genoma. En el caso de *Oenococcus*, a partir del análisis de estos conjuntos de datos (secuenciación de todo el genoma), se logra evidenciar que dentro de una especie, los genomas de las cepas individuales son significativamente divergentes entre sí (Borneman *et al.*, 2010). Por lo tanto, son las diferencias en la composición genómica de la cepa las que producen fenotipos diferentes en una especie. En el caso de las bacterias lácticas, está asociado al hecho a que estas bacterias han debido adaptarse a las diversas condiciones

ambientales que se generan en los valles vitivinícolas. El distanciamiento geográfico podría contribuir a la separación de las poblaciones y en consecuencia a acumulación de diferencias en sus genes, tanto por mutaciones como por transferencia lateral (Borneman *et al.*, 2010). De acuerdo a estas diferencias genéticas podrían conferirles características diferentes. Lo anterior se muestra en la Figura 1, correspondiente al estudio realizado por Borneman *et al.*, (2010), quienes compararon tres cepas de *Oenococcus oeni*: PSU-1 aislada en Estados Unidos, AWRI-B429 aislada en Australia y BAA-1163 aislada en Europa. Estas bacterias fueron aisladas de distintos lugares geográficamente distantes, con condiciones geográficas y vitivinícolas diferentes. Las cepas de *Oenococcus oeni*, si bien comparten un núcleo formado por 1216 ORFs (marcos de lectura abiertos), conservados, cada una presenta ORFs específicos, que les confieren características a nivel de producción enológicas distintas (Borneman *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, y considerando que Chile es una isla geográfica y además se encuentra dividida en Valles Vitivinícolas, en este estudio se espera encontrar cepas de *Oenococcus oeni* que presenten diferencias genéticas en relación a los inóculos comerciales presentes en el mercado enológico.

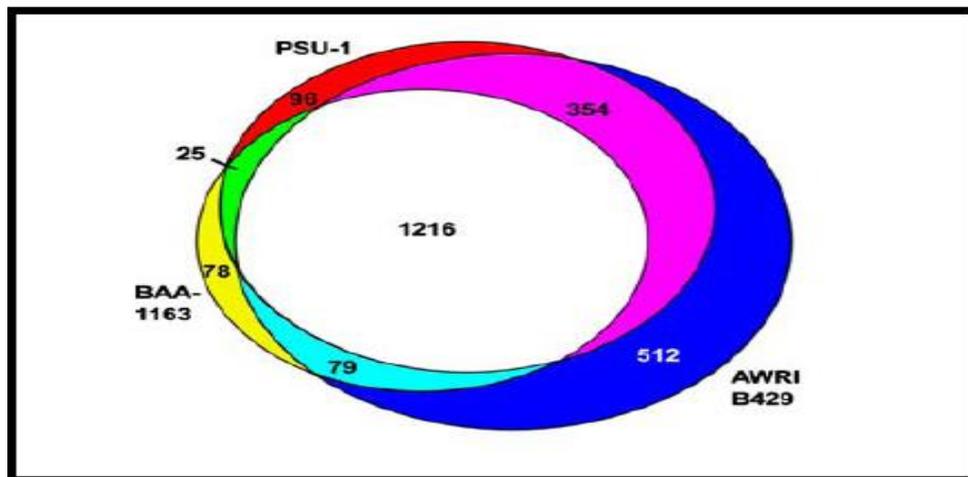


Figura 1. Representación en diagrama de Venn de *O. oeni* PSU-1 (rojo), BAA-1163 (amarillo), y AWRI-B429 (azul). La zona conservada del genoma se encuentra resaltada en blanco (Borneman *et al.*, 2010).

LITERATURA CITADA

Blasco. L. 2009. Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. 173 p

Borneman, A; E, Bartowsky; J, McCarthy and P, Chambers 2010. Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiol biotechnol.* 86: 681-691.

Borneman, A; E, Bartowsky; J, McCarthy and P, Chambers 2013. Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics.* 373: 1-13

Bridier, J; O, Claissie; M, Coton; E, Coton and A. Lonvaud-funel. 2010. Evidence of Distinct Populations and Specific Subpopulations within the Species *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 76: 7754-776

De Las Rivas, B; A. Marcobal; R. Muñoz. 2004. Allelic Diversity and Population Structure in *Oenococcus oeni* as Determined from Sequence Analysis of Housekeeping Genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 70: 7210-7219

Izquierdo, P.; P, Ruiz; S, Seseña and M, Herreros 2009. Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 3: 220-224

Jara, C. 2009. Tesis doctoral. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universitat Rovira i Virgili. 185 p

Mills, D; H, Rawsthorne; C, Parker; D, Tamir and K, Makarova. 2005. Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Review*. 29: 465-475

Renouf, V; O, Claisse; C, Miot-Sertier and A, Lonavud-Funel. 2006. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*. 23: 136-145

Rodas, A: S, Ferrer and I, Pardo. 2003. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 412-422

Rodicio, M and M, Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22: 238-245

Ruiz, P; P, Izquiero; S, Seseña and M, Llanos. 2010. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*.137: 230-235

Solieri, L; F, Genova; M, De Paola and P, Giudici. 2010. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 285-298

Vos, M; CH, Quince; A, Pijl; M, De Hollander and G, Kowalchuk. 2012. A Comparison of *rpoB* and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing. *Studies of Bacterial Diversity. Plos One*. 7: 1-8

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Oenococcus oeni* PRESENTES EN VINOS CHILENOS

RESUMEN

Las bacterias lácticas (BL), principalmente la especie *Oenococcus oeni*, son sido consideradas fundamentales para la realización de la fermentación maloláctica (FML). Este proceso es realizado durante la vinificación, con la finalidad de disminuir la acidez de los vinos, mejorar la estabilidad microbiológica y aumentar aporte aromático. En la mayoría de las bodegas en Chile, la FML se realiza en forma espontánea, haciendo muy limitado, tanto el control microbiológico como la cinética de dicha fermentación. A pesar de su importancia, no hay antecedentes de estudios ecológicos realizados durante la FML y por ende no se encuentran referencias de cepas de esta especie bacteriana que estén adaptadas a las condiciones tecnológicas de la producción del vino chileno. Es en base a esto, que se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización fenotípica de aislados chilenos de *Oenococcus oeni* y posterior comparación génica con inóculos comerciales de dicha especie y cepas tipo, aplicando para ello estrategias de identificación moleculares. Como resultado, se logró obtener aislados de cepas de bacterias lácticas *Oenococcus oeni* en FML espontánea de vinos chilenos.

Los aislados de bacterias lácticas estudiados provinieron de vinos tintos de diferentes Valles Vitivinícolas de Chile (Elqui, Limarí, Maipo, Casablanca, San Antonio, Rapel, Curicó, Maule, Itata) y diferentes cultivares Cabernet Sauvignon, Carménère, Merlot, Syrah, Pinot Noir y Carignan). La microbiota láctica presente en dichas muestras se analizó empleando dos medios de cultivo: agar MRS modificado y medio agar MLO. A continuación, los aislados fueron identificados taxonómicamente mediante una estrategia molecular basada en PCR-RFLP del gen 16S rRNA, y la comparación de perfiles de restricción de los aislados chilenos con cepas tipo de referencia correspondientes a *Oenococcus*. Una vez identificados como *Oenococcus*, los aislados fueron caracterizados

molecularmente mediante el análisis de secuencias del gen *rpoB* y posterior comparación con cepas comerciales.

De la identificación taxonómica basada en PCR-RFLP del gen 16S rRNA, se obtuvieron 143 aislados nativos de bacterias lácticas, de los cuales 33 aislados correspondieron a cepas nativas de *Oenococcus oeni* diferenciadas genéticamente respecto de las cepas comerciales.

Palabras claves: Bacterias lácticas, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Fermentación maloláctica

ABSTRACT

The lactic bacteria (LB), mainly *Oenococcus oeni* specie, have been considered as very important for the realization of the malolactic fermentation (MLF). This process is realized during winemaking, with the aim of decrease the acidity, improve the microbiology stability and increase the aromatic factor in wines. At most of the Chilean wineries, the MLF is done spontaneously, making very limited the microbiological control as the kinetics of the fermentation. Despite of its importance, there is not much data regarding ecological studies realized during MLF, therefore, there are not reference of these bacteria strains been adapted to the specific Chilean winemaking conditions. Is for this reason that a study has been conducted, with the isolation and phenotypic characterization of the Chilean *Oenococcus oeni* isolated, and furthermore, their gene were compared with commercial inoculum of this specie and type strains, by applying molecular identification strategies. As results, isolated of lactic acid bacteria strain of *Oenococcus oeni* was obtained from Chilean wines.

The MLF wines studied came from different wine valleys from Chile (Elqui, Limari, Maipo, Casablanca, San Antonio, Rapel, Curico, Maul, Itata), and from different grape varieties (Cabernet Sauvignon, Carménère, Merlot, Syrah, Pinot Noir y Carignan). The lactic microbiology present in those samples were analyzed using two media culture: Modified agar MRS and Medium agar MLO. Following, the isolates were taxonomically identified by a molecular technic based on PCR-RFLP of the 16S rRNA gene and comparing restriction profiles of the Chilean isolates with reference strains profiles corresponding to *Oenococcus*. Once these were identified as *Oenococcus*, the isolated were molecular characterized using the *rpoB* gene analysis and furthermore there were compared with commercial strains.

As result of the taxonomic identification based on PCR-RFLP 16S rRNA gene, 143 isolates of native lactic bacteria were obtained, of which 33 isolated corresponded to native strains of *Oenococcus oeni* genetically distinct over trader lactic bacterias.

Keywords: Lactic bacteria, Polymerase chain reaction (PCR), Malolactic fermentation

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BL) se encuentran en una gran variedad de hábitats, incluyendo uvas y vino (Rodas *et al.*, 2003). *Oenococcus oeni* es la principal especie identificada durante la fermentación maloláctica espontánea, debido a su mayor tolerancia a las condiciones adversas generadas durante el proceso de vinificación; bajo pH (≤ 3.5), alta concentración de etanol (sobre 12.5% v/v siendo el límite superior tolerado de 14% v/v) y SO₂ (5-10 ppm). Es por esto, que los cultivos iniciadores para la fermentación maloláctica se componen principalmente de esta especie (Ruiz *et al.*, 2010).

El inicio de la fermentación maloláctica con cepas *Oenococcus oeni* disponibles en el mercado no siempre tiene éxito. Debido a dichas experiencias, se ha estudiado, el uso de cultivos autóctonos de bacterias lácticas adaptadas a las condiciones de un área vitivinícola específico (Ruiz *et al.*, 2010).

La fermentación maloláctica es una de las principales etapas en la elaboración de vino tinto. En este proceso las bacterias lácticas pueden estar presentes de forma espontánea o agregadas posterior a la fermentación alcohólica (Ruiz *et al.*, 2010). Llevando a cabo la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico y CO₂, resultando en la desacidificación y estabilidad microbiológica del vino (Solieri *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, la identificación de las especies de bacterias lácticas se ha basado en los rasgos fenotípicos. La alternativa a estos métodos tradicionales de identificación, han sido las estrategias moleculares, atrayendo la atención de muchos investigadores durante los últimos años (Rantsiou *et al.*, 2004), como estrategias, basadas en el análisis y secuenciación del DNA (Rodas *et al.*, 2003). Una de las metodologías utilizadas el PCR-RFLP se basa en el desarrollo del PCR que consta del amplificado del DNA, mediante ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Posteriormente, se realiza la digestión de los amplificados por medio de enzimas endonucleasas de restricción, pudiendo

alcanzar con esto, la identificación de las bacterias lácticas a nivel de género (Renouf *et al.*, 2007).

Una de las estrategias que permite la diferenciación entre cepas, es la secuenciación de genes variables como *rpoB*, el cuál codifica la subunidad β de la polimerasa. Este gen, se observa en todas las especies y sólo presenta una copia por cada una, a diferencia del gen 16S rRNA que presenta varias copias en una bacteria determinada (Vos *et al.*, 2012).

Por lo anteriormente expuesto, en esta investigación se aplicaron métodos moleculares, basados en el gen 16S rRNA, y en el análisis de secuencia del gen *rpoB* con el fin de identificar y diferenciar con precisión los aislados de *Oenococcus oeni* presentes en los vinos chilenos. Con estas estrategias, se busca diferenciar los aislados nativos de las cepas de *Oenococcus oeni* de los inóculos bacterianos comercializados en el país.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los aislados chilenos de *Oenococcus oeni* presentan diferencias genéticas con respecto a las cepas comerciales.

OBJETIVOS

- **General**

Diferenciación genética de aislados chilenos de *Oenococcus oeni* respecto a cepas comerciales.

- **Específicos**

1- Obtener aislados de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

2- Identificación taxonómica de los aislados de bacterias lácticas y elección de las cepas *Oenococcus oeni*.

3- Caracterización molecular de los aislados mediante secuencias génicas (gen *rpoB*) y diferenciación con cepas comerciales de *O. oeni*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Las pruebas moleculares realizadas a las bacterias lácticas *Oenococcus oeni* fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología (Mecesusup) del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) y en laboratorio de Microbiología Enológica del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas, ambos dependientes de Universidad de Chile.

Materiales y Equipamiento

Materiales

Medios de cultivo: MRS (Man, Rogosa y Sharpe) 52.2 g/L, Agar 20 g/L, Fructosa 5 g/L, Ácido málico 4g/L, Jugo de tomate 30 mL/L, (De Man *et al.*, 1960)

Medio MLO (Medio *Leuconostoc oeni*): Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Glucosa 10 g/L, Fructosa 5 g/L, Citrato de amonio 3.5 g/L, Solución de sales (MnSO₄ y MgSO₄) 10 mL/L, Twen 80 1mL/L. Jugo de tomate 300 mL/L, Agar-agar 20 g/L (Blasco, 2009)

Extracción de DNA: Se utilizó el Kit comercial Wizard (Promega), siguiendo protocolo de fabricante.

Amplificación de DNA molde: Para la amplificación del gen 16S rRNA y gen *rpoB*, se utilizaron los mismos materiales exceptuando los partidores.

Mix PCR: Buffer 5X de enzima Gotaq Polimerasa (Invitrogen) 0,05U/μL, MgCl₂ (Invitrogen) 25 mM, Nucleótidos fosfatados (DNTP`S) 0,2 mM, Enzima Gotaq polimerasa (invitrogen). Para amplificación del gen 16S partidores universales

341R y 788F 0,25 pmol/ μ L de cada uno. Para gen *rpoB* partidores específicos RpoB-B1 y RpoB-B2 descritos por Bridier *et al.*, (2010).

Restricción de amplificados de 16S rRNA (RFLP): Buffer (New England Biolabs, USA), Enzimas endonucleasas de restricción XMN 1 y TSP R1 (New England Biolabs, USA), Muestra de DNA amplificado del gen 16S, Agua libre de nucleasas.

Electroforesis: Amplificados de PCR gen 16S rRNA; gel de poliacrilamida 8%, Solución de Nitrato de plata para el revelado de los geles, Marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen)

Productos de RFLP; Gel de poliacrilamida 10%, Solución de Bromuro de Etidio 1 μ g/mL, Marcadores de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

Equipamiento

- Termociclador (ESCO Swift Max Pro. Genexpres)
- Cámara de Electroforesis para gel de poliacrilamida Mini Protean 3 Cell (BioRad)
- Baño termoregulado (GFL 1092-Gesellschaft LabortechnikmbIt D3006).
- Termociclador
- Transiluminador UV, (Vilber Lourmat.
- Transiluminador de luz blanca.

Método

Muestras de vino

Se recolectaron muestras en botellas de 750 mL de vino tinto en fermentación maloláctica espontánea de distintas bodegas de vinificación (1 botella por bodega), de 9 Valles Vitivinícolas de Chile. En el cuadro 1, se visualizan las 72 muestras, agrupadas por Valles Vitivinícolas y por cultivar analizado. Estas muestras fueron tomadas con utensilios estériles o rociados con etanol al 70% v/v y flameadas. Las muestras se mantuvieron a 4°C, para luego ser sembradas en medios de cultivos específicos para bacterias lácticas.

Cuadro 1. Muestras analizadas, Valles Vitivinícolas, Viñas y Cultivar de vino tinto.

Código	Valle	Cultivar
161306	Elqui	Syrah
010106 A	Maipo	Syrah
010102	Maipo	Merlot
010101 A	Maipo	Cabernet Sauvignon
010109	Maipo	Petit Verdot
020101-1	Maipo	Cabernet Sauvignon
020101-8	Maipo	Cabernet Sauvignon
030101 sj	Maipo	Cabernet Sauvignon
030101 hq	Maipo	Cabernet Sauvignon
040102	Maipo	Merlot
040101	Maipo	Cabernet Sauvignon
040105	Maipo	Tintorera
120101	Maipo	Cabernet Sauvignon
120106	Maipo	Syrah
160101 A	Maipo	Cabernet Sauvignon
160101 B	Maipo	Cabernet Sauvignon
160101 C	Maipo	Cabernet Sauvignon
150107 A	Maipo	Carmenere
150101	Maipo	Cabernet Sauvignon
150107 B	Maipo	Carmenere
160101 D	Maipo	Cabernet Sauvignon
010101 C	Maipo	Cabernet Sauvignon
010104	Maipo	Pinot noir
010106 B	Maipo	Syrah
010101 B	Maipo	Cabernet Sauvignon
010304	Casablanca	Pinot noir
080304 A	Casablanca	Pinot noir
080304 B	Casablanca	Pinot noir
080304 C	Casablanca	Pinot noir
080304 D	Casablanca	Pinot noir
080304 E	Casablanca	Pinot noir
120306	Casablanca	Pinot noir
120304	Casablanca	Pinot noir
150303	Casablanca	Cabernet Franc
150302	Casablanca	Merlot
010302	Casablanca	Merlot
060806	Rapel	Syrah
070801	Rapel	Cabernet Sauvignon
120804	Rapel	Pinot noir

(Continua)

Cuadro 1. Continuación

Muestras analizadas, Valles Vitivinícolas, Viñas y Cultivar de vino tinto.

Código	Valle	Cultivar
050801 A	Rapel	Cabernet Sauvignon
050801 B	Rapel	Cabernet Sauvignon
050801 C	Rapel	Cabernet Sauvignon
050801 D	Rapel	Cabernet Sauvignon
120807	Rapel	Carmenere
140801	Rapel	Cabernet Sauvignon
140802	Rapel	Merlot
160801	Rapel	Cabernet Sauvignon
170807	Rapel	Carmenere
100701	Curicó	Cabernet Sauvignon
160701	Curicó	Cabernet Sauvignon
061001	Maule	Cabernet Sauvignon
061003	Maule	Cabernet Franc
061010	Maule	Carignan
091003	Maule	Cabernet Franc
091010	Maule	Carignan
101006	Maule	Syrah
051001 A	Maule	Cabernet Sauvignon
051001 D	Maule	Cabernet Sauvignon
051001 B	Maule	Cabernet Sauvignon
121010	Maule	Carignan
141001	Maule	Cabernet Sauvignon
161007 A	Maule	Carmenere
161007 B	Maule	Carmenere
161006	Maule	Syrah
161007 C	Maule	Carmenere
061101	Itata	Cabernet Sauvignon
050407 A	Limarí	Carmenere
050407 B	Limarí	Carmenere
050407 C	Limarí	Carmenere
050407 D	Limarí	Carmenere
130406	Limarí	Syrah
121206	San Antonio	Syrah

Medios y condiciones de cultivo

Las muestras de vino fueron sembradas mediante la técnica de agotamiento, se utilizaron dos medios sólidos de cultivo.

1. Medio MRS descrito por De Man *et al.*, (1960) modificado con ácido málico, fructosa y jugo de tomate (anexo 1)
2. Medio MLO descrito por Blasco., 2009 (anexo 1)

Los medios de cultivo debieron ser suplementados con Azida Sódica (2 mL/L) y Ciclohexamida (3 mL/L), con la finalidad de inhibir el crecimiento de levaduras y bacterias acéticas, respectivamente (Ruiz *et al.*, 2008).

Una vez sembradas las muestras, las placas fueron incubadas a 28°C entre 5-7 días en cámara en anaerobiosis. Cumplido el tiempo de incubación y obtenido crecimiento bacteriano, se procedió al recuento de colonias crecidas en las placas, conteo expresado en UFC/mL. Para la selección morfológica de las bacterias lácticas, se realizaron pruebas fenotípicas de prueba de la Catalasa y Tinción Gram. Posteriormente, se procedió a la observación al microscopio de las colonias analizadas.

A continuación, se realizó el aislamiento de las colonias de morfología diferente correspondientes a cada muestra sembrada, entre las diferencias consideradas estuvo el tamaño, forma y coloración de las colonias crecidas en las placas petri. Una vez realizado el aislado de las colonias, las placas se incubaron por un periodo de 5-7 días a una temperatura de 28°C.

Los cultivos aislados se almacenaron a 17°C, hasta su posterior análisis.

Cepas de referencia y cepas comerciales

Para comparar e identificar las bacterias *Oenococcus oeni* presentes en las muestras, se utilizaron cepas de referencia de dicha especie, las cuales corresponden a cepas de referencia de la Colección Española de Cepas Tipo (CECT) (cuadro 2).

En relación a las cepas comerciales (Casa comercial Lallemand), se adquirieron cepas de la especie *Oenococcus oeni*, las que posteriormente fueron comparadas genéticamente con las cepas de los aislados (cuadro 3).

Cuadro 2. Cepas de referencia de bacterias lácticas de la Colección del Laboratorio de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

Especie	Cepa
<i>Oenococcus oeni</i>	3875
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4258
<i>Pediococcus parvulus</i>	4210
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3804

Cuadro 3. Cepas comerciales de la especie *Oenococcus oeni* utilizadas en el estudio.

Empresa	Cepa	Alcohol(%v/v)	pH	T(°C)
LALLEMAND	Lalvin 31®	14	>3,1	13°
	Lalvin ICV Elios 1®	15,5	>3,4	18°
	Lalvin MTO1 ®	12,5	>2,9	15°
	Lalvin VP 41®	16	>3,1	16°
	PN4®	15,5	>3	16°
	Uvaferm Alpha ®	15,5	>3,2	14°
	Uvaferm Beta ®	15	>3,2	14°

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el mismo método, tanto para los aislados de las muestras, como para las cepas de referencia e inóculos comerciales. Para ello se recurrió al kit comercial Wizard (Promega), realizando la extracción en base a las indicaciones del fabricante. El DNA extraído se mantuvo a -20°C , hasta su posterior análisis.

Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del DNA fue realizada mediante la técnica molecular PCR, para el gen 16S rRNA.

Para esta amplificación se utilizaron los partidores universales; 341F y 788R, según lo describe Ilabaca *et al.* (2008).

La reacción PCR se realizó disponiendo de un volumen total de mezcla de 30 μL para cada muestra, buffer 5X, ; MgCl_2 25 mM; mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0,2 mM; primers 341F y 788R 0,25 pmol/ μL de cada uno; Taq Polimerasa 0,05U/ μL , 1 μL de DNA molde completando el volumen con agua libre de nucleasas.

El programa utilizado fue llevado a cabo bajo las condiciones descritas por Espejo *et al.* (1998).

Los amplificados obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, utilizando marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen). Para la electroforesis del gel cargado con los amplificados, éste fue sometido a 200 volt por 20 minutos, utilizando como medio de transferencia TBE 1X. Los geles fueron revelados con nitrato de plata 1X (AgNO_3), de acuerdo a lo descrito por Espejo y Escanilla (1993). Posteriormente éstos fueron visualizados en un transiluminador de luz blanca y fotografiados.

Análisis de restricción de los amplificadores de rDNA por PCR-RFLP

Los amplificadores del gen 16S, fueron digeridos con las enzimas de restricción *XMN1* y *TSP R1* (New England Biolabs, USA), siguiendo las indicaciones de Ilabaca et al., 2014. Los perfiles de restricción obtenidos fueron observados en un transiluminador con luz UV, para luego ser fotografiados y analizados.

Comparación de aislados chilenos con Cepas Tipo de referencia

Una vez obtenidos los perfiles de restricción (PCR-RFLP 16S rRNA) tanto de los aislados de las muestras de vino como de las cepas de referencia, se procedió a compararlos, con la finalidad de identificar la o las bacterias del género *Oenococcus* presentes en las muestras de vinos chilenos.

Secuenciación de los amplificadores del gen 16S rRNA

Los amplificadores del gen 16S rRNA que resultaron ser del género *Oenococcus*, debieron ser enviados al Laboratorio MACROGEN (Korea) para su secuenciación y posterior análisis confirmatorio de identificación.

Análisis del gen *rpoB*

Una vez realizada la identificación taxonómica de los aislados nativos, se procedió al análisis de secuenciación del gen *rpoB*, con la finalidad de evaluar la diversidad entre los aislados *Oenococcus oeni*. Para ello, se realizó una amplificación mediante la misma metodología de PCR descrita anteriormente para el gen 16S rRNA, modificando el programa de amplificación del gen *rpoB* (Bridier et al., 2010). Se utilizaron partidores específicos descritos por Bridier et al, (2010).

Secuenciación del gen *rpoB*

Una vez obtenidos los amplificadores del gen *rpoB* se procedió a la secuenciación de éstos y a su posterior análisis comparativo. Para lo anterior, los amplificadores fueron enviados al Laboratorio MACROGEN (Korea) para ser secuenciados.

Comparación de aislados chilenos con cepas comerciales

Una vez identificadas las bacterias *Oenococcus oeni* presentes en los vinos analizados, se llevó a cabo la comparación génica entre éstas y las cepas comerciales, mediante el análisis de las secuencias génicas del gen constitutivo *rpoB*. De esta manera, se puede corroborar que las bacterias lácticas obtenidas de las muestras sean diferentes de las comerciales y a su vez entre ellas mismas. Dicha comparación se realizó utilizando el programa BioEdit, donde se puede visualizar y alinear las secuencias génicas de los aislados y de las cepas comerciales para posteriormente ser comparadas.

Análisis filogenético

Se construyó un dendograma simple a partir de las 33 secuencias de aislados nativos genéticamente diferentes a la cepa comercial VP41, obtenidas de la amplificación del gen *rpoB*. Para esto, se utilizó el programa MEGA versión 6.0.6. El árbol filogenético para las secuencias tipo de *rpoB*, fue construido por el método Neighbor-joining, con un modelo de máxima probabilidad compuesta (“maximum composite likelihood”).

RESULTADOS

Obtención de aislados de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Se analizó un total de 72 muestras de vino de Vendimia 2012, provenientes de 9 Valles Vitícolas de Chile (Elqui, Limarí, Maipo, Casablanca, San Antonio, Rapel, Curicó, Maule e Itata). Del total de muestras (72), se observó crecimiento positivo en los 2 medios de cultivo probados, siendo el medio más efectivo MLO. Mediante los criterios fenotípicos se consiguió 144 aislados nativos de bacterias lácticas, como resultado de la elección al azar de 2 aislados por muestra. El cuadro 4, muestra el resumen de los aislados obtenidos, detalle de este en Anexo 2.

Cuadro 4. Aislados de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Valle	Cantidad de aislados	Bodegas de vinificación	Cultivares
Elqui	2	San Pedro	Syrah
Limarí	10	Santa Rita; Tamaya	Carmenere; Syrah
Maipo	47	Concha y Toro; Haras de Pirque; William Fevre; Cousiño Macul; Carmen; San Pedro; Morandé	Cabernet sauvignon; Carmenere; Syrah; Merlot; Pinot noir; Petit verdot; Tintorera
Casablanca	22	Concha y Toro; Matetic; Emiliana; Carmen; Morandé	Syrah; Pinot noir; Cabernet franc; Merlot
San Antonio	2	Emiliana	Syrah
Rapel	23	Quintay; Casas del bosque; Emiliana; Santa Rita; Carmen; Nativa; San Pedro; Koyle	Cabernet sauvignon; Syrah; Pinot noir; Merlot; Carmenere
Curicó	4	Requingua; San Pedro	Cabernet sauvignon
Maule	32	Quintay; Lomas de Cauquenes; Requingua, Santa Rita; Carmen; Nativa; San Pedro; Morandé	Cabernet sauvignon; Carignan; Syrah; Carmenere; Cabernet franc
Itata	2	Quintay	Cabernet sauvignon

Identificación taxonómica de los aislados de bacterias lácticas y elección de las cepas *Oenococcus oeni*.

Los 144 aislados nativos, se identificaron mediante la amplificación del gen 16S rRNA y posterior análisis de restricción (PCR-RFLP). Con ello, se permitió evidenciar que el 100% de los aislados corresponde a bacterias lácticas. Los perfiles obtenidos fueron comparados con una cepa de referencia correspondiente a *Oenococcus oeni* lo que permitió identificar a 143 aislados como pertenecientes al género *Oenococcus* (99% del total de aislados). Siendo el aislado diferente correspondiente a *Lactobacillus brevis* (dato no mostrado)

Las figuras 2 y 3, muestran la amplificación del gen 16S rRNA y el análisis de restricción de algunos de los aislados nativos de bacterias lácticas del género *Oenococcus*.

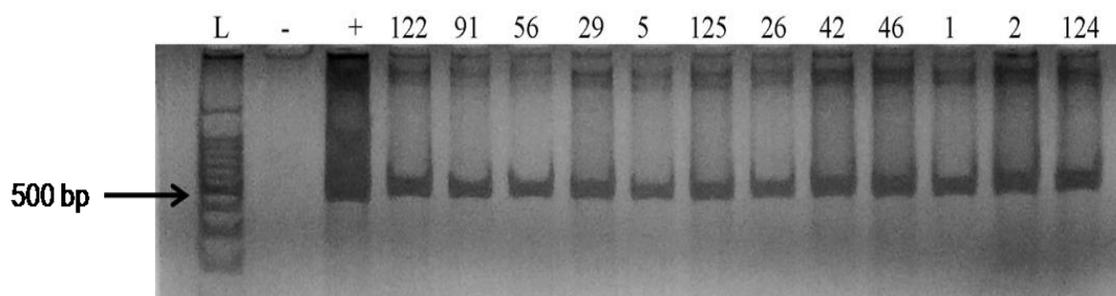


Figura 2. Amplificados del gen 16S rRNA de los aislados nativos de bacterias lácticas de Valles Vitivinícolas de Chile. Carril L, Marcador de peso molecular 100bp; carriles (-1) control negativo, (+) control positivo y carriles con números amplificado de los aislados nativos.

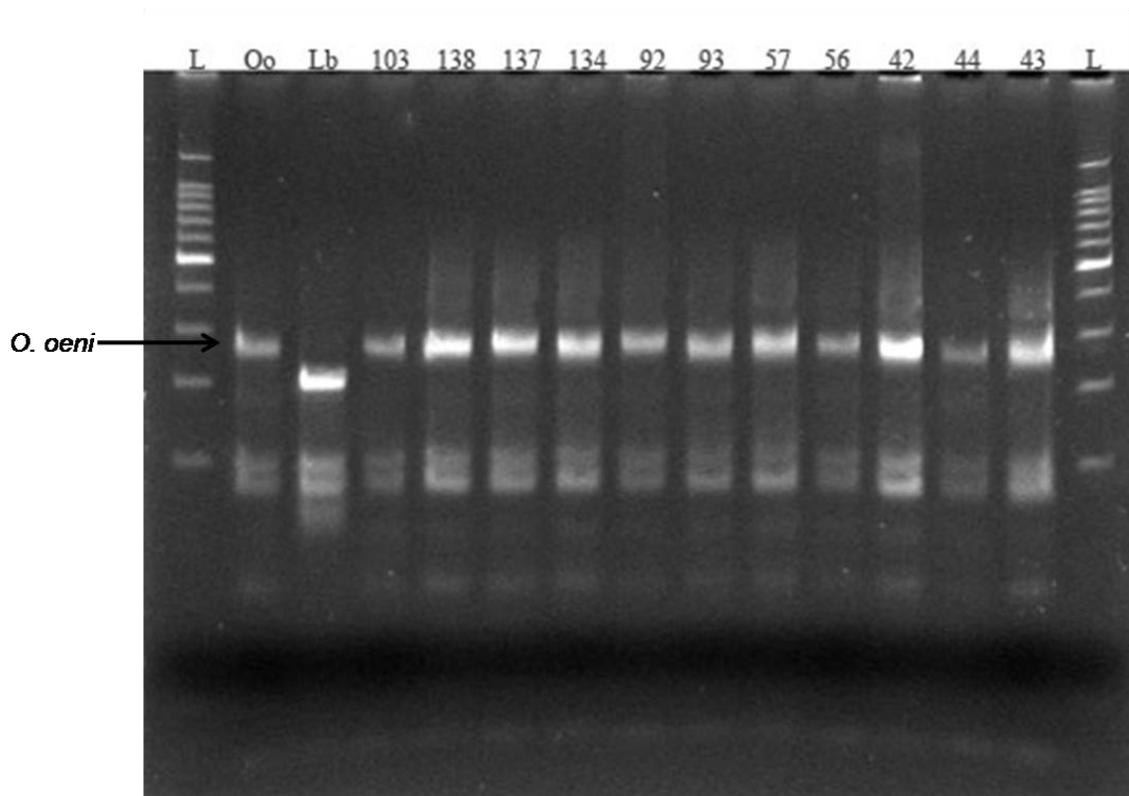


Figura 3. Análisis de restricción (RFLP) de aislados nativos de bacterias lácticas de Valles Vitivinícolas chilenos. Carril L, Marcador de peso molecular 100bp; carril (O.o) Cepa de referencia *Oenococcus oeni*; carril (Lb) Cepa de referencia *Lactobacillus brevis*, carriles con números, restricción de los aislados de bacterias lácticas nativos de vinos analizados.

Caracterización molecular de los aislados chilenos de *Oenococcus oeni* mediante secuenciación génica y diferenciación con cepas comerciales.

La caracterización molecular se realizó mediante secuenciación génica y posterior diferenciación de los aislados con las cepas comerciales. Tanto estas últimas como los 143 aislados, fueron sometidos a la amplificación del gen *rpoB*, obteniendo diferencias genéticas que permiten diferenciarlos, logrando encontrar aislados nativos de la especie *Oenococcus oeni* diferentes genéticamente. Se obtuvieron fragmentos de amplificación cercanos a los 650 bp (Bridier *et al.*, 2010). La figura 4, muestra la amplificación del gen *rpoB* para algunos aislados nativos.

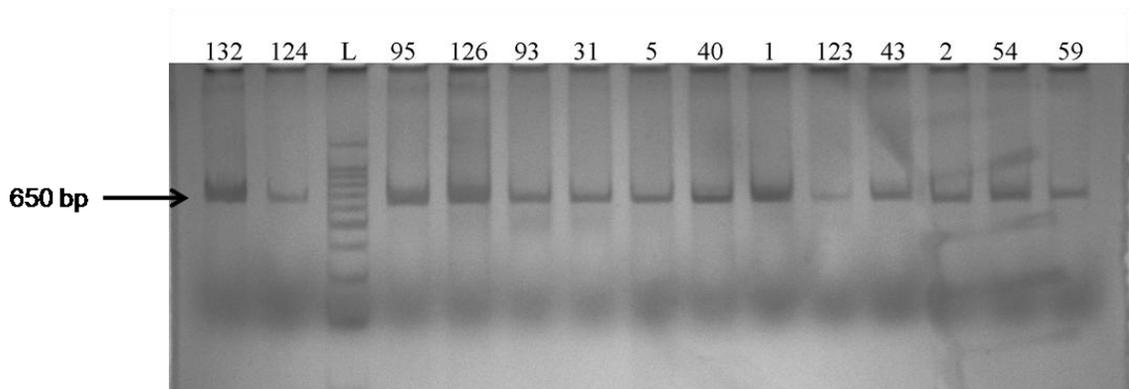


Figura 4. Amplificación PCR-*rpoB* de los aislados nativos de bacterias lácticas. Carriles numerados, aislados nativos *Oenococcus oeni*; carril L, Marcador de peso molecular 100bp.

Al realizar la comparación de las secuencias del gen *rpoB* entre las cepas comerciales, se observó que éstas no presentaron diferencias entre sí. En base a esto, se optó por utilizar la cepa comercial VP41, para la comparación con los aislados. Dicha cepa corresponde a la más comercializada por la empresa Lallemand en Chile, considerando el bajo porcentaje de bodegas que realizan la Fermentación maloláctica de forma inducida (1%)¹

¹ Comunicación personal Andrés Gómez, Lallemand y Adriana Embeita, Lamothe.

El uso de estrategias moleculares de caracterización, permite la diferenciación genética de aislados *Oenococcus oeni* y su distinción respecto a las cepas comerciales. En relación a la cepa VP41, se identificaron 33 aislados diferentes genéticamente, correspondientes a un 23% del total de aislados analizados (Cuadro 5). Se observaron desde 1 hasta 8 bases de diferencia, de 570 bases comparadas, correspondientes a 0.17 y 1.4% respectivamente.

Cuadro 5. Alineamientos de las secuencias del gen *rpoB* de los 33 aislados nativos de *Oenococcus oeni* que difieren genéticamente de VP41 (cepa comercial).

Valle	Muestras	N° aislado	Bases diferentes a VP41
Maipo	160101 C	19	G-T
	030101 hq	17	C-T-G-T
	010101 C	41	C-T-G-T
	020101-8	49	C-T-G-T
	030101 sj	52	C-T-G-T
	120102	50	C-T-G-T
	120101	55	C-T-G-T
	010101 A	32	C-T-G-T
	010106 B	39	G
	010102	13	G
	160101 E	33	G
	160101 B	43	G
	160101 A	59	G
	160101 D	21	G-C
010101 B	56	C-T-G-T-G	
Casablanca	010302	62	C-T-G-T
Rapel	050801 C	86	C-T-G-T
	050801 A	89	C-T-G-T
	160801	91	C-T-G-T
	050801 D	100	C-T-G-T
	140801	101	C-T-G-T
	070801	104	C-T-G-T
Curicó	160701	107	G
Maule	161007 B	120	G
	161007 C	135	G
	161007 A	140	G
	161006	118	G
	121010	116	C-T-G-T
	061001	122	C-T-G-T
	051001 A	126	C-T-G-T
	141001	137	C-T-G-T
	051001 D	113	C-T-G-T
	051001 B	114	C-C-C-T-T-T-G-T

Análisis filogenético

En la figura 5, se visualiza, el dendograma realizado con los aislados que presentan bases nucleotídicas diferentes de las secuencias del gen *ropB* en relación a la cepa comercial VP41. Se observan dos grupos principales denominados A y B (correspondientes a la primera base que difiere a lo largo de las secuencias analizadas, con respecto a la secuencia de VP41, siendo estas bases respectivamente Citosina y Guanina). A partir de esto, se formaron tres subgrupos para cada grupo principal.

Siendo el subgrupo a1 formado por 19 cepas cuyas secuencias presentan 4 bases nucleotídicas diferentes (CTGT); el subgrupo a2 corresponde a 1 cepa con 5 bases diferentes (CTGTG) y el subgrupo a3 corresponde a 1 cepa con 8 bases diferentes (CCCTTTGT). En cuanto al subgrupo b1, corresponde a 10 cepas con 1 base diferente (G); el subgrupo b2 corresponde a 1 cepa con 2 bases diferentes (GT) y finalmente el subgrupo b3 corresponde a 1 cepa con 2 bases diferentes (GC).

De acuerdo al análisis del árbol filogenético, no se obtuvo agrupación genética de aislados por Valle, como se podría esperar. Se Obtuvieron aislados genéticamente idénticos, entre sí, en los Valles de Casablanca, Maipo, Rapel, Maule y Curicó. La separación de cepas por Valles era esperable por las condiciones climáticas diferentes y por la separación geográfica, que presenta cada Valle a lo largo de Chile.

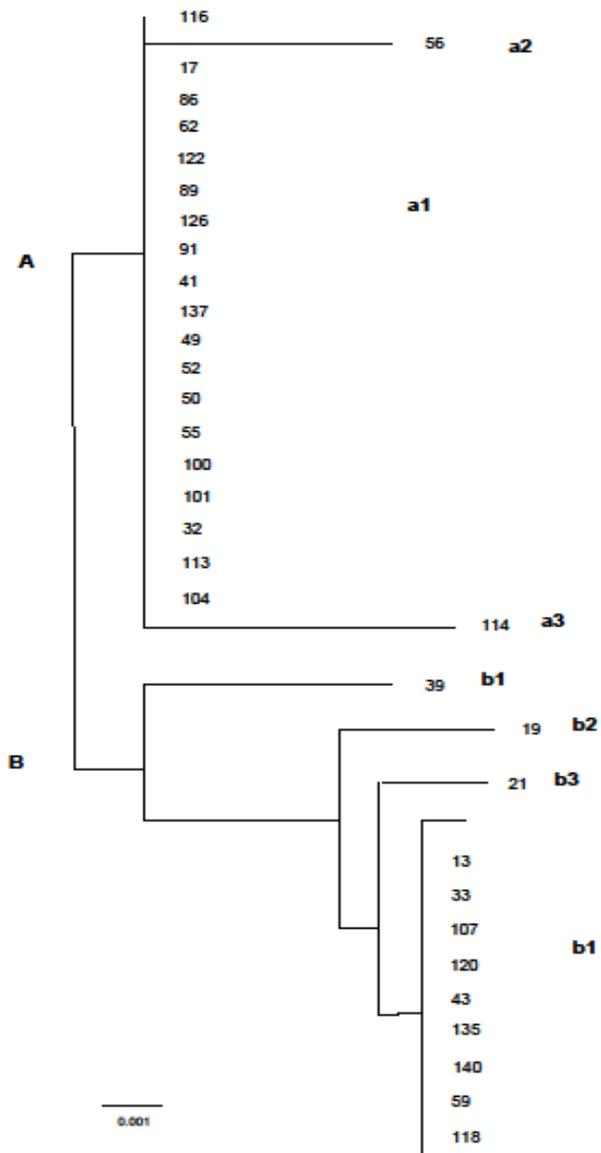


Figura 5. Árbol filogenético construido a partir de las 33 secuencias de aislados nativos *Oenococcus oeni*, diferentes genéticamente a la cepa comercial VP41.

DISCUSIÓN

Oenococcus oeni es la bacteria láctica preponderante durante la fermentación maloláctica, esto se debe a su capacidad para adaptarse al medio vínic (Borneman *et al.*, 2010). Lo anterior se refleja en el presente estudio donde mediante un examen preliminar, se obtuvo un alto porcentaje (99%) de aislados nativos pertenecientes al género *Oenococcus*, demostrando que es esta bacteria la que se encuentra preponderante al inicio y durante la fermentación maloláctica. Además, estos resultados coinciden con lo descrito por Solieri *et al.*, (2010), quienes mediante siembra de muestras de vinos en medio agar MRS, amplificación del gen 16S rRNA y posterior análisis de restricción de las colonias, obtuvieron aislados de bacterias lácticas del género *Oenococcus*.

Ahora bien, como lo anterior corresponde a una identificación a nivel de género de los aislados, se realizó la confirmación de la identidad taxonómica de éstos, mediante pruebas moleculares más exhaustivas, como la secuenciación de genes diferenciadores, usualmente genes esenciales de la bacteria, como es el caso del gen *rpoB*. En base a lo anterior, los avances en la secuenciación de genes han convertido esta estrategia en una alternativa para la comparación de un gran número de cepas bacterianas (Borneman *et al.*, 2010). Se han reportado estudios de secuenciación del gen *rpoB*, el cual es utilizado como una herramienta para la diferenciación de especies de bacterias lácticas (Rantsiou *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2006; Renouf *et al.*, 2007).

Esto se ajusta al presente estudio donde se reporta, que el análisis de los alineamientos en las secuencias, tanto del gen 16S rRNA como *rpoB* de los aislados nativos, permitió evidenciar que este último gen, proporciona un mayor nivel de diferenciación genética. Esto coincidió con datos obtenidos en estudios con otras cepas de bacterias lácticas utilizando el gen *rpoB*, los cuales indican que las variaciones observadas en *rpoB* van del orden de 10-15%, lo cual permite una identificación genética fiable². Esto es consistente con estudios realizados por

² Comunicación personal Carla Jara, datos obtenidos en Laboratorio INTA

Renouf *et al.*, (2006), en los que se indica que el gen *rpoB* alcanzó un mayor poder de diferenciación genética, mostrando una divergencia de 12% en relación a las secuencias del gen 16S rRNA para distinguir entre especies de bacterias lácticas. Estos resultados, a su vez, concuerdan con lo destacado por Renouf *et al.*, (2006) quienes indican, que es más probable que las mutaciones en el gen *rpoB* reflejen adecuadamente una diferencia genética de las cepas bacterianas. Así, como también, con lo descrito por Mollet *et al.*, (1997) quienes indican que el gen *rpoB* exhibió una variabilidad entre 1 y 15% más que el gen 16s rRNA en su estudio.

En base a las secuencias de *rpoB*, se hizo posible la diferenciación entre los aislados nativos de la especie *Oenococcus oeni* con la cepa comercial VP41. Se logró distinguir una fracción de 33 aislados nativos de un total de 143, eso implica que existe un porcentaje de aislados (23%) que pueden presentar capacidades diferentes a las de las cepas comerciales al momento de realizar la Fermentación Maloláctica. En base a estos aislados, se realizó el análisis filogenético, del cual se esperaba que mostrara una tendencia de agrupaciones genéticas por Valle Vitivinícola o cultivar, debido al aislamiento geográfico que presenta cada Valle a lo largo de Chile, lo cual propicia condiciones climáticas y geográficas diferentes en cada localidad. Sin embargo, esto no fue así, observándose agrupaciones genéticas de aislados que incluyen diferentes Valles Vitivinícolas y cultivares. Esto concuerda, con el estudio realizado por Bridier *et al.*, (2010), quienes al realizar el análisis filogenético obtuvieron agrupaciones genéticas que incluían a aislados de distintos países, incluido Chile. Por tanto la diversidad observada en las agrupaciones genéticas, podría asociarse con la falta de genotipos en algunas regiones geográficas, en lugar de la aparición de nuevos y específicos genotipos.

Cabe destacar que en el presente estudio se analizó solo un gen variable (*rpoB*), a diferencia de estudios actuales como el de Bridier *et al.*, (2010) y De las Rivas *et al.*, (2004), quienes utilizan una batería de 8 genes MLST, con la finalidad de evitar sesgos posibles. Ante esto, queda abierta la posibilidad que se realicen estudios

con estos 8 genes con la finalidad de obtener mayor variabilidad genética entre los aislados analizados en este estudio.

Todo lo anterior, avala que los aislados nativos distintos genéticamente (gen *rpoB*) a la cepa comercial VP41, podrían convertirse en un gran aporte para la vinificación chilena. Estas diferencias evidenciadas podrían expresarse en distintas capacidades tecnológicas y, así, contribuir al control de la cinética de la Fermentación maloláctica. Esto concuerda con lo expuesto por Borneman *et al.*, (2013), donde se hace alusión, que la divergencia que existe en los genes de las bacterias lácticas *Oenococcus oeni*, podrían expresarse en diferentes capacidades tecnológicas. Mutaciones genéticas que resultan de la adaptación de las bacterias lácticas al medio ambiente donde se desarrollan. En relación a esto, existe un creciente interés en la caracterización de las cepas de *Oenococcus oeni* que son exclusivas de determinadas regiones geográficas Vitivinícolas, con el fin de mejorar la tipicidad de los vinos (Bartowsky *et al.*, 2011).

De acuerdo a todo lo expuesto, es posible validar la hipótesis de este estudio. Siendo efectivo que: “Los aislados chilenos de bacterias lácticas *Oenococcus oeni* presentan diferencias moleculares en sus secuencias con respecto a las cepas comerciales”.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de esta investigación, se puede concluir que:

En los Valles Vitivinícolas de Casablanca, del Maipo, Rapel, Maule, y Curicó, se identificaron mediante caracterización molecular, aislados nativos de bacterias lácticas de la especie *Oenococcus oeni*, presentes en vinos chilenos durante fermentación maloláctica espontánea, los cuales presentan diferencias genéticas en relación a la cepa comercial VP41.

Como perspectivas futuras:

La realización de análisis genéticos usando más genes variables como en el caso de la aproximación *MLST* podría ser una estrategia para la tipificación molecular de las bacterias lácticas presentes en los vinos chilenos, con el fin de obtener más diferenciación con respecto a inóculos comerciales.

La realización de pruebas tecnológicas en vinos chilenos, permitiría el monitoreo de las capacidades que presenten los aislados de realizar la fermentación maloláctica. Evaluando su capacidad de transformar el ácido málico en láctico, tolerancia a altas concentraciones de etanol y SO₂, con el fin de obtener los mejores aislados a la hora de llevar a cabo la Fermentación maloláctica en las bodegas chilenas.

LITERATURA CITADA

Bartowsky, E and A, Borneman 2011. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiol biotechnol.* 92: 441-447.

Blasco. L. 2009. Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. 173 p

Borneman, A; E, Bartowsky; J, McCarthy and P, CHAMBERS 2010. Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiol biotechnol.* 86: 681-691

Borneman, A; E, Bartowsky; J, McCarthy and P, CHAMBERS 2013. Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics.* 373: 1-13

Bridier, J; O, Claissie; M, Coton; E, Coton and A. Lonvaud-funel. 2010. Evidence of Distinct Populations and Specific Subpopulations within the Species *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 76: 7754-776

De Las Rivas, B; A. Marcobal; R. Muñoz. 2004. Allelic Diversity and Population Structure in *Oenococcus oeni* as Determined from Sequence Analysis of Housekeeping Genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 70: 7210-7219

De Man, J; M, Rogosa and M, Sharpe. 1960. Medium for the cultivation of lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology.* 23: 130-135

Espejo, R and D, Escanilla. 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using "primer-dimer" fermentation as an internal control of amplification. *Research in Virology*.144:243-246

González-Arenzana, L; P, Santamaría; R, López, C, Tenorio and I, López- Alfaro. 2012. Ecology of Indigenous Lactic Acid Bacteria along Different Winemaking Processes of Tempranillo RedWine from La Rioja (Spain). *The Scientific World Journal*. 2012: 1-7

Ilabaca, C; P, Navarrete; P, Mardones; J, Romero and A, Mas. 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*. 126: 245-249

Ilabaca, C; C, Jara and J, Romero. 2014. The rapid identification of lactic acid bacteria present in Chilean winemaking processes using culture-independent analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2014: 1-3

Mollet, C; M, Drancourt and D, Roault. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*. 26: 1005-1011

Rantsiou, K; G, Comi and L, Cocolin. 2004. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Journal Food Microbiology*. 21: 481-487

Renouf, V; O, Claisse; C, Miot-Sertier and A, Lonavud-Funel. 2006. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*. 23: 136-145

Renouf, V; O, Claisse and A, Lonvaud-Funel. 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of Microbiological Methods*. 69: 387–390

Rodas, A; S, Ferrer and I, Pardo. 2003. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 412-422

Ruiz, P; P, Izquierdo; S, Seseña and M, Llanos. 2008. Intraespecific genetic diversity of lactic bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *International Journal of Food Microbiology*. 25: 942-948

Ruiz, P; P, Izquiero; S, Seseña and M, Llanos. 2010. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 230-235

Solieri, L; F, Genova; M, De Paola and P, Giudici. 2010. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 285-298

Vos, M; CH, Quince; A, Pijl; M, De Hollander and G, Kowalchuk. 2012. A Comparison of *rpoB* and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing. *Studies of Bacterial Diversity. Plos One*. 7: 1-8

APÉNDICES

Medios para el cultivo de la microbiota láctica de las muestras de vino.

MLO		
Componentes	Unidad	1000
Triptona	g/L	10
Extracto de levadura	g/L	5
Glucosa	g/L	10
Fructosa	g/L	5
Citrato de amonio	g/L	3,5
Solución de sales (MnSO ₄ y MgSO ₄)	mL/L	10
Twen 80	mL/L	1
Jugo de tomate	mL/L	300
Agar	g/L	20

Blasco, (2009)

MRS modificado		
Componentes	Unidad	1000
MRS	g/L	52,2
Ácido málico	g/L	4
Fructosa	g/L	5
Jugo de tomate	mL/L	30
Agar	g/L	20

De Man *et al.*, (1960)

Aislados de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Código	Valle	Cultivar	Código de aislado
161306	Elqui	Syrah	1
			2
050407B	Limarí	Carmenere	3
			4
050407D	Limarí	Carmenere	5
			6
050407C	Limarí	Carmenere	7
			8
050407A	Limarí	Carmenere	9
			10
130406	Limarí	Syrah	11
			12
010102	Maipo	Merlot	13
			14
040105	Maipo	Tintorera	15
			16
030101HQ	Maipo	Cabernet Sauvignon	17
			18
160101C	Maipo	Cabernet Sauvignon	19
			20
160101D	Maipo	Cabernet Sauvignon	21
			22
010106A	Maipo	Syrah	23
			24
040101	Maipo	Cabernet Sauvignon	25
			26
020101L1	Maipo	Cabernet Sauvignon	27
			28
010109	Maipo	Petit Verdot	29
			30
010101A	Maipo	Cabernet Sauvignon	31
			32
010104	Maipo	Pinot noir	33
			34
040102	Maipo	Merlot	35
			36
150107A	Maipo	Carmenere	37
			38
010106B	Maipo	Syrah	39

(Continua)

Aislados obtenidos de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Código	Valle	Cultivar	Código de aislado
010101C	Maipo	Cabernet Sauvignon	40
			41
160101B	Maipo	Cabernet Sauvignon	42
			43
150101	Maipo	Cabernet Sauvignon	44
			45
150107B	Maipo	Carmenere	46
			47
020101L8	Maipo	Cabernet Sauvignon	48
			49
120106	Maipo	Syrah	50
			51
030101SJ	Maipo	Cabernet Sauvignon	52
			53
120101	Maipo	Cabernet Sauvignon	54
			55
010101B	Maipo	Cabernet Sauvignon	56
			57
160101A	Maipo	Cabernet Sauvignon	58
			59
080304B	Casablanca	Pinot noir	60
			61
010302	Casablanca	Merlot	62
			63
010304	Casablanca	Pinot noir	64
			65
080304E	Casablanca	Pinot noir	66
			67
150302	Casablanca	Merlot	68
			69
080304A	Casablanca	Pinot noir	70
			71
120304	Casablanca	Pinot noir	72
			73
080304D	Casablanca	Pinot noir	74
			75
150303	Casablanca	Cabernet Franc	76
			77

(Continua)

Aislados obtenidos de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Código	Valle	Cultivar	Código de aislado
120306	Casablanca	Syrah	78
			79
080304C	Casablanca	Pinot noir	80
			81
121206	San Antonio	Syrah	82
			83
050801B	Rapel	Cabernet Sauvignon	84
			85
050801C	Rapel	Cabernet Sauvignon	86
			87
050801A	Rapel	Cabernet Sauvignon	88
			89
160801	Rapel	Cabernet Sauvignon	90
			91
060806	Rapel	Syrah	92
			93
120804	Rapel	Pinot noir	94
			95
140802	Rapel	Merlot	96
			97
170807	Rapel	Carmenere	98
			99
050801D	Rapel	Cabernet Sauvignon	100
			101
140801	Rapel	Cabernet Sauvignon	102
			103
070801	Rapel	Cabernet Sauvignon	104
			105
120807	Rapel	Carmenere	106
			107
160701	Curicó	Cabernet Sauvignon	108
			109
100701	Curicó	Cabernet Sauvignon	110
			111
051001D	Maule	Cabernet Sauvignon	112
			113
051001B	Maule	Cabernet Sauvignon	114
			115
121010	Maule	Carignan	116
			117

(Continua)

Aislados obtenidos de bacterias lácticas de vinos tintos durante fermentación maloláctica espontánea.

Código	Valle	Cultivar	Código de aislado
161006	Maule	Syrah	118
			119
161007B	Maule	Carmenere	120
			121
061001	Maule	Cabernet Sauvignon	122
			123
101006	Maule	Syrah	124
			125
051001A	Maule	Cabernet Sauvignon	126
			127
061003	Maule	Cabernet Franc	128
			129
091010	Maule	Carignan	130
			131
091003	Maule	Cabernet Franc	132
			133
161007C	Maule	Carmenere	134
			135
			136
141001	Maule	Cabernet Sauvignon	137
			138
161007A	Maule	Carmenere	139
			140
061010	Maule	Carignan	141
			142
061101	Itata	Cabernet Sauvignon	143
			144

