



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO MOLECULAR DE MONITOREO DE
LEVADURAS VÍNICAS EN FERMENTACIONES CO-INOCULADAS**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN: Enología y Vitivinicultura

ALEJANDRA VICTORIA ROJAS MANZI

Directores de Tesis

CARLA JARA CAMPOS
JAIME ROMERO ORMAZÁBAL

Profesores Consejeros

CARMEN PRIETO DURAN
ÍTALO CHIFFELLE GMEZ

Santiago, Chile 2013



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO MOLECULAR DE MONITOREO DE
LEVADURAS VÍNICAS EN FERMENTACIONES CO-INOCULADAS**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN: Enología y Vitivinicultura

Alejandra Victoria Rojas Manzi. Ingeniero Químico

DIRECTORES DE TESIS

CALIFICACIÓN

Carla Jara C. Ingeniero Agrónomo, Dr.

APROBADA

Jaime Romero O. Bioquímico, Dr.

APROBADA

PROFESORES EVALUADORES

Carmen Prieto D. Ingeniero Agrónomo, Mg.Sc.

APROBADA

Ítalo Chiffelle G. Bioquímico, Dr.

APROBADA

Santiago, Chile 2013

TÍTULO

Desarrollo de un método molecular de monitoreo de levaduras vínicas en fermentaciones co-inoculadas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme las oportunidades y dones que me permitieron comenzar y culminar esta meta.

A mis padres y hermana por todo el apoyo brindado a pesar de la distancia y por ser mi ejemplo e inspiración de superación.

A mi nueva familia, adquirida en esta hermosa tierra Chile, quienes compartieron conmigo este camino.

A Empresas Polar C.A quien me brindo la gran oportunidad profesional y personal de formarme como Enólogo.

A mis tutores de tesis Carla Jara y Jaime Romero por guiarme en la ejecución de este proyecto.

A Carolina Ilabaca por todo el apoyo recibido durante la fase experimental de este trabajo.

A la Universidad de Chile, en especial a cada uno de los profesores que me impartieron con gran sabiduría sus conocimientos enológicos y al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad por permitirme el desarrollo del proyecto en sus instalaciones.

Al Proyecto de Inserción de Capital Avanzado a la Academia 791100011 “Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos de detección, identificación y caracterización de microorganismos de interés enológico” por el financiamiento.

A la empresa Lallemand por todo el aporte durante el desarrollo del proyecto

ÍNDICE

| | Págs |
|------------------------|------|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| CAPITULO I | |
| Introducción | 8 |
| Hipótesis y Objetivos | 17 |
| CAPITULO II | |
| Metodología | 18 |
| CAPITULO III | |
| Resultados y Discusión | 26 |
| Conclusiones | 47 |
| Bibliografía Citada | 48 |

RESUMEN

La transformación del mosto de uva en vino, es un complejo proceso microbiológico realizado principalmente por levaduras del género *Saccharomyces*, responsables de la fermentación alcohólica. Actualmente, las co-inoculaciones con levaduras comerciales no *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*) y *Saccharomyces cerevisiae*, son una alternativa para la incorporación de enzimas β -glucosidasas, pectinasas y proteasas al mosto. El mosto alberga una diversa microbiota inicial; esta heterogeneidad microbiológica dificulta el control del proceso fermentativo. Por ello, se desarrolló un método de monitoreo de levaduras vínicas en fermentaciones de co-inoculación, aplicando métodos de taxonomía molecular. Se analizaron las regiones ribosomales, sobre las cuales se diseñó una estrategia “in silico”, mediante perfiles de restricción (RFLP), empleando endonucleasas específicas; lográndose una fácil y fidedigna diferenciación de los microorganismos involucrados. De manera experimental se trabajó con un mosto del cultivar Syrah; que se separó en dos cubas, una fue inoculada únicamente con *Saccharomyces cerevisiae* y otra fue co-inoculada con *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se examinaron distintas etapas del proceso de fermentación, logrando en todos los casos extraer ADN de forma directa desde las muestras de vino en una aproximación independiente de cultivo. El ADN extraído fue sujeto a un proceso de PCR para amplificar la región ITS 5.8S. Estos amplicones se sometieron a digestión con las enzimas AluI, ApaI, HaeIII, SphI, lo que permitió definir e identificar la presencia de las levaduras involucradas en cada fase de la fermentación alcohólica. Todo esto permitió demostrar que la variación genética de las regiones ribosomales, permite la diferenciación a través de métodos moleculares, de las levaduras vínicas: *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, comúnmente usadas en co-inoculación.

Palabras Claves: ADN, Regiones ribosomales, Perfiles de restricción

ABSTRACT

Transformation of grape must into wine is a complex microbiological process done mainly by *Saccharomyces* yeasts, responsible for the alcoholic fermentation. Currently, co-inoculated with *Saccharomyces* commercial yeasts (*Torulaspora delbrueckii*) and *Saccharomyces cerevisiae*, are an alternative to the incorporation of β -glucosidase enzymes, pectinase and protease to the must. The must has a diverse microbiota initial, this heterogeneity hinders this fermentation process control. Therefore, we developed a method of monitoring fermentations wine yeasts in co-inoculation, using methods of molecular taxonomy. Ribosomal regions were analyzed, over which strategy was designed "in silico" by restriction profiles (RFLP) using specific endonucleases; achieving an easy and accurate differentiation of the microorganisms involved. Experimentally we worked with Syrah grape cultivar, which split into two tanks, one was inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* and other was co-inoculated with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*. We examined various stages of the fermentation process, obtaining in all cases extract DNA directly from the wine samples in a culture-independent approach. The extracted DNA was subjected to a process of PCR to amplify the region ITS 5.8 S. These amplicons were digested with the enzyme AluI, ApaI, HaeIII, SphI, allowing define and identify the presence of yeast involved in each stage of the fermentation. All this helped to show that the genetic variation of ribosomal regions, allows differentiation through molecular methods of wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*, commonly used in co-inoculation.

Keywords: DNA, ribosomal regions, restriction profiles

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras, por lo tanto, estos microorganismos han formado parte de la civilización humana. Estudios evidencian químicamente la producción de vino hace más de 4.000 años AC, en la ciudad de Armenia (Barnard *et al.*, 2010).

En el año 1876, el rol de las levaduras en la fermentación alcohólica, fue establecido por Luis Pasteur, quien demostró, que la fermentación era una acción espontánea de las levaduras, debido a su capacidad de asimilar el azúcar. Actualmente, los estudios reportan una gran diversidad de especies en la superficie de las uvas. Se considera que la naturaleza de las levaduras influye en las características organolépticas del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Las levaduras son microorganismos eucariotas, unicelulares, de forma oval o elipsoidal, que presentan pared celular, membrana plasmática, y mitocondrias, como principales estructuras fermentativas. Su metabolismo es anaerobio facultativo, y su reproducción asexual o por yemación; aunque en ciertos casos es sexual por producción de ascosporas, dependiendo de la especie. Estos microorganismos conviven en el ecosistema del viñedo y por ende en el mosto, pudiendo tener cada una de ellas participación en el proceso de fermentación alcohólica. Con la finalidad de clasificarlas, se establecen dos grandes grupos; *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Moreno-Arribas y Polo, 2009).

Las levaduras no-*Saccharomyces*, agrupan una cantidad de géneros de levaduras relacionadas con la uva y el vino, las cuales por sus propiedades genéticas y metabólicas, presentan baja capacidad fermentativa. Además producen un gran

número de compuestos que pueden tener una influencia significativa en la calidad del vino. En algunos casos pueden considerarse alterantes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Las levaduras de los géneros: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, entre otras; conforman el grupo de levaduras no-*Saccharomyces* (Querol *et al.*, 2003; Renault *et al.*, 2009; Zott *et al.*, 2010; Manzanares *et al.*, 2011; Maturano *et al.*, 2012).

La evolución de las poblaciones de levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica generalmente sigue el siguiente comportamiento: las levaduras de los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida*, predominan en las primeras etapas de la fermentación alcohólica. Más tarde, los géneros *Pichia* y *Metschnikowia*, prevalecen en las etapas intermedias. Por último, durante las etapas finales de la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*, es la predominante, debido a su mayor resistencia a la alta concentración de etanol. En esta etapa, algunas otras levaduras de los géneros: *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* también podrían estar presentes (Querol *et al.*, 2003; Swiegers *et al.*, 2005; Moreno-Arribas y Polo 2009; Renault *et al.*, 2009).

Debido a esta diversidad, se establecen mecanismos de control poblacional, entre los que destaca, la adición de sustancias con poder antiséptico como el anhídrido sulfuroso y el ácido sórbico. También, se emplean las fermentaciones inoculadas con la finalidad de obtener fermentaciones seguras (Rodríguez, 2007).

La inoculación de levaduras en las fermentaciones, es un concepto creado por Müller-Thurgau en 1890 (Rodríguez, 2007), el cual consiste en dirigir fermentaciones con cultivos puros de levaduras. Estos cultivos han sido seleccionados, a través de pruebas tecnológicas, de acuerdo a las características apropiadas para facilitar el control de la fermentación y mejorar la calidad del vino. La principal especie de levadura seleccionada ha sido *Saccharomyces cerevisiae*,

por su eficiente catabolismo fermentativo (Swiegers *et al.*, 2005), resistencia a las dosificaciones de anhídrido sulfuroso, tolerancia a altas concentraciones de sólidos solubles (azúcares), tolerancia al etanol, baja producción de sustancias volátiles perjudiciales (ácido acético, vinil fenoles, etc), fenotipo killer (fenómeno de antagonismo microbiano, que consiste en la producción de toxinas proteicas que afectan a levaduras sensibles), entre otras características positivas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Este tipo de estrategia permite obtener primero un comienzo rápido del proceso fermentativo y un acortamiento de las fases de latencia, esto se traduce en una restricción a otras levaduras no-*Saccharomyces* y segundo la realización completa de la fermentación alcohólica con baja concentración de azúcares residuales (Rodríguez, 2007). Sin embargo, algunas tendencias en la elaboración de vino se inclinan por afirmar que el uso de estas cepas seleccionadas, limita la participación de otras especies y cepas, reduciendo así la complejidad del producto final (Barrajon *et al.*, 2011).

Por tanto, es posible pensar en fermentaciones donde participen sinérgicamente levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, de manera similar a como ocurre en las fermentaciones espontaneas, pero empleando cepas seleccionadas que permitan el control de la fermentación alcohólica, e impriman variabilidad en el perfil aromático del producto final. Este proceso se conoce como co-inoculación y puede ser simultáneo o secuencial (Barrajon *et al.*, 2011). Una co-inoculación simultánea, ocurre cuando se inoculan ambas levaduras al inicio de la fermentación. Mientras que en una secuencial, se inocula primero la no-*Saccharomyces* y luego de un descenso de 10 ó 15 puntos de la densidad del mosto inicial, se inocula la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estos cultivos mixtos proporcionan una diversidad de levaduras controladas y tienen una especial contribución en la formación de aromas primarios y secundarios distintivos y complejos (Delfini *et al.*, 2001; Manzanares *et al.*, 2011).

Los aromas primarios llamados también aromas varietales, están constituidos principalmente por los compuestos volátiles que proceden de la uva. Estos compuestos se pueden encontrar como aromas libres, o como aromas ligados en forma de precursores de aroma. Los aromas ligados u ocultos, están presentes en las uvas como glicósidos, ácidos fenólicos, ácidos grasos y en menor medida compuestos volátiles unidos a la cisteína. Entre los aromas ocultos destacan, los terpenos y tioles ligados, que tienen impedida su capacidad odorante (Flanzy, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Seguidamente, los aromas secundarios son generados por las levaduras a través de sus procesos metabólicos durante la fermentación alcohólica. Están constituidos por ácidos grasos volátiles, ésteres, aldehídos y alcoholes superiores. Los aromas secundarios, determinan de manera importante el perfil aromático de los vinos (Flanzy, 2000; Swiegers *et al.*, 2005; Manzanares *et al.*, 2011).

En relación a los terpenos y tioles ligados, existen enzimas capaces de liberar estos aromas potenciales, entre ellas se encuentran las enzimas glicolíticas, como la β -D-glucosidasa, α -arabinofuranosidasa, α -ramnosidasa, β -D-apiosidasa y β -xilosidasa. Estas enzimas, están relacionadas con la liberación de los terpenos tales como, el geraniol, nerol, linalol; los cuales proporcionan al vino aromas florales agradables (Flanzy, 2000; Manzanares *et al.*, 2011). También son de gran relevancia las enzimas β -liasa, responsables de la hidrolisis que da lugar a los tioles volátiles como 4-mercapto-4-pentilpenta-2-ona, 3-mercaptohexanol y acetato de 3-mercaptanol, relacionados a los aromas a boj (arbusto verde), pomelo, maracuyá y guayaba (Flanzy, 2000).

Otras enzimas relacionadas con el enriquecimiento aromático de los mostos y finalmente del vino, son las pectinasas. Estas enzimas degradan las cadenas homogalacturónicas de las pectinas, constituyentes principales de la pared celular de la bayas; aumentando la extracción de aromas y color. Además facilitan la

clarificación y filtración de los mostos (Flanzy, 2000; Mateo *et al.*, 2011; Maturano *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, la industria enológica ha mostrado un incremento en la aplicación exógena de enzimas relacionadas al enriquecimiento aromático del mosto, especialmente las β -D-glucosidasas y pectinasas. Las enzimas usadas actualmente, son producidas y aisladas de bacterias u hongos filamentosos (Maturano *et al.*, 2012). No obstante, tanto levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* tienen capacidades enzimáticas, especialmente para transformar compuestos neutrales de las uvas en activos compuestos aromáticos, y así mejorar los atributos sensoriales del vino (Maturano *et al.*, 2012). Las especies y cepas de levadura, con las que se inocula el mosto, pueden tener un importante impacto en el aroma y “flavour” del producto final y constituyen los factores determinantes de los niveles de aromas primarios y secundarios producidos (Swiegers *et al.*, 2005; Manzanares *et al.*, 2011). Esto se debe, a las diferentes capacidades de las levaduras en producir enzimas hidrolíticas extracelulares, para liberar los aromas ligados. También a las diferencias en los compuestos secundarios que cada especie de levadura metaboliza, dando lugar a perfiles aromáticos distintos durante la fermentación.

Las levaduras de los géneros *Torulaspota*, *Hanseniaspora* y *Pichia* presentan una alta actividad enzimática y generan una buena producción de enzimas β -glucosidasa y pectinasa (Mateo *et al.*, 2011; Maturano *et al.*, 2012). En contraste, *Saccharomyces cerevisiae*, presenta baja actividad pectinasa y β -glucosidasa, menor actividad α -arabinosidasa y ninguna actividad α -ramnosidasa. Esto sugiere que las levaduras *no-Saccharomyces* presentan una gran contribución en la liberación de aromas primarios potenciales (Flanzy, 2000).

Es por ello, que algunas especies *no-Saccharomyces* han sido estudiadas de forma más específica, encontrando aportes organolépticos en los mostos y vinos,

debido a la producción de enzimas glicosidasas. Entre las levaduras estudiadas, se pueden citar los géneros *Torulaspota*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y otros; obteniendo importantes aportes organolépticos en algunos casos (Ciani y Maccarelli, 1998; Delfini *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2011; Maturano *et al.*, 2012).

En relación a ello, la especie *Torulaspota delbrueckii*, ha demostrado ser interesante no sólo por revelar la tipicidad sensorial a través de la hidrólisis enzimática, sino también por la pureza de su perfil fermentativo y por su baja producción de acidez volátil y moderada producción de glicerol (Ciani y Maccarelli, 1998; Renault *et al.*, 2009). En tal sentido, el empleo de cultivos mixtos entre levaduras *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces* presenta las siguientes ventajas: (1) Revelan el potencial aromático de los vinos y refuerza los aromas varietales, (2) Conduce a un incremento en los niveles de ésteres, lo que genera vinos más intensos y complejos (Clavijo *et al.*, 2010; Comitini *et al.*, 2011; Manzanares *et al.*, 2011).

Estas fermentaciones mixtas, al igual que todas las fermentaciones industriales, requieren de control constante de las poblaciones de levaduras en el mosto. Dicho control permite monitorear la implantación de las levaduras inoculadas y evitar la proliferación de levaduras contaminantes (Rodríguez, 2007). Actualmente, el monitoreo de los procesos fermentativos, a nivel industrial, se realiza empleando pruebas microbiológicas clásicas, basadas en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos. Estas pruebas son dependientes de cultivo, lo que dificulta el crecimiento de todas las poblaciones de levaduras contenidas en la matriz de análisis, debido a las nuevas condiciones selectivas impuestas. Por ello, en la mayoría de los casos, no se logra visualizar completamente la diversidad de las poblaciones involucradas durante las fermentaciones alcohólicas, ya que solo se pueden caracterizar las cepas cultivables (Ercolini *et al.*, 2004; Jara, 2009; Aponte *et al.*, 2010). Lo antes

expuesto indica que, los actuales métodos de control microbiológico, arrojan resultados tardíos y no del todo certeros. En muchos casos estas pruebas pueden incurrir en identificaciones poco precisas de especies y cepas de levaduras. Por ello se requieren métodos independientes de cultivo que generen resultados confiables (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999 y Esteve-Zarzoso *et al.*, 2011).

El reciente desarrollo de las técnicas moleculares, basadas en el estudio de las similitudes o diferencias del ADN (ácido nucleico que sirve para el depósito y la transmisión de la información genética); ha permitido avanzar en la obtención de herramientas para el control de poblaciones de levaduras en los mostos de uva (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Conn *et al.*, 2009). Las técnicas moleculares, proporcionan resultados reproducibles e independientes del estado fisiológico en el que se encuentre la levadura (Zott *et al.*, 2010; Fernández-Espinar *et al.*, 2011). Por tanto, el análisis del ADN, es una poderosa herramienta para el control industrial y para el estudio de la dinámica de poblaciones de cepas naturales que están involucradas en los procesos de fermentación del vino (Rodríguez, 2007).

La validez y robustez de los resultados obtenidos a partir de estas técnicas moleculares dependen de la recuperación eficiente de ADN (Jara, 2009). La extracción de ADN suele verse afectada por factores como la lisis celular incompleta, absorción del ADN por un material particular, co-extracción, inhibición enzimática y la degradación o el daño de ADN. Esta extracción puede ser independiente de cultivo, logrando con ello reducir el tiempo de respuesta y mitigar el problema de la recuperación limitada de microorganismos que ocurre durante el uso de cultivo o medios de enriquecimiento (Wilsor, 1997; Jara, 2009).

Las técnicas moleculares usadas en el análisis de levaduras vínicas, son diversas y se requiere una combinación de estas para obtener una definitiva caracterización individual de especies y cepas (Fernández-Espinar *et al.*, 2011). Las más utilizadas actualmente para la identificación de especie de levaduras se basan en

el análisis del ADN ribosomal (ADNr). EL ADNr, provee una poderosa herramienta de identificación taxonómica, ya que, contiene secuencias con alto grado de conservación y gran variabilidad genética entre especies. Esto se debe a la evolución concertada de las regiones ribosomales, las cuales muestran un bajo polimorfismo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Kawahata *et al.*, 2007).

El ADNr, está constituido por los genes 5.8S, 18S y 26S, cuya función está relacionada con la síntesis de proteínas (Fernández-Espinar *et al.*, 2011; Conn *et al.*, 2009). Estos genes ribosómicos, se encuentran agrupados en tándem (18S - 5.8S - 26S), para formar unidades de transcripción. Son repetidos alrededor de 100 a 200 veces en el genoma. Cada unidad de transcripción de los genes ribosómicos, contiene dos regiones de codificación; el espacio interno de transcripción (ITS) y el espacio externo de transcripción (ETS). A finales de los años 90 se propuso el estudio de las regiones ITS del gen 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2), como una herramienta rápida y confiable para identificar levaduras, ya que exhiben mayores diferencias interespecíficas que los genes 18S y 26S del ADNr (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

En tal sentido, destacan las siguientes técnicas moleculares para identificación de especies de levaduras: (1) Secuenciación de los espacios internos de transcripción del gen 5.8 S; a través del cual las levaduras pueden ser identificadas por la comparación de la secuencia del nucleótido de las regiones intergénicas del ADNr. Esta técnica proporciona una identificación taxonómica de la especie, permitiendo identificar sitios de corte enzimáticos de restricción (Segura *et al.*, 2010, Fernández-Espinar *et al.*, 2011). (2) Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del ITS-5.8 S, esta técnica consiste en ampliar las regiones intergénicas ITS 1 e ITS 2 del gen 5.8 S *in vitro*, utilizando partidores (*primers*) específicos y la enzima *ADN polimerasa*. Posteriormente, se realiza la digestión de los productos de PCR, empleando enzimas endonucleasas de restricción, las cuales hidrolizan el ADN y

son altamente específicas con respecto a la secuencia de nucleótidos. Los fragmentos generados son separados por electroforesis en geles de agarosa y su tamaño es evaluado por comparación con marcadores de ADN apropiados (Rodríguez, 2007, Conn *et al.*, 2009; Fernández-Espinar *et al.*, 2011). Esta técnica “*in silico*” permite observar los patrones de bandas de las especies de levaduras involucradas en el proceso de fermentación alcohólica, logrando así una identificación definitiva de la especie, al ser comparados con los resultados de la secuenciación y con los perfiles de restricción de especies de levaduras publicados en bases de datos. La técnica RFLP-“*in silico*” es altamente aplicada en la identificación de levaduras, por ser, rápida, simple, altamente reproducible, y de alto rendimiento (Raspor *et al.*, 2007).

Debido al alcance que las pruebas moleculares han logrado; y a los requerimientos enológicos de control de las poblaciones de levaduras durante las fermentaciones; esta investigación pretende desarrollar un método de monitoreo de levaduras vínicas comerciales de inoculación, *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Para ello se empleará el análisis del ADN de las regiones ribosomales ITS-5.8S, donde a través de la amplificación de las secuencias genéticas y la aplicación de enzimas endonucleasas específicas, se puedan determinar y visualizar perfiles de restricción “*in silico*”. Con ello, se logra discriminar taxonómicamente las diferentes especies de levaduras involucradas en las fases de fermentación alcohólica. Se diseñará un protocolo de extracción de ADNr directo de la compleja matriz vínica. La presencia de polisacáridos y polifenoles puede interferir con las reacciones enzimáticas, e incluso degradar el ADN. Sin embargo, aún no existe un método estandarizado de extracción de ADN disponible para vinos. Finalmente, se logrará proponer un método independiente del cultivo, eficiente y simple para su aplicación industrial.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis del Trabajo

La variación genética de las regiones ribosomales permite la diferenciación de las levaduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* comúnmente usadas en co-inoculación; en consecuencia, permitirán el desarrollo de estrategias moleculares de monitoreo durante un proceso que combina ambos microorganismos.

Objetivo General

- Desarrollar un método molecular que permita diferenciar las levaduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*.

Objetivos Específicos

- Identificar secuencias diferenciadoras de las levaduras presentes, en genes o regiones ribosomales usualmente empleadas para tipificar levaduras durante el proceso fermentativo.
- Desarrollar una estrategia “in silico” que permita diferenciar levaduras vínicas mediante perfiles de restricción (RFLP).
- Desarrollar un método de extracción de ADN directo, desde muestras de fermentación alcohólica.
- Aplicar la estrategia “in silico” a muestras reales de fermentaciones alcohólicas co-inoculadas, para monitorear la presencia de las distintas levaduras.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Lugar de Estudio

Los análisis moleculares aplicados a las levaduras vínicas, fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular (MECESUP) del Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos (INTA) y en el laboratorio de Microbiología del departamento de Agroindustria y Enología, ambos pertenecientes a la Universidad de Chile.

Materiales y Equipos

Materiales:

1. Medios de cultivo: Se empleó el medio agar YPG constituido por extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Glucosa 2% (Kawahata *et al.*, 2007).
2. Levaduras comerciales: *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Clos y *Torulaspota delbrueckii* TD291 de la empresa Lallemand.
3. Preparación del ADN: Enzimas Liticasa (Invitrogen) de concentración 20mg/mL, para digerir la pared celular de las levaduras. EDTA 50mM para re-suspender el pellet de levadura (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).
4. Kit de extracción de ADN: se utilizó un kit comercial (MoBio Power Soil) para facilitar la liberación, precipitación y purificación de los ácidos nucleicos.

5. Materiales para análisis de ácidos nucleicos: (5.a) PCR: Nucleótidos fosfatados (DNTP's), Enzimas *Taq* polimerasa (Invitrogen), primers o partidores ITS1 e ITS4 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), muestras de ADN control positivo y negativo. (5.b) RFLP: Enzimas endonucleasas de restricción *HaeIII* (Thermo), *AluI* (Invitrogen), *Apal* (Fermentas), *SphI* (Biolabs). (5.c) Electroforesis: gel poliacrilamida 8%, gel de agarosa al 1%, solución de tinción a base de nitrato de plata según protocolo diseñado previamente (Espejo y Escanilla, 1993), solución de tinción de bromuro de etidio 1µg/mL (Sambrook *et al.*, 1989, citado por Querol *et al.*, 1992) y marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen) cuya escala es adecuada para el dimensionamiento del ADN de doble hebra y está compuesto de repeticiones de fragmentos de un plásmido de ADN de 100 a 1000 pb, incrementando en 100pb por vez, presenta un fragmento adicional de 1500pb.

6. Muestras de vino: Syrah año 2012, tomadas en fases de inicio, medio y final fermentación alcohólica. Se empleó un control inoculado con *Saccharomyces cerevisiae*. El otro vino fue inoculado de forma secuencial con *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* marca Lallemand.

Equipos:

1. Fuente de poder. PolyScience® model 500 Powersupply, Estados Unidos
2. Cámara de electroforesis horizontal para gel de agarosa. BioRad Mini-subCell®GT, Estados Unidos.
3. Cámara de electroforesis vertical para gel de poliacrilamida. BioRad Mini Protean® 3Cell, Estados Unidos.
4. Termociclador. Marca Biometra. TProfessional Basic gradient, Alemania.
5. Baño termoregulado. GFL®1092-Gesellschaft LabortechnikmbIt D3006 Burgwedel, Alemania

6. Transiluminador UV. Vilber Lourmat, Francia.
7. Transiluminador de Luz blanca. Sin referencia.
8. Microondas. LG MS2049G, PRC.

Métodos

a. Preparación de muestras y cultivo de levaduras comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbruekii*

a.1 Cultivo de levaduras comerciales

Las levaduras comerciales escogidas, fueron hidratadas de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Se cultivaron en medio líquido YPG (extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Glucosa 2%) (Kawahata *et al.*, 2007) “over night” a una temperatura de 28°C. Se tomó un 1mL de cada cultivo, por separado, se centrifugó a 5000g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellets fue re-suspendido en 293 µL de EDTA 50mM, para realizar la extracción de ADN.

a.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN del cultivo de levaduras seleccionadas comerciales, se agregó enzima liticase 20mg/mL (7,5 µL) y se incubó a 37°C por 20 min. Posteriormente, se utilizó el kits comercial MoBio Power Soil, siguiendo indicaciones del fabricante. El ADN extraído se guardó a -20°C, hasta su procesamiento.

b. Análisis Moleculares a cultivos de levadura comercial

b.1 Amplificación por PCR de las regiones ITS-5.8S

La amplificación de los espacios internos de transcripción del gen 5.8S se realizó según lo describe Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Se empleó primer o partidor ITS1 (5 'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') 0,5 µM; y el primer o partidor ITS4

(5 'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') 0,5 μM ; nucleótidos 10 μM ; 10 μL de Tampón 10X, Taq polimerasa (Invitrogen) 1X y Cloruro de Magnesio 1,5 mM (MgCl_2). De esta forma, la mezcla de PCR empleada para un volumen final de 30 μL por cada 1 μL de ADN a amplificar consistió en: 0,3 μL de cada primer de concentración 50pmol/ μL ; 0,3 μL de nucleótidos de concentración 5mM; 10 μL de solución tampón 10X, 0,5 μL de enzima Taq polimerasa 5X; 1,8 μL de Cloruro de Magnesio 25mM y 15.86 μL de agua libre de nucleótidos.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: temperatura inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, hibridación a 55,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, y una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

Los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida (8%). Se determinó el tamaño de los fragmentos del amplificado, mediante la utilización del marcador 100 pb. La electroforesis fue realizada a 200V por 20 minutos. Posteriormente, los geles se revelaron según protocolo diseñado por Espejo y Escanilla, 1993. Fueron visualizados mediante transiluminador con luz blanca, para luego ser fotografiados. De forma conjunta se realizó este mismo procedimiento para muestras control de ADN de levadura positiva y negativa validada previamente, con la finalidad de evidenciar la correcta extracción y amplificación del ADN extraído.

b.2 Secuenciación de los productos de PCR

Para la secuenciación de las regiones ITS-5.8S, los amplicones de los cultivos de levaduras comerciales, fueron enviadas al Laboratorio MACROGEN (Korea) para su secuenciación. Las secuencias fueron editados manualmente en Bioedit v7.1.3 (Hall, 1999). Posteriormente fue verificada su identidad a través de la bases de datos Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

b.3 Análisis “in silico”

Fueron extraídas secuencias de levaduras similares a las levaduras comerciales analizadas de las bases de datos del NCBI, con la finalidad de tener un grupo de secuencias de la especie *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Todas fueron alineadas en Clustal W (Larkin *et al.* 2007), para encontrar zonas diferenciadoras entre las especies, a través del análisis de la entropía que indica la variabilidad genética del alineamiento.

Se escogieron enzimas de restricción empleando el listado del software Bioedit v7.1.3 (Hall, 1999). Fueron generados los respectivos mapas de restricción “in silico” empleando las endonucleasas AluI, ApaI, ApaLI, BamHI, CfoI, EcoRI, HaeII, HaeIII, HindIII, HinfI, HpaII, HpyCH4IV, HpyCH4V, MboI, MssI, NaeI, NheI, NotI, RsaI, Sall, SbfI, SfiI, SmaI, SphI, SwaI, XhoI. De acuerdo al análisis de zonas diferenciadoras y los perfiles de restricción arrojados se diseñó la estrategia de análisis con las enzimas AluI, ApaI, HaeIII y SphI.

b.4 Digestión de ADNr amplificado (PCR-RFLP)

Los productos de PCR (2 µL) fueron digeridos con las enzimas endonucleasas de restricción AluI (Invitrogen), ApaI (Fermentas), HaeIII (Thermo), SphI (Biolabs), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los fragmentos de restricción se separaron en geles de poliacrilamida de 8 %. La determinación del tamaño de los fragmentos de restricción, se realizó mediante la utilización del marcador 100 pb. Después de la electroforesis (150V por 45 minutos), los geles se revelaron según describe Espejo y Escanilla, 1993 y fueron visualizados mediante transiluminador luz blanca. El producto de digestión con la enzima de restricción ApaI, se realizó tinción con bromuro de etidio 1µg/mL (Sambrook *et al.*,1989, citado por Querol *et al.*, 1992) y fue visualizado con luz ultravioleta. Luego fueron fotografiados.

c. Aplicación de la estrategia RFLP en mezclas de ADN

c.1 Cuantificación del ADN Extraído

Los amplicones de los cultivos de levaduras comerciales fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1%. Después de la electroforesis el gel fue revelado en Bromuro de etidio 1µg/mL y visualizado en transiluminador con luz UV. Posteriormente, fue fotografiado. La foto se descargó en el programa PhotoShop CS y se cuantificó el ADN a través del análisis de histograma de píxeles.

c.2 Mezclas de ADN

Se realizaron 7 mezclas de ADN *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos) y *Torulaspota delbrueckii* (TD 291) en proporciones 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 respectivamente.

c.3 Amplificación por PCR de las regiones ITS-5.8S

La amplificación de los espacios internos de transcripción del gen 5.8S se realizó según lo describe Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), metodología descrita anteriormente en el apartado b.1.

c.4 Digestión de ADNr amplificado (PCR-RFLP)

La digestión de los amplicones fue realizada según metodología descrita anteriormente en el apartado b.4.

d. Muestras de vino en las diferentes etapas de elaboración

Las muestras de vino en fermentación alcohólica fueron de la variedad Syrah, cosechado en el 2012. Este vino fue elaborado en la bodega Aplatagua.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo a través de la inoculación secuencial de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* TD 291 y *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Clos, proporcionadas por la empresa

Lallemand. El mosto empleado como muestra control, fue inoculado con la levadura Lalvin Clos únicamente. En ambos casos las levaduras fueron previamente rehidratadas según protocolo Lallemand.

El proceso de co-fermentación fue realizado, inoculando en primer lugar la levadura TD 291 (*Torulaspota delbrueckii*). Cuando la densidad del mosto descendió de 10 a 15 puntos, de manera secuencial, se inoculó la levadura Lalvin Clos (*Saccharomyces cerevisiae*). Ambas dosis de inoculación fueron de 25g/hL.

Se tomaron muestras al inicio y mitad de fermentación alcohólica, para análisis moleculares posteriores.

d.2 Aplicación de la estrategia RFLP en muestras de vino

d.2.1 Preparación de las muestras previo a extracción ADN

Se tomó una alícuota de 1mL de cada muestra de vino y fue centrifugada por 10 min a 5000g. El pellet fue re-suspendido en 293 μ L de EDTA 50mM, para continuar con la extracción de ADN.

d.2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN contenido en las muestras de vino, se agregó enzima liticosa 20mg/mL (7,5 μ L) a la preparación anterior y se incubó a 37°C por 20 min. Posteriormente, se utilizó el kits comercial MoBio Power Soil, siguiendo indicaciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20°C, hasta su procesamiento.

d.2.3 Amplificación por PCR de las regiones ITS-5.8S

La amplificación de los espacios internos de transcripción del gen 5.8S se realizó según lo describe Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), metodología descrita anteriormente en el apartado b.1.

d.2.4 Digestión de ADNr amplificado (PCR-RFLP)

La digestión de los amplicones fue realizada según metodología descrita anteriormente en el apartado b.4.

e. Comparación de los perfiles de restricción

Los perfiles de restricción experimentales fueron comparados con los mapas de restricción generados con el Bioedit v7.1.3 para comprobar la estrategia diseñada “in silico”.

A continuación se resume los análisis moleculares realizados en la Figura 1

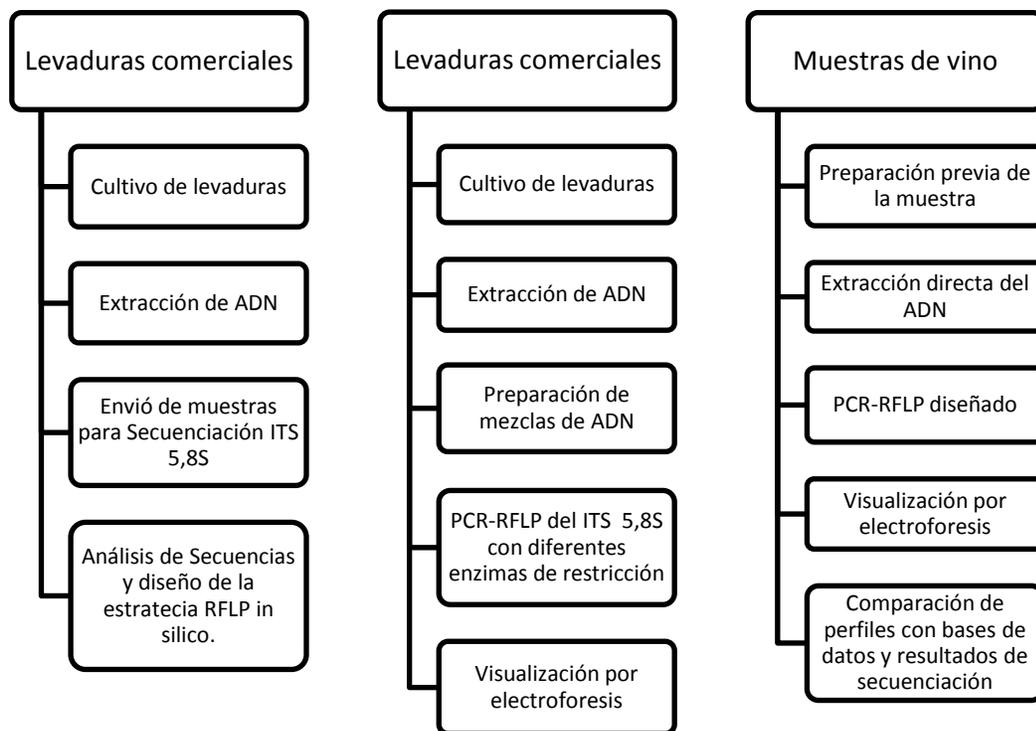


Figura 1. Análisis Moleculares en ADN proveniente de levaduras comerciales y de muestras de vino.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuencias diferenciadoras de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*.

Las levaduras comerciales de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*, suministradas por la empresa Lallemand fueron cultivadas y luego sometidas a un proceso de extracción de ADN, para luego amplificar la región ribosomal ITS del gen 5.8S. Esta reacción de PCR y su posterior electroforesis, permitió obtener amplificadas cercanos a los 850 pares de base (pb) para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos) y 800 pb para la levadura *Torulaspota delbrueckii* (TD 291), congruente con lo expuesto por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y Granchi *et al.* (1999).

Esto se muestra en la Figura 2, los carriles señalados como TD y Clos corresponde a las muestras *Torulaspota delbrueckii* (TD 291) y *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos), respectivamente. Además, se identifica con la letra L al marcador de 100 pb, el signo negativo (-) significa ausencia de ADN indicando el correcto desempeño de los partidores, el signo positivo (+) es una muestra que se emplea para validar la correcta ejecución del proceso de amplificación.

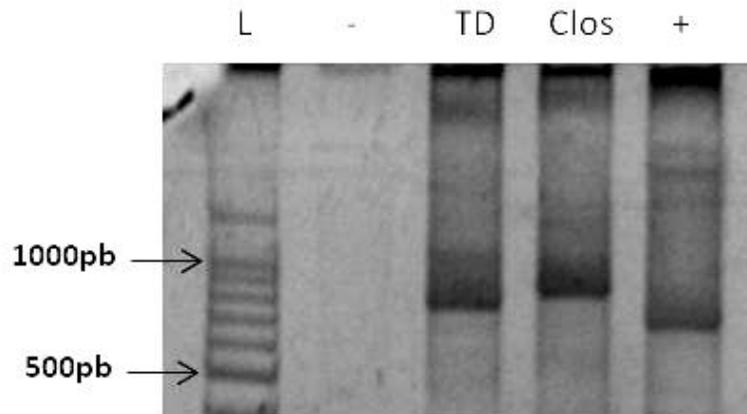


Figura 2. PCR levaduras comerciales. (L) Marcador 100pb (-) ADN Ausente (TD) *T. delbrueckii*, (Clos) *S. cerevisiae* (+) ADN Presente.

Los amplicones obtenidos, fueron enviados a secuenciar al laboratorio MACROGEN (Korea). Estos resultados fueron editados manualmente en el programa Bioedit versión 7.1.3 (Hall 1999), lo que permitió el análisis de las secuencias y contrastar con el tamaño obtenido a través de la electroforesis. Se evidenciaron tamaños de 840 pb para Lalvin Clos y 798 pb para TD291 a través de la secuenciación, siendo estos valores similares a los obtenidos por electroforesis. De esta forma los resultados presuntivos (en base al tamaño) derivados de la electroforesis, quedan confirmados por el análisis de secuencia. Esta confirmación permite proponer la electroforesis como parte de un método más rutinario y confiable para la estimación del tamaño de bio-moléculas de interés.

A partir de las secuencias obtenidas y empleando las bases de datos publicadas en internet <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, se obtuvieron 40 secuencias similares a Lalvin Clos (*Saccharomyces cerevisiae* comercial) y 22 secuencias similares a TD291 (*Torulaspora delbrueckii* comercial). En los Cuadros 1 y 2 se exponen los datos de estas secuencias identificadas por el nombre de las cepas, su respectivo código de acceso en Genbank, el porcentaje de identidad que cada cepa tiene con

su respectiva levadura comercial y el porcentaje de cobertura. Éste último, se refiere al fragmento de la secuencia seleccionada que está contenido en la secuencia de referencia.

Cuadro 1. Base de datos empleada de secuencias de *Torulasporea delbrueckii*

| Cepa Referencia: <i>Torulasporea delbrueckii</i> TD291 Lallemand | | | |
|---|--------------------------|--------------------|--------------------|
| Nombre de Cepa | Genbank data base | % Identidad | % Cobertura |
| 138 | JF916549.1 | 99 | 93 |
| 94B | JF916548.1 | 99 | 93 |
| BBMV3FA5 | JX234568.1 | 99 | 100 |
| CBS1149 | HE616749.1 | 100 | 100 |
| CBS404 | AJ229075.1 | 99 | 88 |
| M15 | HQ379151.1 | 99 | 91 |
| MUCL51211 | FN394007.1 | 100 | 99 |
| NK2324 | EU798699.1 | 99 | 91 |
| NRIC1398 | AB212647.1 | 100 | 88 |
| NRIC1407 | AB212648.1 | 100 | 88 |
| NT1102 | AB469378.1 | 99 | 95 |
| PT032 | EU555308.1 | 100 | 85 |
| T6 | FJ838774.1 | 97 | 88 |
| TD895981 | D89598.1 | 100 | 100 |
| TD89601 | D89601.1 | 99 | 96 |
| TD89605 | D89605.1 | 100 | 99 |
| TDAY046187 | AY046187 | 100 | 88 |
| TDJF920157 | JF920157.1 | 99 | 86 |
| WM821 | EF568083.1 | 100 | 94 |
| ZIM2458 | HE660080.1 | 99 | 97 |
| ZIM2460 | HE799671.1 | 99 | 92 |
| ZY8 | FJ491947.1 | 99 | 97 |

Cuadro 2. Base de datos empleada de secuencias de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa Referencia: *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Clos Lallemand

| Nombre de Cepa | Genbank data base | % Identidad | % Cobertura |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| ATCC46740 | JX094776.1 | 99 | 97 |
| CBS405 | AM262830.1 | 99 | 98 |
| CBS4054 | AM262831.1 | 99 | 98 |
| CBS453 | AM262829.1 | 99 | 98 |
| CHFYO901 | EU649673.1 | 99 | 100 |
| CHY1011 | EU649672.1 | 99 | 100 |
| DAOM216365 | JN942842.1 | 100 | 99 |
| EC1118 | FN393078.1 | 99 | 100 |
| F2-1 | EU019225.1 | 99 | 98 |
| HA1829 | AM262826.1 | 99 | 98 |
| HA1835 | AM262824.1 | 99 | 98 |
| HA1856 | AM262827.1 | 99 | 98 |
| HA1869 | AM262828.1 | 99 | 98 |
| I28 | JX497730.1 | 99 | 96 |
| ITEM10465 | FN376421.1 | 99 | 100 |
| ITEM10466 | FN376422.1 | 99 | 100 |
| KDLYS901 | HM771640.1 | 99 | 98 |
| MUCL51208 | FN393995.1 | 99 | 99 |
| MUCL51213 | FN393997.1 | 99 | 100 |
| MUCL51215 | FN393996.1 | 99 | 98 |
| MYCO10831 | AY525600.1 | 99 | 98 |
| NCL130 | FJ231432.1 | 99 | 99 |
| SB1 | HM535662.1 | 99 | 99 |
| SC 793809 | FJ793809.1 | 99 | 100 |
| SCAY235811 | AY235811.1 | 99 | 95 |
| ST3352 | AY939814.1 | 99 | 98 |
| UOAHCPF4214 | GQ376086.1 | 99 | 98 |
| UOAHCPF5911 | GQ376091.1 | 99 | 98 |
| W22 | DQ167468.1 | 99 | 99 |
| W24 | DQ167469.1 | 99 | 100 |
| W36 | DQ167471.1 | 99 | 99 |
| W37 | DQ167472.1 | 99 | 99 |
| Wu-Y2 | JN887919.1 | 99 | 97 |
| X14-3 | JN837099.1 | 99 | 99 |
| X68-2 | JN837100.1 | 99 | 98 |
| XSQ68 | JF825468.1 | 99 | 100 |
| ZP541 | EU1457641.1 | 99 | 100 |
| ZY9 | FJ502348.1 | 100 | 100 |

De los Cuadros 1 y 2 se observa que los porcentajes de identidad promedio fueron de 99% con referencia a cada levadura comercial analizada. Además, de un porcentaje de cobertura promedio de 98% para las *S. cerevisiae* y 93% de cobertura para las *T. delbrueckii*. Todo ello indica que existe una gran similitud en la región ribosomal ITS del gen 5.8S en todas las *S. cerevisiae* analizadas. De igual forma ocurre para todas las *T. delbrueckii*, señalando que la variación genética es acotada en cada grupo de levaduras. Lo anterior permite inferir que a través del análisis ribosomal del ITS 5.8S no es posible discriminar cada una de las cepas dentro de cada especie. Para distinguir a nivel de cepa se ha propuesto, el análisis de restricción del ADN mitocondrial (Querol *et al.* 1992; Ortiz *et al.* 2013) y el análisis por micro-satélites (Marinangeli *et al.*, 2004; Orlic *et al.*, 2010), como herramientas factibles para ello.

Con la finalidad de ver si existe la posibilidad de discriminar entre ambas levaduras a través del análisis del ITS, se evalúa la existencia de variación genética entre *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, mediante la alineación de todas las secuencias en Clustal W (Larkin *et al.*, 2007). Durante este alineamiento múltiple de un total de 920 nucleótidos, se observó la variabilidad genética del ITS 5.8S analizando la entropía, ya que esto permite identificar zonas variables o diferenciadoras entre ambas levaduras (Hall, 1999). La Figura 3, destaca los valores de entropía a lo largo del alineamiento. Se observan bajos niveles de entropía en gran parte de la zona intermedia del gráfico, lo que señala en este caso posiciones conservadas. De igual forma, se evidencian niveles de entropía elevados desde los extremos hacia el centro del ITS analizado; indicando esto presencia de zonas diferenciadora.

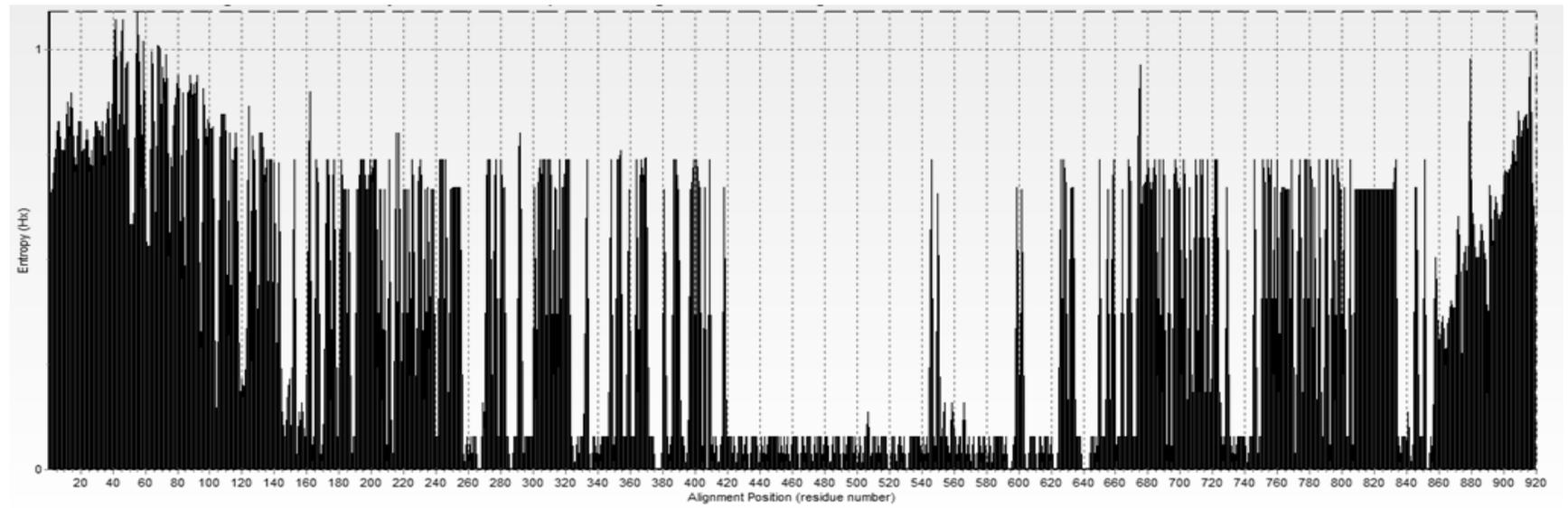


Figura 3. Entropía de las secuencias del ITS 5.8S de levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*

Las principales zonas diferenciadoras entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, se muestran en el Cuadro 3, el cual indica la posición de los nucleótidos durante el alineamiento y su correspondiente posición dentro de la secuencia original para ambas levaduras. Además, se expone el valor de la entropía para cada zona. Este valor señala el nivel de variabilidad genética/diferenciación en cada zona. A mayor entropía mayores diferencias entre las levaduras.

Cuadro 3. Zonas diferenciadoras en el alineamiento de las secuencias genéticas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*.

| Zonas | Posición en el alineamiento | Posición en la secuencia <i>S. cerevisiae</i> | Posición en la secuencia <i>T. delbrueckii</i> | Entropía |
|-----------|-----------------------------|---|--|----------|
| Z1 | 86 – 152 | 77 – 140 | 46 – 108 | 0,71 |
| Z2 | 170 – 203 | 178 – 190 | 138 – 139 | 0,71 |
| Z3 | 249 – 255 | 236 – 242 | 182 – 183 | 0,67 |
| Z4 | 301 – 322 | 283 – 301 | 221 – 242 | 0,71 |
| Z5 | 626 – 685 | 586 – 643 | 523 – 577 | 0,60 |
| Z6 | 696 – 703 | 654 – 661 | 588 – 595 | 0,61 |
| Z7 | 762 – 767 | 718 – 723 | 649 – 655 | 0,67 |
| Z8 | 808 – 830 | 761 – 762 | 694 – 719 | 0,67 |

A partir del análisis de las secuencias de levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, se identificaron 8 zonas diferenciadoras, con un máximo valor de entropía de 0,71 y un mínimo de 0,60; lo que indica que existe potencial para lograr distinguir ambas levaduras a partir del análisis del ITS 5.8S del ADN ribosomal (Guillamón, 1998; Hoyos, 2012). Por ello, el diseño de la estrategia “in silico” requirió la búsqueda y selección de endonucleasas de restricción que fuesen capaces de reconocer sitios genéticos ubicados en las zonas diferenciadoras identificadas.

Estrategia RFLP “in silico”

Esta estrategia fue diseñada con la intención de identificar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* en procesos donde se empleen ambas especies conjuntamente.

Empleando el programa Bioedit versión 7.1.3 (Hall, 1999); se generaron “in silico”, los perfiles de restricción de la región ITS 5.8S de las secuencias de levaduras anteriormente mencionadas. Se usaron 25 enzimas de restricción comerciales, contenidas en la lista predeterminada del software. De acuerdo a los perfiles de restricción obtenidos “in silico” y a su posterior contraste con las ocho zonas diferenciadoras mencionadas en el Cuadro 3; se seleccionaron cuatro enzimas candidatas para permitir la identificación conjunta de las dos levaduras, estas son: AluI, ApaI, HaeIII y SphI.

De manera gráfica se muestran en la Figura 4, los mapas de restricción generados “in silico”, por el programa Vector NTI v11.5.0, para las secuencias de la región ITS del gen 5.8S de cada levadura comercial y las 8 zonas diferenciadoras identificadas como Z1 a Z8.

La enzima AluI genera “in silico” cortes de restricción en la Zona diferenciadora 1 para la levadura *S. cerevisiae* (Lalvin Clos) y en la Zona 6 y 8 para la *T. delbrueckii* (TD291). La endonucleasa ApaI solo reconoce la secuencia de la región del ITS de la *S. cerevisiae* cercano a la Zona 4, de igual forma lo hace la enzima HaeIII generando fragmentos de restricción en las Zonas 1, 4 y 5. La enzima SphI reconoce posiciones cercanas a la Zona 5 para la *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

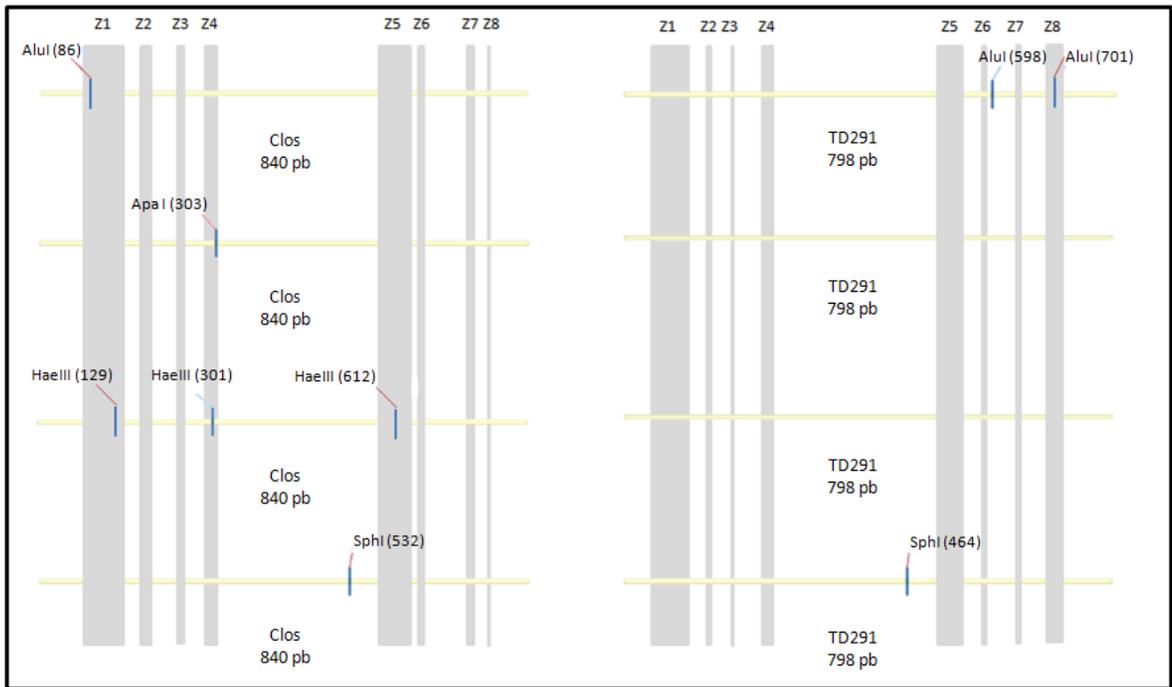


Figura 4. Mapas de restricción de la región ITS 5.8S de levaduras comerciales de las especies *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (Lalvin Clos y TD291)

Con referencia a los lugares de corte de cada una de las endonucleasas se obtienen los tamaños de los fragmentos que conforman el perfil de restricción, información que se destaca en los cuadros 4 y 5, donde se señala el nombre de cada cepa y el perfil de restricción que generó cada enzima durante el análisis “in silico”.

Cuadro 4. Fragmentos de Restricción (pb) generados “in silico” para *Saccharomyces cerevisiae*

| Nombre de la cepa | AluI | ApaI | HaeIII | SphI |
|-------------------|---------|----------|------------------------|----------|
| Lalvin Clos | 86, 754 | 303, 537 | 129, 172, 228, 311 | 308, 532 |
| CBS4054 | 87, 756 | 305, 538 | 29, 130, 144, 229, 311 | 309, 534 |
| CHFYO901 | 87, 758 | 304, 541 | 130, 172, 232, 311 | 312, 533 |
| DAOM216365 | 65, 732 | 282, 515 | 108, 122, 206, 361 | 286, 511 |
| ITEM 10465 | 48, 754 | 265, 537 | 91, 172, 228, 311 | 308, 494 |
| KDLYS901 | 56, 725 | 273, 508 | 99, 172, 199, 311 | 279, 502 |
| MUCL 51213 | 89, 759 | 306, 542 | 91, 172, 274, 311 | 312, 536 |
| NCL 130 | 3, 732 | 218, 517 | 44, 172, 208, 311 | 288, 447 |
| SB1 | 845 | 300, 545 | 126, 172, 236, 311 | 316, 529 |
| ST 3352 | 89, 757 | 306, 540 | 132, 172, 230, 312 | 313, 536 |
| UOA HCPF5911 | 87, 755 | 304, 538 | 130, 172, 229, 311 | 309, 533 |
| W24 | 82, 748 | 299, 541 | 125, 172, 231, 312 | 311, 529 |
| W37 | 82, 751 | 299, 534 | 125, 172, 225, 311 | 305, 528 |
| X68-2 | 86, 755 | 304, 537 | 129, 173, 228, 311 | 308, 533 |
| XSQ 68 | 38, 758 | 256, 540 | 81, 173, 231, 311 | 311, 485 |
| ZP541 | 61, 754 | 278, 537 | 104, 172, 228, 311 | 308, 507 |
| ZY9 | 87, 735 | 304, 518 | 130, 172, 209, 311 | 289, 533 |
| CHY1011 | 87, 756 | 303, 540 | 130, 171, 231, 311 | 311, 532 |
| EC1118 | 86, 759 | 300, 545 | 29, 129, 144, 228, 315 | 312, 533 |
| F2-1 | 90, 755 | 307, 538 | 133, 172, 229, 311 | 309, 536 |
| HA1835 | 87, 756 | 305, 538 | 29, 130, 144, 229, 311 | 309, 534 |
| I28 | 84, 753 | 301, 536 | 127, 172, 227, 311 | 307, 530 |
| ITEM10466 | 50, 756 | 267, 539 | 93, 172, 230, 311 | 310, 496 |
| MUCL51215 | 89, 741 | 306, 524 | 132, 172, 214, 312 | 294, 536 |
| SCAY235811 | 86, 721 | 303, 504 | 132, 169, 195, 311 | 275, 532 |
| UOA HCPF4214 | 87, 740 | 304, 523 | 130, 172, 214, 311 | 294, 533 |
| W22 | 82, 755 | 299, 538 | 125, 172, 229, 311 | 309, 528 |
| X14-13 | 85, 761 | 303, 543 | 128, 169, 238, 311 | 318, 528 |
| HA1869 | 86, 754 | 303, 537 | 129, 172, 228, 311 | 308, 532 |

Cuadro 5. Fragmentos de Restricción (pb) generados “in silico” para *Torulaspora delbrueckii*

| Nombre de la cepa | Alul | Apal | HaeIII | SphI |
|-------------------|--------------|------|--------|----------|
| TD 291 | 97, 103, 598 | 798 | 798 | 334, 464 |
| 138 | 58, 103, 583 | 744 | 744 | 295, 449 |
| BB MV3FA5 | 98, 103, 598 | 799 | 799 | 335, 464 |
| MUCL 51211 | 97, 103, 598 | 798 | 798 | 334, 464 |
| NT1102 | 97, 103, 567 | 767 | 767 | 334, 433 |
| PT032 | 51, 103, 530 | 684 | 684 | 288, 396 |
| T6 | 39, 104, 571 | 714 | 714 | 277, 437 |
| TD 89601 | 69, 103, 598 | 770 | 770 | 306, 464 |
| TDAY046187 | 39, 103, 568 | 710 | 710 | 276, 434 |
| ZIM 2458 | 91, 103, 573 | 767 | 767 | 328, 439 |
| ZIM 2460 | 93, 107, 539 | 739 | 739 | 334, 405 |
| ZY8 | 77, 102, 598 | 778 | 778 | 314, 464 |

Se puede observar en ambos cuadros, un único patrón de restricción para las levaduras *S. cerevisiae* y otro distinto para las levaduras *T. delbrueckii*, determinado por cada una de las cuatro endonucleasas empleadas. Las variaciones sutiles en el tamaño de los fragmentos se deben a las diferencias en la longitud de las secuencias analizadas.

En el Cuadro 4, correspondiente a los fragmentos de restricción de las levaduras *S. cerevisiae*, se evidencian 4 patrones de restricción diferentes al común observado en el resto de las cepas analizadas, estos corresponden al patrón de la cepa SB1 digerida con la enzima Alul y a los patrones de las cepas CBS4064, EC1118 y HA1835 digeridas con HaeIII. En relación a la levadura SB1 se observó que presenta una mutación en la posición 81 donde debería existir un sitio de reconocimiento para la enzima Alul AG´CT, sin embargo se cambia la citocina por tiamina quedando un fragmento AGTT donde no se produce el corte enzimático. Con respecto a las cepas CBS4054 y HA1835 igualmente ocurre una mutación en

la posición 159 y para EC1118 en la posición 153, donde se inserta una citocina formando un fragmento de secuencia GG´CC punto de reconocimiento para la HaeIII generando un corte adicional a las demás secuencias analizadas (fragmento de 29 pb). Esto demuestra que los genomas de levaduras están sujetos a numerosos procesos dinámicos que los modifican (Liti y Louis 2005), y que a pesar de solo tener un 1% de diferencias en la región del ITS (identidad del 99%) implica una ventana para revelar diferencias entre levaduras vnicas genéticamente cercanas.

En consecuencia, el ITS 5.8S del ADN ribosomal, permite la diferenciación de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Granchi *et al.*, 1999), y podría ser empleado inclusive en sistemas donde ambas especies conviven, como es el caso de las fermentaciones de inoculación secuencial; donde se buscan mejoras aromáticas en el vino empleando levaduras *no-Saccharomyces* debido a su actividad glucosídica (Ciani y Maccarelli, 1998; Mendes *et al.* 2001; Delfini *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2011; Maturano *et al.*, 2012). De esta forma, otras levaduras *no-Saccharomyces*, también pudiesen ser identificadas a través de la metodología antes desarrollada en este trabajo. Tal es el caso de las levaduras *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyver*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces carsonii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, las cuales al igual que la *Torulaspota delbrueckii* están siendo empleadas como una herramienta para realzar el aroma y complejidad del vino (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2003; Hernández-Orte *et al.*, 2007). Para lograrlo es necesario realizar un análisis de las secuencias de la región del ITS 5.8S de cada una de estas levaduras empleado herramientas bioinformáticas, que permitan a su vez compararlas con las secuencias de levaduras *Saccharomyces* y poder determinar zonas diferenciadoras entre ambas, de esta forma identificar cual o cuales endonucleasas permiten generar perfiles de restricción distintivos a través del PCR- RFLP.

Evaluación de la estrategia RFLP para diferenciar levaduras comerciales y sus mezclas

Los amplicones del ITS de las levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, fueron sometidos a RFLP con las 4 enzimas de restricción seleccionadas (AluI, ApaI, HaeIII, SphI), con la finalidad de comprobar de forma experimental los resultados obtenidos “in silico”. Luego de la electroforesis, se evidencia que las levaduras comerciales (Lalvin Clos y TD291) generan fragmentos de restricción diferentes y distinguibles con las enzimas de restricción seleccionadas. Esto coincide con los datos obtenidos durante el análisis “in silico” para cada enzima.

En el Cuadro 6, se comparan los tamaños de los fragmentos obtenidos “in silico” y de forma experimental a través de la electroforesis, para cada levadura comercial y su respectiva enzima de restricción. Se visualizó una pequeña diferencia en el perfil de restricción obtenido con la endonucleasa AluI para la levadura *T. delbrueckii*, ya que el fragmento de menor tamaño (97 pb “in silico”) no logró ser visualizado. Esto podría deberse a la sobre posición durante la electroforesis con bandas cercanas en tamaño (103 pb “in silico”).

Cuadro 6. Comparación de fragmentos de restricción “in silico” y experimental

| Enzima de restricción | Fragmentos de restricción (pb) <i>S. cerevisiae</i> Lalvin Clos | | Fragmentos de restricción (pb) <i>T. delbrueckii</i> TD291 | |
|-----------------------|--|--------------------|---|----------|
| | “in silico” | EXP | “in silico” | EXP |
| AluI | 86, 754 | < 100, 800 | 97, 103, 598 | 100, 600 |
| ApaI | 303, 537 | 310, 570 | 798 | 800 |
| HaeIII | 129, 172, 228, 311 | 130, 170, 230, 310 | 798 | 800 |
| SphI | 308, 532 | 310, 580 | 334, 464 | 330, 470 |

EXP: Experimental

Para complementar estos resultados se realizó un testeo sobre muestras de mezclas de ADN de las levaduras comerciales analizadas. El ADN de cada levadura fue cuantificado y mezclado en distintas proporciones (Lalvin Clos: TD291) previo a la amplificación. Luego se procedió a aplicar la estrategia PCR-RFLP diseñada.

En la figura 5, se muestran los resultados de la electroforesis de las mezclas de ADN digeridas con las enzimas Apal, HaeIII y SphI, señaladas como a, b y c respectivamente. Los carriles identificados con la letra L corresponden al marcador de 100 pb empleado para aproximar los tamaños de los fragmentos generados; los carriles identificados como Clos y TD corresponden a las dos levaduras comerciales empleadas en este estudio y los carriles siguientes están señalados con la debida proporción en que estuvieron mezclados los ADN. El carril nombrado como 1:1 indica que los ADN están mezclados en igual proporción y se observa que para todas las endonucleasas empleadas, fue posible distinguir los perfiles de restricción de ambas levaduras, lo que permite identificarlas a pesar de la mezcla. Luego al ir aumentando Lalvin Clos de 2 a 10 veces mayor proporción en la mezcla, fue igualmente posible identificar cada una de las levaduras presentes, lo mismo ocurre al aumentar la proporción de TD291 de 2 a 10 veces mayor proporción en la mezcla; esto indica que a pesar que una de las levaduras este 10 veces en menor proporción que la otra, pueden de igual forma ser visualizadas e identificadas ambas en la mezcla aplicando la estrategia RFLP diseñada, ya que, los perfiles de restricción del ITS de cada una de las levaduras no se ven alterados al estar mezclados ambos ADN. En tal sentido, la identificación de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* es posible, en sistemas donde se encuentran ambas levaduras simultáneamente, a través del uso de endonucleasas de restricción (Querol *et al.*, 1992; Clavijo *et al.*, 2010).

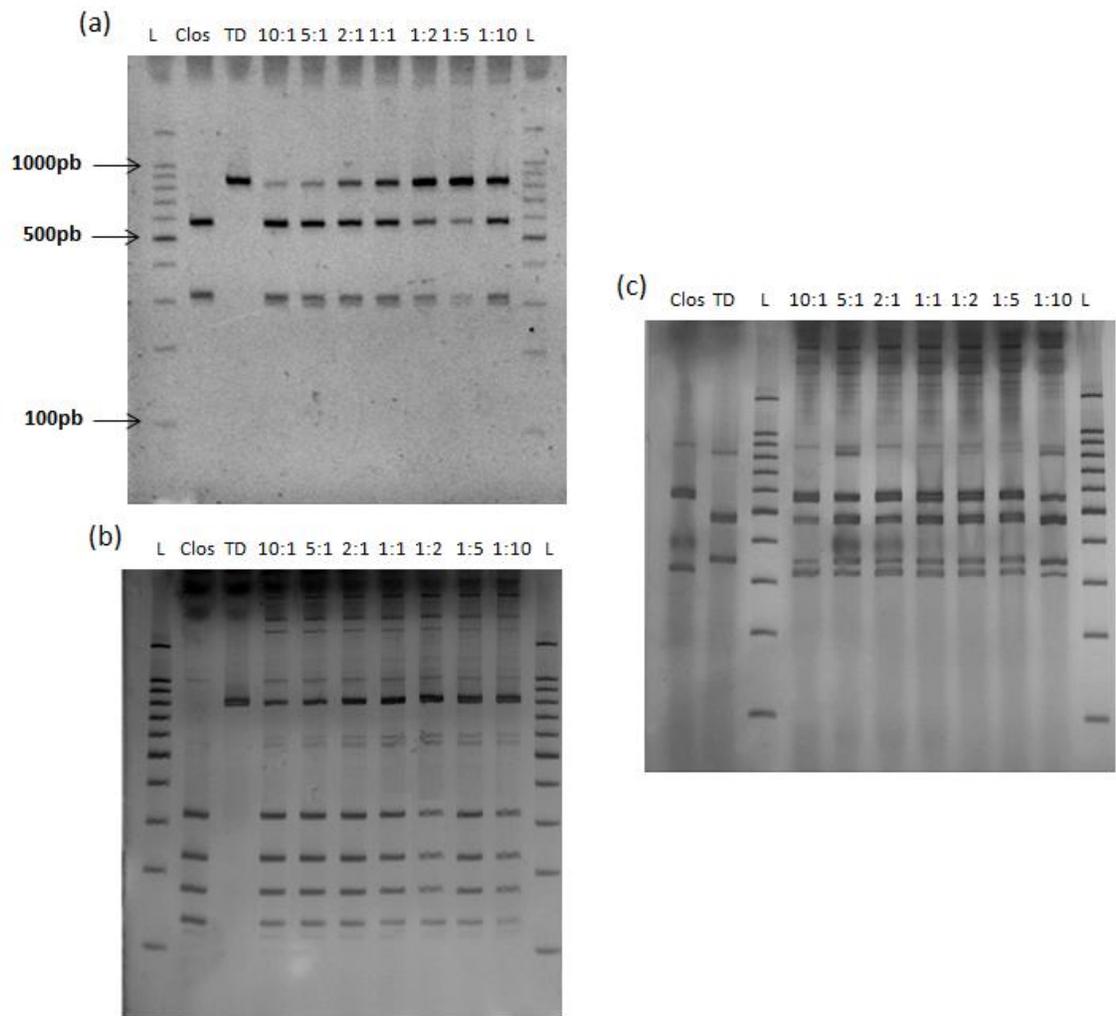


Figura 5. PCR-RFLP de mezclas de ADN de levaduras comerciales. (a) RFLP con Enzima Apal (b) RFLP con Enzima HaeIII, (c) RFLP con Enzima SphI (L) Marcador 100 pb (Clos) *S. cerevisiae*, (TD) *T. delbrueckii*, (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) Proporciones *S. cerevisiae*: *T. delbrueckii*.

Extracción de ADN desde vinos co-inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*

Se propuso extraer ADN de forma directa desde vinos en fermentación inoculados con las levaduras *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* de forma secuencial. Las muestras fueron tomadas en diferentes etapas de fermentación con la finalidad de evaluar el comportamiento de las levaduras en fase inicial y media del proceso.

Para la extracción de ADN de vino en fermentación, se propuso un tratamiento previo de la muestra con enzima liticosa, para digerir la pared celular de las levaduras y posteriormente el empleo del Kit MoBio Power soil, ya que es un eficiente método para aislar el ADN genómico microbiano a partir de todo tipo de muestras ambientales, el cual ejecuta la lisis de la pared celular a través de métodos mecánicos (movimientos vibratorios repetitivos) y químicos (detergente aniónico que descompone los ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos).

Los resultados de esta extracción, se muestran en la Figura 6, donde se observa la electroforesis de las 5 muestras de ADN amplificado y previamente extraído directamente desde el vino en fermentación. Los carriles señalados como Clos y TD corresponde a las muestras *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos) y *Torulaspota delbrueckii* (TD 291), respectivamente. Los carriles 1, 3 y 4 corresponden al inicio, día 2 y etapa intermedia de la fermentación del vino control inoculado únicamente con Lalvin Clos, mientras que los carriles 2 y 5 corresponden al inicio y etapa intermedia de la fermentación del vino co-inoculado con ambas levaduras. Se identifica con la letra L al marcador de 100 pares de base (pb), las muestras -1 y -2 indican ausencia de ADN permitiendo validar el correcto desempeño de los partidores y el signo positivo (+) es una muestra que se emplea para comprobar la correcta ejecución del proceso de amplificación.

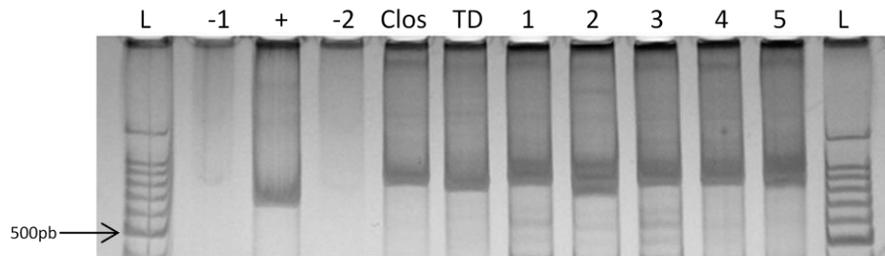


Figura 6. PCR Muestra de vino. (L) Marcador 100 pb (*Clos*) *S. cerevisiae*, (TD) *T. delbrueckii*, (1) Control inicio fermentación (2) Co-inoculación inicio de fermentación, (3) Control 2do día de fermentación (4) Control mitad de fermentación (5) Co-inoculación mitad de fermentación

De los resultados, se sugiere que el ADN aislado desde la matriz vínica tiene un alto nivel de pureza acorde con los requerimientos de la PCR. Por tanto, es posible realizar una extracción de ADN desde muestras provenientes de procesos fermentativos a pesar de ser matrices complejas. Esto permite aplicar un método molecular para monitorear la evolución de poblaciones dinámicas de microorganismos en un espacio o tiempo determinado (Giraffa *et al.*, 2004; Ilabaca *et al.*, 2008; Jara, 2009)

Evaluación de la estrategia RFLP en vinos co-inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*

Para valorar cómo se comporta esta tecnología en vinos inoculados de forma secuencial con *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*, se emplearon los amplicones obtenidos por extracción directa desde muestras de vinos co-inoculados, y fueron sometidos a digestión con las cuatro enzimas de restricción previamente seleccionadas “in silico”.

En la Figura 7, se muestran los resultados identificados con las letras a, b, c y d señalando la RFLP con las enzimas AluI, ApaI, HaeIII y SphI respectivamente. Los carriles señalados como Clos y TD corresponde a las muestras *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos) y *Torulaspota delbrueckii* (TD 291), los números 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a las muestras de vino en diferentes etapas de fermentación. Se identifica con la letra L al marcador de 100 pares de base (pb).

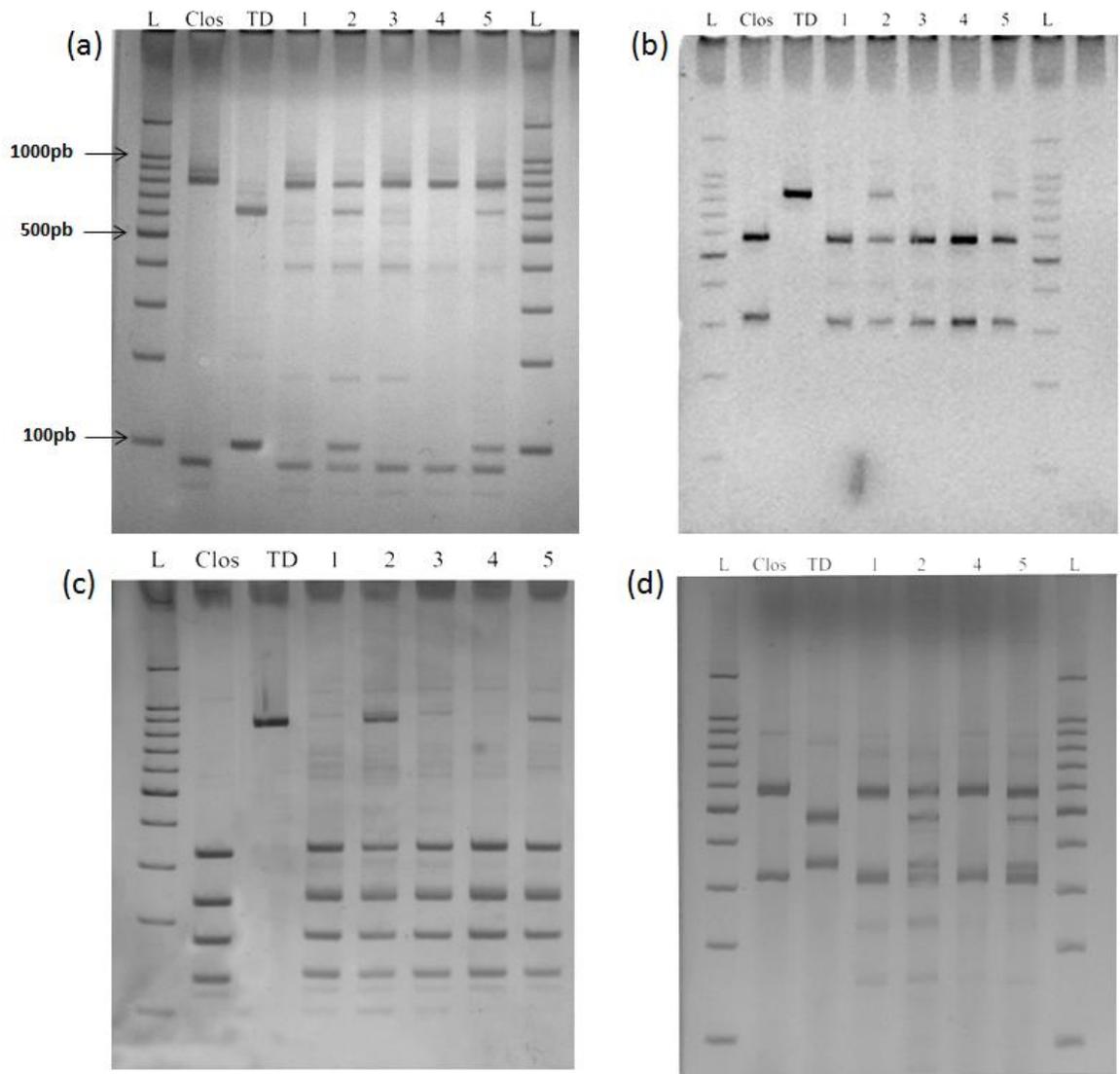


Figura 7. PCR-RFLP en muestras de vino. (a) RFLP con Enzima AluI, (b) RFLP con Enzima ApaI, (c) RFLP con Enzima HaeIII, (d) RFLP con Enzima SphI, (Clos) *S. cerevisiae*, (TD) *T. delbrueckii*, (1) Control inicio fermentación (2) Co-inoculación inicio de fermentación, (3) Control 2do día de fermentación (4) Control mitad de fermentación (5) Co-inoculación mitad de fermentación.

El proceso de la fermentación por inoculación secuencial fue monitoreado en diferentes etapas. Como control se tienen los carriles identificados con los números 1, 3 y 4 donde únicamente se visualizan las bandas correspondientes a los perfiles de la levadura *S. cerevisiae*, con cada una de las enzimas empleadas.

Esto era de esperarse ya que únicamente se inoculó este mosto con Lalvin Clos (*S. cerevisiae*).

Los carriles identificados con los números 2 y 5 corresponden al mosto experimental, el cual consistió en una co-inoculación secuencial, donde inicialmente se adicionó la levadura *no- Saccharomyces* TD 291 (*T. delbrueckii*) y al descender la densidad del mosto en 10 puntos se inoculó la levadura Lalvin Clos (*S. cerevisiae*). De esta forma, el número 2 indica lo ocurrido durante la fase inicial del proceso fermentativo, es decir, la primera inoculación con TD 291. En esta etapa, se observan claramente bandas que revelan la presencia de levaduras *S. cerevisiae* conjuntamente con las levaduras *T. delbrueckii* inoculadas. Es posible que las levaduras *S. cerevisiae* que aparecen en los geles de electroforesis durante esta fase, sean de origen nativo y/o hayan sido diseminadas desde el ambiente al mosto. Esto porque *S. cerevisiae* corresponde a la principal levadura seca activa que se inocula durante la elaboración del vino y es posible que hayan colonizado previamente el ambiente de la bodega (Granchi *et al.*, 1999; González *et al.*, 2007; Clavijo *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2013).

El carril identificado con el número 5, corresponde a la fase intermedia de la fermentación por co-inoculación secuencial, después de ser realizada la segunda inoculación del proceso donde se empleó Lalvin Clos (*S. cerevisiae*). En esta etapa se observa que ambas levaduras se encuentran implantadas en el mosto, ya que se presenta los dos perfiles de restricción de forma conjunta. Ello podría indicar que las dos levaduras conviven en el proceso fermentativo, sin embargo, al referirse al análisis de ADN con PCR convencional no es posible verificar su actividad fermentativa.

Es importante resaltar que independientemente de la enzima de restricción empleada fue posible realizar el monitoreo de la fermentación de co-inoculación secuencial, en diferentes etapas del proceso, obteniendo los perfiles de restricción

pronosticados por el análisis “in silico” y en las prueba experimentales previas en mezclas de ADN de levaduras comerciales. Las enzimas que durante este estudio proporcionaron mejores resultados de acuerdo a la calidad de la digestión y posterior revelado mediante electroforesis fueron Apal y HaeIII, esta última es una de las más usadas para identificación de levaduras (Segura, 2010).

En tal sentido, la estrategia PCR-RFLP del ITS 5.8S diseñada, se convierte en una herramienta rápida, reproducible y confiable de identificación y monitoreo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* en procesos de elaboración de vinos a través de co-inoculación secuencial.

Trabajos realizados por Querol *et al.*, 1992; Hierro *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007; Andorrà *et al.*, 2010, indican poder detectar y cuantificar levaduras en el vino, sin embargo emplean métodos dependientes de cultivo o una combinación dependiente – independiente, lo que limita los tiempos de respuesta. Además de aplicar otras herramientas biotecnológicas tales como: análisis de restricción del ADN mitocondrial y PCR en tiempo real; esta última requiere gran habilidad técnica y un costo de equipamiento alto, lo que dificulta la aplicación en procesos industriales como la elaboración de vino.

CONCLUSIONES

Las levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*, presentan zonas diferenciadoras en la región ribosomal ITS del gen 5.8S; lo que permite generar patrones de restricción distintivos entre ellas y así poder identificarlas en procesos donde ambas levaduras se encuentre de forma simultánea.

La utilización del kit de aislamiento MoBio Power soil y tratamientos previos con enzima liticosa, permiten la extracción de ácidos nucleicos, desde matrices complejas como el vino, generando ADN amplificable. Posteriormente, al aplicar RFLP con endonucleasas de restricción específicas a dichos amplicones, es posible identificar ambas levaduras y monitorear la evolución del proceso fermentativo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

ANDORRÀ, I.; S. LANDI, A. MAS, B. ESTEVE-ZARZOSO and J.M. GUILLAMÓN. 2010. Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. *Food Research International* 43: 773–779.

APONTE, M.; V. VENTORINO, G. BLAIOTTA, G. VOLPE, V. FARINA, G. AVELLONE, C. M. LANZA and G. MOSCHETTI. 2010. Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology* 27: 162–170.

BARNARD, H.; A. DOOLEY, G. ARESHIAN, B. GASPARYAN and K. FAULL. 2010. Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science* 8: 1-8.

BARRAJÓN, N.; A. CAPECE, M. ARÉVALO-VILLENA, A. BRIONES and P. ROMANO. 2011. Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology* 6: 1080-1086.

CIANI, M. and F. MACCARELLI. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 5: 199-203

CLAVIJO, A.; I. CALDERÓN and P. PANEQUE. 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology* 5: 241–245.

COMITINI, F.; M. GOBBI, P. DOMIZIO, C. ROMANI, L. LENCIONI, I. MANNAZZU and M. CIANI. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 10: 873-882.

CONN, E.; P.STUMPF, G. BRUENING and R. DOI. 2009. *Bioquímica Fundamental*. Cuarta edición. Editorial Limusa Wiley. Mexico D.F, Mexico 736 p.

DELFINI, C.; C. COCITO, M. BONINO, R. SCHELLINO, P. GAIA and C. BAIOCCHI. 2001. Definitive Evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of Neutral Precursors of Grape Aromas. *Journal Agricultural Food Chemistry* 11: 5397-5408.

ERCOLINI, D. 2004 PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297– 314.

ESPEJO, R.T. and D. ESCANILLA. 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of amplification. *Research in Virology* 144: 243–246.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; C. BELLOCH, F. URUBURU and A. QUEROL. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacer. *International Journal of Systematic Bacteriology* 9:329-337.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; M. MARTÍNEZ, X. RUBIRES, M. YUSTE-ROJAS and M. TORRES. 2011. Applied wine microbiology. *Molecular Wine Microbiology* 15: 341-355.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.; S. LLOPIS, A. QUEROL and E. BARRO. 2011. Molecular identification and characterization of wine yeasts. *Molecular Wine Microbiology* 31: 112-141.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; R. DI STEFANO and A. BRIONES. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. *Food Microbiology* 20: 35-41.

FLANZY, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Primera edición. Editorial Mundi Prensa y AMV Ediciones. Madrid, España 782 p.

GIRAFFA, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 251–260.

GONZÁLEZ, S.; E. BARRIO and A. QUEROL. 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology* 102: 1018 –1025.

GRANCHI, L.; M. BOSCO, A. MESSINI and M. VINCENZINI. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology* 87: 949–956.

GUILLAMÓN, J.; J. SABATÉ, E. BARRIO, J. CANO and A. QUEROL. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Arch Microbiol* 169: 387- 392

HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; M. CERSOSIMO, N. LOSCOS, J. CACHO, E. GARCÍA-MORUNO and V. FERREIRA. 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different Genera. *Food Chem* 107: 1064-77.

HIERRO, N.; B. ESTEVE-ZARZOSO, A. GONZÁLEZ, and J.M. GUILLAMÓN. 2006. Realtime quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeast in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7148–7155.

HOYOS, R.; S. URIBE and I. VELÉZ. 2012. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”. *Revista Colombiana de Entomología* 38: 134-140.

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.

JARA, C. 2009. 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.

KAWAHATA, M.; T. FUJII and H. IEFUJII. 2007. Interspecies diversity of the industrial yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* based on analysis the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions and D1/D2 region of 26S rDNA. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry* 5: 1616-1620.

LARKIN, M.; G. BLACKSHIELDS, N. BROWN, R. CHENNA, P. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. THOMPSON, T. GIBSON and D. HIGGINS. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948

LITI, G. and E. J. LOUIS. 2005. Yeast Evolution and Comparative Genomics. *The Annual Review of Microbiology* 59: 135 – 153.

MANZANAREZ, P.; S. VALLÉZ and F. VIANA. 2011. Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. *Molecular Wine Microbiology* 26: 85-105.

MARINANGELI, P.; D. ANGELOZZI, M. CIANI, F.CLEMENTI. and I. MANNAZZU. 2004. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Research* 4: 427- 435.

MATEO, J.; L. PERIS, C. IBAÑEZ and S. MAICAS. 2011. Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 8: 347-354.

MATURANO, Y.; L. RODRÍGUEZ, M. TORO, M. NALY, M. VALEJO, L. CASTELLANOS, M. COMBINA, and F. VAZQUEZ. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 8: 43-50.

MENDES, F.; M.C. CLIMACO AND F. MENDES. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology* 91: 67-71.

MORENO-ARRIBAS, M. and M. POLO. 2009. Wine Chemistry and Biochemistry. Primera edición. Editorial Springer Science+Business Media, LLC. Nueva York, USA. 735 p.

ORLIC, S.; T. VOJVODA, K. BABIC, F. ARROLLO-LOPEZ; A. JEROMEL, B. KOZINA, L. IACUMIN and G. COMI. 2010. Diversity and oenological characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* associated with Zilavka grapes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 1483 – 1489.

ORTIZ, M.; N. BARRAJÓN, M. BAFFI, M. ARÉVALO-VILLENA and A. BRIONES. 2013. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. LWT - Food Science and Technology 50: 371 – 377.

QUEROL, A.; E. BARRIO, T. HUERTA and D. RAMÓN. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Applied and Environmental Microbiology 58, 2948–2953.

QUEROL, A.; M. FERNANDEZ-ESPINAR, M. OLMO, E. BARRIO. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. Food Microbiology 8: 3 -10.

RASPOR, P.; J. ZUPAN and N. ADEZ. 2007. Validation of yeast identification by “*in silico*” RFLP. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 15: 267-281.

RENAULT, P.; C. MIOT-SERTIER, P. MARULLO, P. HERNÁNDEZ-ORTE, L. LAGARRIGUE, A. LONVAUD-FUNEL and M. BELY. 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology 10: 201-210.

RIBERAU-GAYON, P.; D. DUBOURDIEU, B. DONECHE and A. LONVAUD. 2006. Handbook of Enology. Volumen 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. Segunda edición. Editorial John Wiley & Sons, Ltd. Bordeaux, Francia. 497 p.

RODRÍGUEZ, M. 2007. Análisis Genómico y Molecular de Levaduras Vínicas. Aplicación a la Mejora del Proceso de Fermentación de Vinos mediante Selección de Levaduras Autóctonas. Departamento de bioquímica y biología molecular, microbiología, medicina preventiva y salud pública, fisiología y genética, Laboratorio de Microbiología enológica, Universidad de Cádiz. 291 p.

SEGURA, L.; M. KIRCHMAYR, E. FLORES and A. GSCHAEDLER. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Genois* Universidad de Guadalajara, México 12: 2-13

SWIEGERS, J.; J. BARTOWSKY, P. HENSCHKE and S. PRETORIUS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 36: 139-173.

WILSOR, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3741-3751.

ZOTT, K.; O. CLAISSE, P. LUCAS, J. COULON, A. LONVAUD-FUNEL, I. MASNEUF-POMAREDE. 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 9: 559-567.