

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS NATIVAS

Las levaduras presentes en los viñedos forman parte integral del ecosistema del mismo, constituyendo una microbiota específica del lugar (Combina y col., 2005). Estas levaduras pueden haber llegado a través del viento, insectos, agua, o mediante la aplicación de orujos y escobajos que utilizamos para enriquecer los suelos con materia orgánica. Su origen es diverso, pero en conjunto representan tanto el entorno como las prácticas de manejo del viñedo.

Estos microorganismos se adhieren a la pruina, la capa cerosa que recubre las uvas, y, durante el proceso de molienda, pasan al mosto, donde inician la fermentación.

Trabajo de investigación

Para conocer en profundidad el ecosistema en donde se desarrollan nuestros viñedos es fundamental conocer las diferentes especies de levaduras que viven en este.

El trabajo que estamos llevando a cabo se divide en dos etapas, primero la identificación de la población de levaduras presentes en nuestros mostos y vinos y la segunda etapa se centra en la identificación de las levaduras asociadas a las uvas de nuestros viñedos

Junto los Doctores María Eugenia Rodríguez y Christian Lopes y equipo del Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, **PROBIEN** (Universidad Nacional del Comahue-CONICET) es que comenzamos el aislamiento e identificación de las levaduras que conviven en los viñedos de Otronia y que forman parte del proceso de fermentación.

Dado que Chardonnay y Pinot Noir son las dos variedades predominantes en nuestro viñedo Otronia y porque cada una se elabora mediante métodos diferentes, las hemos seleccionado para llevar a cabo esta primera etapa de identificación.

PRIMERA ETAPA

METODOLOGIA

Identificación y caracterización de levaduras *Saccharomyces*

Fermentación de mosto de uva Chardonnay

Se realizaron dos fermentaciones a escala de 1 L a temperatura controlada y se siguió la evolución de la fermentación mediante medición de grados Brix y por cuantificación de azúcares reductores totales (ART) por el método DNS.

Una vez finalizada la fermentación, una alícuota de cada fermentador fue diseminada en placas de GPY agar y luego de 48-72 h de incubación se procedió al aislamiento de 40 colonias de levaduras (20 de cada fermentador). La identificación de los aislados se realizó, previa extracción de ADN total, mediante amplificación de la región ITS-5.8S del ADN (Kurtzman et al., 2011). Adicionalmente, complementaron esta identificación la observación macroscópica y microscópica de colonias y células y así como la capacidad de esporular en agar-AcK y crecimiento a 37°C.

La caracterización a nivel de cepa de los 40 aislados se realizó mediante el método de análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial

(mtDNA-RFLP) obtenidos a partir de la digestión realizada con la endonucleasa Hinf I (Lopez et al. 2001).

Vino Pinot Noir

A partir del mosto fermentado en bodega Otronia se realizaron diluciones seriadas y una alícuota fue diseminada en placas de GPY agar y luego de 48-72 h de incubación se procedió al aislamiento de 20 colonias de levaduras. La identificación y caracterización de los aislados a nivel de especie y cepa se realizó siguiendo la metodología descrita previamente. La identificación de los aislados se realizó, previa extracción de ADN total, mediante amplificación de la región ITS-5.8S del ADN (Kurtzman et al., 2011). Adicionalmente, complementaron esta identificación la observación macroscópica y microscópica de colonias y células y así como la capacidad de esporular en agar-AcK y crecimiento a 37°C. La caracterización a nivel de cepa de los 40 aislados se realizó mediante el método de análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP) obtenidos a partir de la digestión realizada con la endonucleasa Hinf I (Lopez et al. 2001)

RESULTADOS

Las 60 levaduras aisladas del final de fermentación del mosto Chardonnay (40 colonias) y del mosto fermentado de Pinot noir (20 colonias) correspondieron a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Todos los aislados evidenciaron un tamaño del amplificado de la región ITS-5.8S del ADN de 850 pb, fueron capaces de esporular en medio AcK y crecer a 37°C, características correspondientes a la especie mencionada. Respecto de la caracterización de las levaduras a nivel de cepa, los resultados obtenidos a partir de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP) se resumen en la tabla 1 y en la Figura 1

Perfiles mitocondriales (cepas)

Vino	Número y porcentaje de aislados por perfil de mtDNA-RFLP									Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
Pinot noir	14 (70%)	1 (5%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	-	-	-	-	20 (100%)
Chardonnay (1)	-	3 (15%)	8 (40%)	-	-	2 (10%)	6 (30%)	1 (5%)	-	20 (100%)
Chardonnay (2)	-	2 (10%)	13 (65%)	-	-	-	4 (20%)	-	1 (5%)	20 (100%)

Tabla 1.

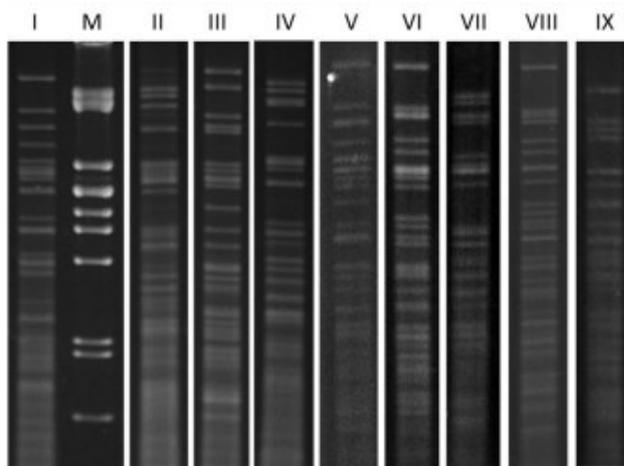


Figura 1: Imágenes individuales de cada uno de los perfiles moleculares obtenidos (I al IX). M: corresponde al marcador de peso molecular.

Las levaduras aisladas del mosto fermentado de Pinot Noir se correspondieron a 5 perfiles moleculares diferentes (5 cepas)- I, II, III, IV y V, observándose el perfil "I" en el 70% de los aislados. El perfil III estuvo asociado a 3 aislados mientras que los perfiles II, IV y V solo estuvieron representados por un aislado. Las 40 levaduras aisladas del mosto blanco Chardonnay de fin de fermentación presentaron 6 perfiles moleculares diferentes- II, III, VI, VII, VIII y IX. El perfil mayoritario fue el "III" observándose en 21 aislados analizados. El perfil molecular VII fue el segundo con mayor presencia (10 aislados), seguido por el perfil II (5 aislados). Los restantes perfiles estuvieron representados por 1 o 2 aislados.