

## DIVERSIDAD INTRAESPECIFICA DE *Saccharomyces cerevisiae* EN FERMENTACIONES VINICAS ESPONTANEAS A ESCALA INDUSTRIAL Y DE LABORATORIO

Christian Lopes, María van Broock, Amparo Querol y Adriana Caballero. Lab. de Microbiología y Biotecnología- Facultad de Ingeniería- Universidad Nacional del Comahue. cc. 790, 8300 Neuquén, Argentina. e-mail: clopes@uncoma.edu.ar.

*Palabras clave:* *Saccharomyces*, fermentaciones vínicas

**Introducción.** La calidad final del vino es consecuencia directa del desarrollo secuencial y de la actividad metabólica de varias especies de levaduras durante la fermentación. De todas estas, *Saccharomyces cerevisiae* es la más relevante debido a su tolerancia al etanol. La aplicación de técnicas moleculares al estudio de la ecología del proceso de vinificación ha revelado aun una mayor complejidad debido a que cada una de estas especies, principalmente *S. cerevisiae*, puede estar a su vez representada por muchas cepas, y el sucesivo reemplazo y muerte de las mismas durante el proceso caracterizan el perfil ecológico y por lo tanto las cualidades del vino obtenido. Numerosos factores intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento como composición del mosto, sulfitado, volumen de la fermentación, etc. afectan la dinámica de estas poblaciones y por lo tanto inciden en el producto final.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad intraespecífica de dos poblaciones indígenas de *S. cerevisiae* provenientes de un mismo mosto tipo Malbeck fermentado a escala Industrial y de laboratorio.

**Metodología** Uvas tipo Malbeck procedentes de un mismo viñedo de la región del Comahue, Patagonia Argentina, fueron trituradas y sulfitadas en bodega y fermentadas naturalmente a escala industrial (tanques de 10000 L) y de laboratorio (fermentadores de 5L) a 25°C. Muestras de mostos procedentes del inicio de fermentación (10°Bme), mitad (6°Bme) y final (<1°Bme) adecuadamente diluidas se sembraron en placas de YEPD, L-lisina y etanol-metabisulfito. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 2 a 6 días y 15 colonias de cada estadio de fermentación fueron aisladas e identificadas en base a los métodos y claves propuestas por (1). La identidad de los aislamientos caracterizados como *S. cerevisiae* fue corroborada mediante análisis de RFLPs de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 amplificada por PCR (2). La diferenciación a nivel de cepas se realizó mediante el análisis de mtRFLPs con (3) y corroborada por PCR de segmentos de DNA entre secuencias delta (4) y análisis de cariotipos.

**Resultados y discusión.** Sobre 90 aislamientos estudiados 59 fueron identificados como *S. cerevisiae*.

El análisis de estos aislamientos por mtRFLP (Fig 1) y polimorfismo de segmentos entre secuencias  $\delta$  evidenció la presencia de 30 patrones diferentes corroborados por análisis de sus cariotipos.

Estos resultados revelan una gran diversidad de cepas indígenas de *S. cerevisiae*, no obstante la mayoría sólo estuvo representada por un solo aislamiento y solamente unos pocos patrones estuvieron presentes con una frecuencia mayor (Tabla 1).

Entre estos últimos el perfil más relevante a escala industrial (III) fue también el más frecuente a nivel de laboratorio (Tabla 1). Adicionalmente otros tres patrones fueron comunes a ambas fermentaciones (Tabla 1).

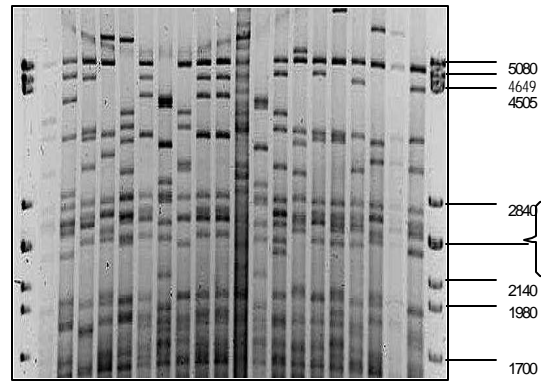


Fig. 1. Patrones de restricción del DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* indígenas (calles 2 a 21). Calles 1 y 22: marcador  $\lambda$  HindIII

Tabla 1. Patrones mayoritarios en ambos tipos de vinificaciones.

NRO. PATRON	NUMERO DE AISLAMIENTOS (%)					
	MOSTO INDUSTRIAL			MOSTO LABORATORIO		
	10° Bme.	6° Bme.	1° Bme.	10° Bme.	6° Bme.	1° Bme.
I	0 (0)	0 (0)	3 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
II	2 (17)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)
III	3 (25)	1 (7)	3 (23)	1 (50)	2 (50)	3 (23)
IV	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	2 (15)
V	0 (0)	2 (14)	1 (8)	0 (0)	1 (25)	1 (8)
VI	1 (8)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VII	1 (8)	1 (7)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VIII	0 (0)	3 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IX	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)
<b>TOTAL 1<sup>1</sup></b>	<b>8 (67)</b>	<b>8 (57)</b>	<b>9 (69)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>3 (75)</b>	<b>8 (62)</b>
<b>TOTAL 2<sup>2</sup></b>	<b>12 (100)</b>	<b>14 (100)</b>	<b>13 (100)</b>	<b>2 (100)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>13 (100)</b>

<sup>1</sup>- Total de aislamientos de aislamientos con perfiles mayoritarios.

<sup>2</sup>- Total de aislamientos analizados.

**Conclusiones.** En las condiciones ensayadas existe una gran diversidad en el cepaje indígena de *S. cerevisiae*

El cambio en el volumen de fermentación no afecta la heterogeneidad de la biota asociada al proceso.

La biota comprometida en conducir la fermentación alcohólica a escala de laboratorio es representativa de la encontrada a escala industrial.

### Bibliografía

- Kurtzman C.P. and J.W. Fell. (1998) The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier, USA.
- Fernández- Espinar M., Esteve- Zarzoso B., Querol A. and Barrio E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78:87-97.
- Querol A., Barrio E. and Ramón D. (1992) A comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *System Appl Microbiol*. 15: 439-446.
- Ness F., Lavallée F., Dubourdiou D., Aigle M. and Dalau L. (1993) Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain Reaction. *J Sci Food Agric*. 62:89-94.