

## Estrategias de obtención de híbridos de levaduras para vinificaciones a bajas temperaturas

Andrea Cecilia Origone<sup>1</sup>, María Eugenia Rodríguez<sup>1,2</sup>, Juan Estéban Gómez<sup>1</sup> y Christian Ariel Lopes<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías alternativas (PROBIEN) (CONICET-UNCo), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400 (8300) Neuquén, Argentina

<sup>2</sup> Fac. Ciencias Médicas, UNCo, Argentina

<sup>3</sup> Fac. Ciencias Agrarias, UNCo, Argentina

**Resumen.** Aunque *S. cerevisiae* (*S.c.*) es la especie históricamente asociada a la vinificación, *S. uvarum* (*S.u.*) e híbridos naturales entre estas especies también han sido descritos en vinos fermentados a bajas temperaturas. *S. uvarum* presenta perfiles de fermentación diferenciales, caracterizados por elevadas concentraciones de glicerol y 2-fenietanol sin aumento del contenido de ácido acético. Los objetivos del presente trabajo fue generar híbridos interespecíficos entre *Sc* y dos cepas de *Su* de diferente origen y evaluar el efecto de diferentes temperaturas de estabilización en las características cinéticas y fisicoquímicas de los híbridos estables obtenidos. Los resultados evidencian que se obtienen híbridos con características similares independientemente del parental utilizado aunque dependientemente de la temperatura de estabilización empleada.

### 1. Introducción

La vinificación es un proceso complejo llevado a cabo principalmente por levaduras y particularmente por cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, reconocida por sus excelentes características fermentativas. No obstante, otras especies del género como *Saccharomyces uvarum* también pueden participar de este proceso, especialmente cuando el mismo es llevado a cabo a bajas temperaturas [1]. El resto de las especies del género *Saccharomyces* no juegan roles importantes en las fermentaciones, aunque sí se han aislado cepas híbridas entre diferentes especies del género [2].

*Saccharomyces uvarum* es una levadura criotolerante y se caracteriza por presentar perfiles de fermentación con mayor velocidad de consumo de fructosa, menor producción de acidez volátil y mayor producción de glicerol, ácido succínico y alcoholes superiores que *S. cerevisiae*, lo que la convierte en una especie biotecnológicamente interesante para la industria vinícola [1,3]. Sin embargo, mostos con elevadas concentraciones de azúcares suelen ser un sustrato difícil de fermentar para esta especie, por lo que su uso puede ser limitado.

Trabajos recientes realizados por el Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras del PROBIEN (CONICET-UNComahue), han logrado aislar cepas de *S. uvarum* a partir de fermentaciones tradicionales (chichas) realizadas con manzanas silvestres a bajas temperaturas (menos de 20 °C) [4] y de ambientes naturales como corteza y semillas de *Araucaria araucana* (sustrato con el que se elabora otra bebida tradicional del pueblo Mapuche denominada *Mudai*) en diferentes regiones de la cordillera norpatagónica. Ensayos preliminares evidenciaron

importantes diferencias genéticas y fisiológicas entre dichos aislados obtenidos de ambientes naturales y fermentaciones tradicionales, lo cual hace evidente que en la región existe una diversidad importante de estos microorganismos capaces de ser utilizados en procesos productivos industriales.

Por otra parte, durante los últimos años los gobiernos provinciales (provincias de Río Negro y Neuquén) y el gobierno nacional han promovido fuertemente el desarrollo de la industria vitivinícola regional, mediante un plan estratégico nacional. En este marco, se han realizado grandes inversiones en tecnología por parte de las principales bodegas para un mejor manejo y control de las fermentaciones, como la tecnología en frío. Las fermentaciones en frío presentan grandes ventajas desde el punto de vista enológico debido a que permiten una mayor retención de compuesto relacionados con el *flavor* (aroma y sabor) logrando vinos con perfiles aromáticos característicos y mejorados [5]. No obstante, no son muchos los cultivos de levaduras disponibles en el mercado capaces de llevar a cabo fermentaciones exitosas a bajas temperaturas, y por lo tanto los productos que se obtienen son en general similares en lo que respecta a las características que aportan las levaduras a estas bebidas. La búsqueda y selección de nuevas cepas de levaduras, adaptadas a estas condiciones ha cobrado entonces gran importancia. Si las cepas son desarrolladas regionalmente, además, otorgan una tipicidad particular a los productos, con el consecuente valor agregado en los mismos.

Es bien conocido que las levaduras han sufrido diversos procesos de selección y adaptación a las condiciones de fermentación, proceso conocido como “domesticación” [6–8]. Diversos mecanismos moleculares son utilizados para la obtención de dichas ventajas

adaptativas, entre los que se encuentra la hibridación como uno de los más interesantes ya que proporciona a los híbridos generados nuevas combinaciones genéticas de potenciales ventajas adaptativas con respecto a las especies parentales [9,10]. El hombre ha aprovechado esta capacidad natural que presentan las levaduras para generar híbridos de manera artificial, logrando combinaciones genéticas únicas [11].

El objetivo del presente trabajo fue generar híbridos interespecíficos entre una cepa vínica seleccionada de *S. cerevisiae* y dos cepas de *S. uvarum* de diferente origen: *S.u.*<sup>a</sup> aislada de *Araucaria araucana* y *S.u.*<sup>ch</sup> aislada de chicha. De esta manera se evaluó por un lado el efecto del parental no-*cerevisiae*, y por otro lado la temperatura de estabilización genética (13 °C y 20 °C) de los mismos en las características fisiológicas de interés enológico de los híbridos obtenidos en fermentaciones en mosto de uva Sauvignon blanc.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Levaduras

Se utilizaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) vínica seleccionada por su capacidad fermentativa y dos cepas de *Saccharomyces uvarum* aisladas en la región Patagónica y de orígenes diferentes: *Araucaria araucana* (*S.u.*<sup>a</sup>) y chicha de manzanas silvestres (*S.u.*<sup>ch</sup>). Las cepas de *S. uvarum* fueron seleccionadas entre una población de cepas de cada uno de los orígenes mencionados, por presentar la mejor combinación de características relevantes para enología como son la capacidad *killer*, producción de glucosidasas, elevada producción de glicerol y baja producción de etanol y acidez volátil [12].

### 2.2. Obtención de una cepa auxótrofa natural de *S. cerevisiae*

Para la selección de la cepa auxótrofa natural de *S.c.* las células fueron crecidas en 15 ml de medio GPY (% p/v: 0,5 extracto de levadura, 0,5 peptona, 2 glucosa) durante 5 días a 26 °C. Se tomaron alícuotas del cultivo y se sembraron en placas de Medio Mínimo (MM) adicionadas con ácido  $\alpha$ -aminoadípico ( $\alpha$ -AA). Este medio permite seleccionar colonias mutantes espontáneas *lys*<sup>-</sup> [13]. Un ml de cada cultivo fue sembrado nuevamente en 15 ml de medio GPY líquido e incubado en las mismas condiciones para obtener una nueva tanda de posibles mutantes. Este proceso fue repetido 5 veces. Aquellas colonias capaces de crecer en placas de medio  $\alpha$ -AA fueron repicadas individualmente en nuevas placas. Con el objetivo de confirmar la presencia de las colonias auxótrofas, las mismas fueron incubadas en 1 ml de agua destilada estéril durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente repicadas en medio GPY-agar, medio mínimo (MM % p/v: 0,17 de YNB sin aminoácidos, 2 glucosa y 2 agar) y MM suplementado con lisina (0,03 mg/L). Las placas fueron incubadas durante 5 días a 26 °C. Sólo aquellas colonias capaces de desarrollar en MM suplementado con lisina y en GPY fueron consideradas mutantes. No así aquellas que también crecieron en MM sin lisina.

### 2.3. Generación de híbridos

Las cepas híbridas se obtuvieron por medio de la metodología de *rare-mating*, considerada no generadora de organismos genéticamente modificados y descrita por Pérez-Través *et al.* [11]. Todas las cepas, incluyendo la mutante natural de *S.c.*, fueron crecidas en forma separada en 25 ml de GPY durante 48 hs a temperatura ambiente. Las células se recuperaron por centrifugación (5000  $\times$  g por 5 min a temperatura ambiente) y se resuspendieron en el sobrenadante residual. Los cultivos de levaduras a ser hibridados (*S.c.*  $\times$  *S.u.*<sup>A</sup> y *S.c.*  $\times$  *S.u.*<sup>ch</sup>) se colocaron de a pares en un mismo tubo y alícuotas de las mezclas se inocularon en 2 mL de medio GPY. Luego de 5–10 días de incubación estática en posición inclinada a 26 °C, las células fueron recuperadas mediante centrifugación, lavadas en agua estéril, resuspendidas en 1 mL de agua estéril nuevamente e incubadas durante 2 h. Se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión, se sembró en placas de MM y se incubaron a 37 °C. Sólo las células híbridas (y algunas que revirtieron su condición auxótrofa) fueron capaces de desarrollar colonias bajo estas condiciones selectivas de crecimiento. Dichas colonias protótrofas aparecieron luego de 3–5 días y fueron aisladas y confirmadas mediante nuevo repique en placas con el mismo medio.

### 2.4. Análisis molecular

La obtención de DNA genómico total se realizó de acuerdo a Querol *et al.* [14].

#### 2.4.1. Análisis por PCR-RFLP

La confirmación final de los híbridos de *Saccharomyces* obtenidos por cruzamiento interespecífico se llevó a cabo por amplificación por PCR de los genes nucleares *CBT1* y *GSY1* y digestión con las endonucleasas *Hae* III y *EcoR* I (Fermentas) respectivamente, utilizando los cebadores y la metodología propuestos por González *et al.* [2].

#### 2.4.2. Análisis por RAPD-PCR

El análisis de RAPD-PCR se realizó mediante comparación de los patrones moleculares obtenidos por amplificación por PCR utilizando los cebadores p24 y p28, metodología propuesta por Fernández-Espinar *et al.* [15] y Corte *et al.* [16].

#### 2.4.3. Análisis por mtDNA-RFLP

El análisis de restricción de DNA mitocondrial se realizó según el método de Querol *et al.* [14] usando la endonucleasa *Hinf* I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

### 2.5. Estabilización genética

Un híbrido confirmado de cada cruzamiento se inoculó individualmente en dos tubos con 10 mL de mosto de uva Sauvignon blanc esterilizado e autoclave (120 °C, 20 min). Una vez inoculados, un tubo se incubó a 13 °C y el otro a 20 °C. Finalizadas las fermentaciones (20–25 días dependiendo de la temperatura de incubación)

una alícuota (100  $\mu$ L) conteniendo las células en proceso de estabilización fue utilizada para inocular un nuevo tubo conteniendo el mismo medio estéril e incubado en las mismas condiciones. Luego de cinco fermentaciones sucesivas se tomó una alícuota de la quinta fermentación que se inoculó en placas conteniendo medio GPY-agar. Las placas se incubaron a 13 °C o 20 °C y una vez desarrolladas las colonias, se tomaron diez colonias al azar y se caracterizaron mediante RAPD-PCR (utilizando los cebadores p24 y p28) y mtDNA-RFLP. Aquellas colonias con patrones moleculares diferentes fueron inoculadas, esta vez de manera individual, en nuevo mosto. Finalmente se compararon molecularmente las colonias obtenidas antes y después de esta última fermentación y aquellas que mantuvieron estables sus marcadores moleculares se consideraron estables y se seleccionaron para evaluar sus características de interés enológico en micro-fermentaciones.

### 2.5.1. Micro-fermentaciones

Las colonias estables se inocularon en micro-fermentaciones individuales de 35 mL en mosto Sauvignon blanc a 13 °C o 20 °C dependiendo de su origen. Los procesos de fermentación se siguieron por pérdida de peso y las cinéticas de liberación de CO<sub>2</sub> obtenidas se modelaron con el modelo de Gompertz modificado según Arroyo-Lopez *et al.* [17]. A partir del modelado se obtuvieron los parámetros de velocidad máxima de fermentación ( $\mu_{\text{máx}}$ ), duración de la fase de latencia antes de comenzar la fermentación tumultuosa ( $\lambda$ ) y producción máxima de CO<sub>2</sub> (A). Una vez finalizadas las fermentaciones se analizaron los parámetros fisicoquímicos más relevantes de los vinos obtenidos.

### 2.6. Análisis físico-químico

La determinación de glicerol se hará mediante Kit enzimático (Roche). Los demás parámetros se determinarán con el analizador de vino OenoFoss, una unidad de análisis con tecnología de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).

### 2.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por ANOVA y Test de Tukey, para determinar diferencias significativas en los parámetros cinéticos y fisicoquímicos. Asimismo se realizará un análisis multivariado (Análisis de Componentes Principales, ACP) para evaluar las relaciones entre las cepas en estudio y detectar las principales variables que caracterizan su actividad fermentativa [18]. Para ambos estudios se utilizó el programa Statistica.

## 3. Resultados

### 3.1. Obtención de levaduras híbridas

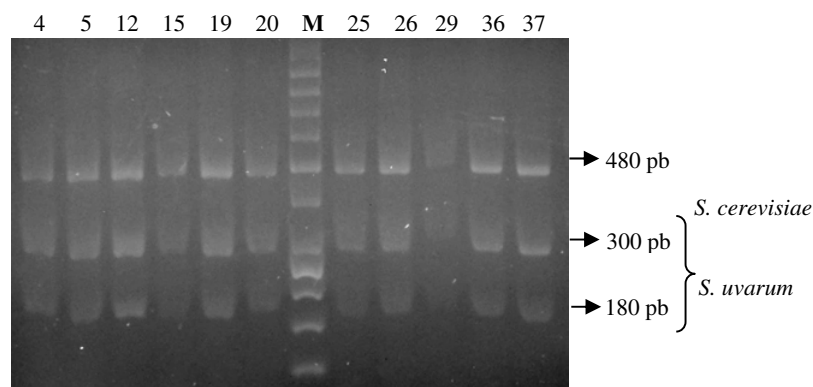
Para la generación y confirmación de híbridos se aprovecharon diferencias fisiológicas y moleculares existentes entre las cepas parentales que permitieron una fácil selección. Se utilizaron placas de GPY-Agar con ácido  $\alpha$ -aminoadípico ( $\alpha$ -AA) con el objetivo de seleccionar

mutantes auxotróficos naturales *lys*<sup>-</sup> del parental *S. cerevisiae*. Un gran número de colonias tuvo la capacidad de crecer en estas placas pero sólo algunas de ellas fueron confirmadas en MM y MM suplementado con el aminoácido lisina. Una de las colonias confirmada por su incapacidad de crecer sin la adición de lisina al medio de cultivo fue seleccionada como parental para la obtención de híbridos.

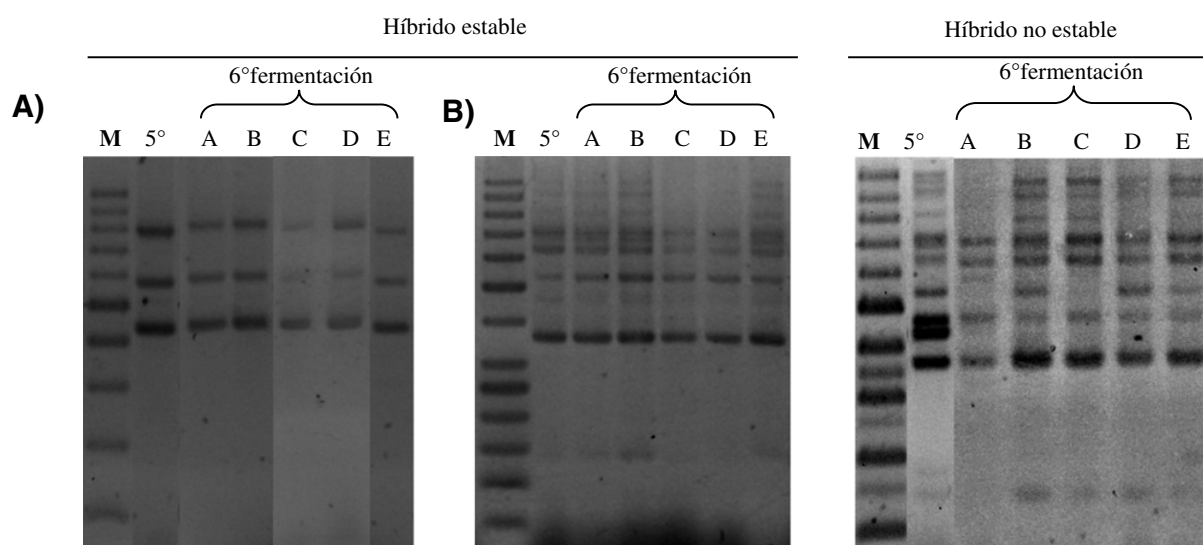
La generación de híbridos interespecíficos entre la cepa auxotrófica de *S. cerevisiae* y las dos cepas de orígenes diferentes de *S. uvarum* fue exitosamente realizada por el método de *rare-mating* obteniéndose once colonias correspondientes a posibles híbridos de *S.c.xS.u.*<sup>a</sup> y dos colonias de *S.c. x S.u.*<sup>ch</sup>. El análisis por PCR-RFLP de los genes *CBT1* y *GSY1* permitió confirmar la naturaleza híbrida de todas las colonias analizadas, que presentaron tanto alelos de *S. cerevisiae* como de *S. uvarum* (Fig. 1). Las colonias se conservaron inmediatamente a -80 °C para evitar posibles cambios genéticos antes de su estabilización adaptativa en condiciones de fermentación.

Una vez confirmada la presencia de colonias híbridas se seleccionó una al azar de cada cruzamiento (*S.c. x S.u.*<sup>ch</sup> y *S.c. x S.u.*<sup>a</sup>) y se procedió a realizar su estabilización genética en condiciones de fermentación a dos temperaturas diferentes: 13 °C y 20 °C con el objetivo de comparar posibles diferencias en las características fisiológicas de las cepas estables debidas a una presión selectiva diferencial. El proceso de estabilización se realizó mediante cinco fermentaciones sucesivas tal lo descrito en la sección de Materiales y Métodos; de la última fermentación se tomaron diez colonias al azar (a ambas temperaturas) que se analizaron por PCR-RAPD y mtDNA-RFLP. Se obtuvieron diferentes perfiles de RAPD-PCR (con dos cebadores diferentes) entre las colonias analizadas y solo un tipo de mtDNA correspondiente al perfil mostrado por *S. uvarum*. Se combinaron los patrones moleculares obtenidos con los diferentes cebadores y técnicas y coincidentemente se observó la presencia de cuatro patrones combinados diferentes entre las colonias derivadas del híbrido original del cruce *S.c. x S.u.*<sup>a</sup> y cinco del híbrido original del cruce *S.c. x S.u.*<sup>ch</sup> a ambas temperaturas (datos no mostrados). La estabilidad genética de todas las colonias híbridas con perfiles diferentes se confirmó mediante nuevas fermentaciones realizadas con cada colonia derivada (5° fermentación) de manera individual (6° fermentación) y comparación de los mismos marcadores moleculares. Un ejemplo de híbrido estable y uno de híbrido inestable evidenciado por los perfiles de RAPD-PCR se puede apreciar en la Fig. 2. Se confirmó entonces la presencia de patrones moleculares conservados tanto a 13 °C como a 20 °C que evidencian la estabilidad genética de los híbridos.

Por otro lado, durante todo el proceso de estabilización genética mediado por fermentaciones sucesivas, se llevó a cabo el análisis de los parámetros cinéticos característicos de las cinco fermentaciones, utilizando los datos de pérdida de peso de los sistemas debida a la liberación de CO<sub>2</sub>. Este análisis arrojó diferencias significativas entre los procesos realizados a ambas temperaturas pero no así entre los diferentes cruces. Los tiempos totales requeridos para finalizar las fermentaciones fueron



**Figura 1.** Confirmación de colonias híbridas por análisis de PCR-RFLP del gen CBT1 digerido con la endonucleasa *Hae* III. Calles 4, 5, 12, 15, 19, 20, 25, 26, 29, 36, 37 corresponden a colonias tomadas al azar resultantes del cruzamiento de *S.c.* (*lys*<sup>-</sup>) x *S.u.*<sup>ch</sup>. El cruzamiento *S.c.* (*lys*<sup>-</sup>) x *S.u.*<sup>a</sup> no se muestra ya que el patrón de bandas de sus parentales es el mismo. M: marcador de peso molecular (50 pb).



**Figura 2.** Confirmación de estabilidad genética por análisis de PCR-RAPD. Se muestran los patrones moleculares de los híbridos H-9 (híbrido estable obtenido del cruce *S.c.*x*S.u.*<sup>ch</sup>, fermentación a 13 °C) con el cebador p24 (A) y con el cebador p28 (B) y H-10 (híbrido no estable obtenido del cruce *S.c.*x*S.u.*<sup>ch</sup>) con el cebador p28 (C), a modo de ejemplo. 5°f : 5° fermentación. A, B, C, D, E: colonias tomadas al azar de la 6° fermentación. M: marcador de peso molecular (100 y 50 pb).

diferentes, observándose mayores tiempos de duración a 13 °C que a 20 °C, en los mostos fermentados por ambos híbridos. A 13 °C, el tiempo total requerido fue aumentando desde la primera hasta la quinta fermentación desde valores de 405 h en ambos híbridos en la primera hasta 1400 h para el híbrido *S.c.*x*S.u.*<sup>a</sup> y 950 h en *S.c.*x*S.u.*<sup>ch</sup> en la última. Paralelamente, se observó una disminución en la duración del tiempo requerido para iniciar la fermentación tumultuosa ( $\lambda$ ) en las últimas fermentaciones (4°y5°) para los híbridos obtenidos de ambos cruces.

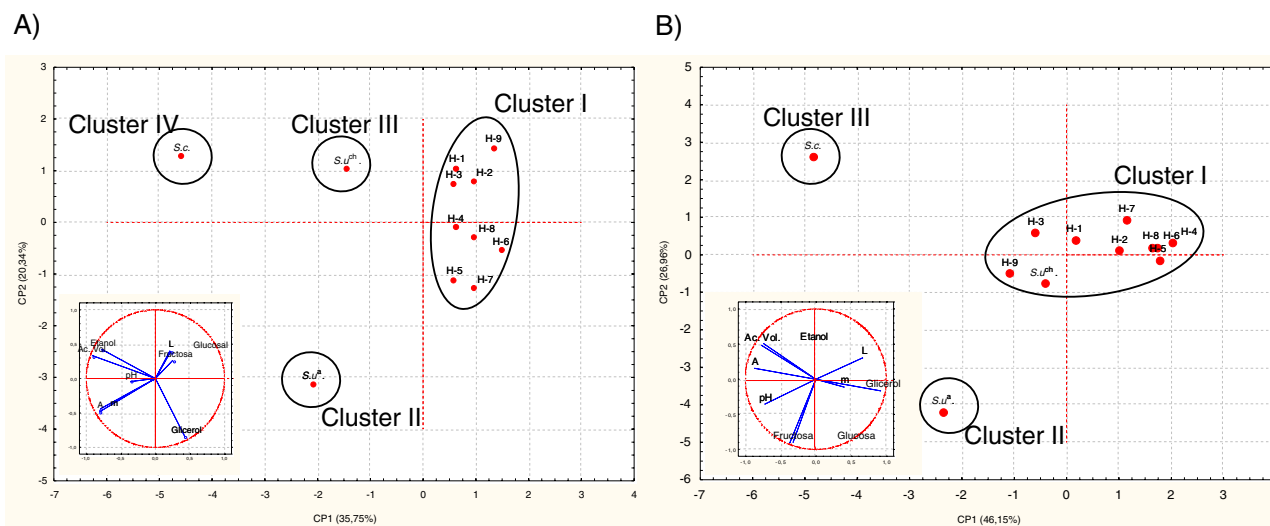
Es de destacar que la sumatoria de los tiempos de fermentación a 13 °C fue el doble que la necesaria para completar la estabilización a 20 °C (3800 h vs 1900 h para *S.c.* x *S.u.*<sup>a</sup> y de 3100 h vs 1900 h para *S.c.* x *S.u.*<sup>ch</sup>).

Finalmente con el objetivo de conocer las características físico-químicas de los mostos fermentados con las diferentes cepas estabilizadas a 13 °C y 20 °C, y la posible relación de entre estos parámetros, el origen del

parental *S. uvarum* y la temperatura de estabilización, se realizaron micro-fermentaciones con 35 mL de mosto *Sauvignon blanc* y se analizaron los siguientes compuestos de interés enológico: producción de etanol, glicerol, acidez volátil, pH y concentración de azúcares residuales (glucosa y fructosa), como también análisis de la cinética de crecimiento de cada cepa híbrida.

Los productos y los parámetros cinéticos de las fermentaciones realizadas con los híbridos estables y los parentales a ambas temperaturas se utilizaron para realizar un Análisis de Componentes Principales (ACP). Este análisis descriptivo permitió clasificar a las cepas en función del total de sus características. Si se analizan independientemente los gráficos de ACP obtenidos a cada temperatura se puede apreciar que, independientemente del origen del parental *S. uvarum* involucrado, los híbridos presentan características homogéneas, y en general intermedias a las que presentan sus parentales (Fig. 3). A 20 °C tanto los híbridos como el parental *S.u.*<sup>ch</sup>





**Figura 3.** Análisis de Componentes Principales (ACP) realizado con los parámetros cinéticos y fisicoquímicos de las fermentaciones llevadas a cabo con los híbridos obtenidos de los dos cruces analizados (H-1 a H-4, híbridos del cruce *S.c.xS.u.<sup>a</sup>*; y H-5 a H-9, híbridos del cruce *S.c. x S.u.<sup>ch</sup>*) y sus respectivos parentales a 13 °C (Panel A) y 20 °C (Panel B). Los valores en los ejes indican los porcentajes de la variabilidad total que explica cada Componente Principal (CP). En el margen inferior izquierdo de cada panel se observan las direcciones de cada uno de los vectores obtenidos.

de chicha se agruparon en el cluster I, intermedio entre los parentales *S.u.<sup>a</sup>* de *Araucaria* y *S.c.* (Fig. 3A).

A 13 °C, aun cuando los híbridos también mostraron un comportamiento intermedio entre los mismos parentales antes mencionados, también se separaron del parental *S.u.<sup>ch</sup>* (Fig. 3B). Al analizar en conjunto las distribuciones obtenidas en el ACP y los datos fisicoquímicos de los vinos, se pudo deducir que, independientemente de la temperatura evaluada, los híbridos se caracterizaron por producir: i) niveles de etanol significativamente inferiores al parental *S.c.* pero iguales o superiores a los parentales *S. uvarum*, ii) niveles de glicerol iguales o superiores a los parentales *S. uvarum* pero siempre superiores al parental *S.c.*, iii) consumo total de azúcares residuales, iv) niveles de acidez volátil (ácido acético) inferiores o iguales a los alcanzados con los parentales *S. uvarum* pero siempre inferiores a los obtenidos con *S.c.*

En cuanto a los parámetros cinéticos no se observaron grandes diferencias entre las fermentaciones realizadas con los híbridos y los parentales. Si se analizan únicamente los parentales, no existen diferencias significativas en los principales parámetros fisicoquímicos ni cinéticos en los vinos fermentados con un mismo parental a las dos temperaturas evaluadas (Tabla 1).

Contrariamente, los híbridos estabilizados y fermentados a 20 °C sí producen mayor concentración de glicerol (en promedio 5,36 g/L para *S.c.xS.u.<sup>a</sup>* y 5,65 g/L para *S.c.xS.u.<sup>ch</sup>*) y de etanol (en promedio 9,47% v/v para *S.c.xS.u.<sup>a</sup>* y 9,43% v/v para *S.c.xS.u.<sup>ch</sup>*) que los estabilizados y fermentados a 13 °C (en promedio 4,65 g/L glicerol para *S.c.xS.u.<sup>a</sup>* y 4,96 g/L para *S.c.xS.u.<sup>ch</sup>*; y 9,16% v/v para *S.c.xS.u.<sup>a</sup>* y 8,8% v/v para *S.c.xS.u.<sup>ch</sup>*). En consecuencia se observan mayores concentraciones de azúcares residuales a 13 °C que a 20 °C, aunque estas diferencias no son significativas. El tiempo medio requerido para finalizar las fermentaciones sí se vio afectado para todas las cepas evaluadas, tanto parentales

como híbridos, siendo de 473 h para las fermentaciones a 20 °C y de 558 h para las de 13 °C.

#### 4. Discusión

Debido a la ventaja que presentan los híbridos entre diferentes especies de *Saccharomyces* en procesos fermentativos como la elaboración de vinos, y en particular su capacidad de adaptarse a las condiciones cambiantes del medio [2, 19], se han propuesto diferentes métodos de obtención que permiten lograr artificialmente cepas con características particulares.

Un resumen de los métodos usualmente utilizados para la obtención de híbridos artificiales de levaduras se expone en los trabajos de Sipiczki [20] y Pérez-Través *et al.* [11].

La principal limitante de muchos de estos métodos radica en el hecho de que generan microorganismos que son considerados OGMs (organismos genéticamente modificados). El uso de OGMs en alimentos se encuentra estrictamente legislado en muchos países [21], además de existir un cierto grado de reticencia del público en general al consumo de estos alimentos [22]. En este marco, se ha demostrado que el proceso natural de *rare-mating* puede utilizarse para la generación de híbridos de manera relativamente sencilla no considerados OGMs [11]. En este trabajo se obtuvieron exitosamente híbridos genéticamente estables entre dos especies de *Saccharomyces*: una especie común a los dos cruces *S. cerevisiae* y dos cepas de *S. uvarum* de ambientes diferentes: una de ambientes naturales (aislada de *Araucaria araucana* por Rodríguez *et al.* [23]) y otra de fermentaciones tradicionales (chichas de manzana, Calderón Borra *et al.* [4]). El efecto del uso de diferentes cepas de *S. uvarum* parece no afectar significativamente los procesos de estabilización de los híbridos ni tampoco las propiedades de interés enológico de los híbridos estables obtenidos en este

Tabla 1. Parámetros cinéticos y fisicoquímicos de los vinos fermentados con las cepas parentales a ambas temperaturas.

| Parental y Temperatura   | Parámetros cinéticos       |                             |                              |                            | Parámetros fisicoquímicos  |                             |                                 |                          |                          |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                          | A <sup>1</sup>             | $\mu^2$                     | $\lambda^3$                  | Etanol (% v/v)             | Glucosa (g/L)              | Fructosa (g/L)              | Ac. volátil (g/L <sup>4</sup> ) | pH                       | Glicerol (g/L)           |
| S.c. 13 °C               | 2,867 ± 0,169 <sup>a</sup> | 0,017 ± 0,001 <sup>ab</sup> | 64,495 ± 2,340 <sup>c</sup>  | 10,99 ± 0,30 <sup>ab</sup> | 0,005 ± 0,002 <sup>a</sup> | 0,014 ± 0,004 <sup>a</sup>  | 0,67 ± 0,06 <sup>a</sup>        | 3,29 ± 0,02 <sup>a</sup> | 4,04 ± 0,04 <sup>a</sup> |
| S.c. 20 °C               | 3,042 ± 0,218 <sup>a</sup> | 0,022 ± 0,002 <sup>ab</sup> | 22,112 ± 5,583 <sup>ab</sup> | 12,21 ± 1,21 <sup>b</sup>  | 0,008 ± 0,006 <sup>a</sup> | 0,029 ± 0,002 <sup>a</sup>  | 1,53 ± 0,05 <sup>b</sup>        | 3,35 ± 0,01 <sup>a</sup> | 3,89 ± 0,25 <sup>a</sup> |
| S.u. <sup>a</sup> 13 °C  | 2,964 ± 0,585 <sup>a</sup> | 0,022 ± 0,007 <sup>ab</sup> | 64,371 ± 1,602 <sup>c</sup>  | 9,09 ± 0,02 <sup>a</sup>   | 0,008 ± 0,006 <sup>a</sup> | 0,026 ± 0,000 <sup>a</sup>  | 0,30 ± 0,01 <sup>a</sup>        | 3,34 ± 0,00 <sup>a</sup> | 5,43 ± 0,10 <sup>a</sup> |
| S.u. <sup>a</sup> 20 °C  | 2,791 ± 0,234 <sup>a</sup> | 0,023 ± 0,001 <sup>ab</sup> | 12,814 ± 12,676 <sup>a</sup> | 9,56 ± 0,27 <sup>a</sup>   | 0,069 ± 0,013 <sup>b</sup> | 0,113 ± 0,039 <sup>b</sup>  | 0,27 ± 0,08 <sup>a</sup>        | 3,37 ± 0,11 <sup>a</sup> | 5,04 ± 0,71 <sup>a</sup> |
| S.u. <sup>ch</sup> 13 °C | 2,764 ± 0,069 <sup>a</sup> | 0,014 ± 0,001 <sup>a</sup>  | 104,806 ± 2,672 <sup>d</sup> | 9,00 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 0,009 ± 0,001 <sup>a</sup> | 0,046 ± 0,014 <sup>ab</sup> | 0,45 ± 0,03 <sup>a</sup>        | 3,37 ± 0,01 <sup>a</sup> | 4,35 ± 0,07 <sup>a</sup> |
| S.u. <sup>ch</sup> 20 °C | 2,806 ± 0,277 <sup>a</sup> | 0,028 ± 0,001 <sup>b</sup>  | 44,173 ± 9,314 <sup>bc</sup> | 9,42 ± 0,59 <sup>a</sup>   | 0,029 ± 0,017 <sup>a</sup> | 0,050 ± 0,014 <sup>ab</sup> | 0,48 ± 0,29 <sup>a</sup>        | 3,37 ± 0,01 <sup>a</sup> | 4,91 ± 0,57 <sup>a</sup> |

Letras diferentes en los superíndices e n una misma columna indican diferencias significativas.

1- Valor máximo alcanzado de CO<sub>2</sub> producido (g).

2- Velocidad máxima de producción de CO<sub>2</sub>.

3- Tiempo requerido para iniciar la fermentación tumultuosa (h).

4- Valores expresados como ácido acético.

trabajo, aun cuando las dos cepas parentales de *S. uvarum* sí presentaron características diferenciales cuando fueron evaluadas individualmente. Los híbridos obtenidos de los dos cruces y estabilizados a diferentes temperaturas de fermentación presentaron siempre características más afines a la cepa de *S.u.<sup>ch</sup>* que al resto. Esta cepa presenta en sí misma características intermedias a la cepa *S.u.<sup>a</sup>* de ambientes naturales y la cepa representante de la especie fermentativa por excelencia *S. cerevisiae*. Esta diferencia fisiológica que se observa entre las dos cepas de la misma especie podría indicar cierto grado de domesticación y consecuente adaptación a las fermentaciones en la especie *S. uvarum*. Estudios genéticos recientemente publicados de diferentes poblaciones de *S. uvarum* ya han puesto en evidencia este proceso de domesticación, ampliamente estudiado en *S. cerevisiae* [24] y en *S. uvarum* [25]. Nuestros resultados evidencian que los híbridos entre *S. uvarum* y *S. cerevisiae* presentan un comportamiento enológico más parecido a la cepa de chichas de *S. uvarum* (que podría considerarse parcialmente domesticada) que a la cepa natural de esta especie.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo, aun no publicados, evidencian importantes diferencias genéticas entre las poblaciones de *S. uvarum* de ambientes naturales y de chichas, aun cuando ambas poblaciones fueron aisladas de regiones cercanas de la norpatagonia.

En el presente trabajo se evidencia que se obtienen híbridos con características similares independientemente del parental utilizado aunque dependientemente de la temperatura de estabilización empleada; no obstante, el tiempo total requerido para realizar la estabilización de los mismos a 13 °C es el doble al requerido para el mismo proceso a 20 °C por lo que se recomienda analizar esta desventaja al momento de proceder al desarrollo de nuevos híbridos mediante este tipo de ensayos.

Este trabajo fue financiado mediante el subsidio PICT 2011-1738 a C.L. de la Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) de la República Argentina y el subsidio PIN 104-173 a C.L. de la Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

## Referencias

- [1] M Sipiczki. Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts (Ciani M, ed), pp. 53–69. Research Signpost, Kerala. (2002)
- [2] SS González, E Barrio, J Gafner, A Querol. FEMS Yeast Res. **6**, 1221–1234. (2006)
- [3] I Masneuf-Pomarede, M Bely, P Marullo, A Lonvaud-Funel, D Dubourdiou. Int. J. Food Microbiol **139**, 79–86 (2010)
- [4] M Calderon-Borra, N Fernandez, ME Rodriguez, MP Sangorrin, CA Lopes. Diversidad de levaduras asociadas a chichas de manzana silvestre de Sud America. *XIV Congreso Latinoamericano de Genética*. Vina del Mar, Chile. (2010)
- [5] MG Lambrecht, IS Pretorius S. Afr. J. Enol. Vitic. **21**, 75–97 (2000)
- [6] A Querol, MT Fernandez-Espinar, M del Olmo, E Barrio. Int. J. Food Microbiol. **86**, 3–10 (2003)

- [7] JC Fay, JA. Benavides. *Plos Genetics* **1**, 66–71 (2005)
- [8] E Barrio, SS Gonzalez, A Arias, C Belloch, A Querol. *The Yeast Handbook 2: Yeasts in Food and Beverages*. Capitulo 6. Springer Verlag (2006)
- [9] M de Barros Lopes, JR Bellon, NJ Shirly., PF Ganter. *FEMS Yeast Res.* **1**, 323–331 (2002)
- [10] D Greig, EJ Louis, RH Borts, M Travisano. *Science* **298**, 1773–1775 (2002)
- [11] L Pérez-Traves, CA Lopes, E Barrio, A Querol. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 102–111 (2012)
- [12] C Lopes. Empleo de especies no convencionales de *Saccharomyces* y de híbridos interespecíficos para la diferenciación de sidras y vinos regionales *Actas XIII Congreso Argentino de Microbiología* (2013)
- [13] KS Zaret, F Sherman. *J Bacteriol.* **162**, 579–583. (1985)
- [14] A Querol, E Barrio, T Huerta, D Ramón. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2948–2953 (1992)
- [15] MT Fernández-Espinar, E Barrio, A Querol. *Yeast* **20**, 1213–1226 (2003)
- [16] L Corte, M Lattanzi, P Buzzini, A Bolano, F Fatichenti, G Cardinali. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 609–617 (2005)
- [17] FN Arroyo-Lopez, Z Salvado, Z Tronchoni, JM Guillamon, E Barrio, A Querol. *Yeast* **27**, 1005–1015. (2010)
- [18] F Rohlf. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system [computer program]. Version 2.2. Exeter Soft-ware Setauket, N.Y. (2005)
- [19] C Belloch, S Orlic, E Barrio, A Querol. *International Journal of Food Microbiology* **122**, 188–195 (2008)
- [20] M Sipiczki. *FEMS Yeast Research* **8**, 996–1007. Sipiczki (2008)
- [21] E Cebollero, D González-Ramos, L Tabera, R González. *Biotechnology Letters* **29**, 191–200 (2007)
- [22] IS Pretorius, PB Hoj. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 83–108 (2005)
- [23] ME Rodríguez, L Perez-Traves, M Sangorrin, E Barrio and Lopes C. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Research*  
DOI: 10.1111/1567-1364.12183 (2014)
- [24] G Liti, DM. Carter, AM. Moses, J Warringer, L Parts, SA James, RP Davey, IN Roberts, A Burt, V Koufopanou, IJ Tsai, CM Bergman, D Bensasson, MJ O’Kelly, A van Oudenaarden, DB Barton, E Bailes, AN Nguyen, M Jones, MA Quail, I Goodhead, S Sims, F Smith, A Blomberg, R Durbin, EJ Louis. *Nature* **458**, 337–341 (2009)
- [25] P Almeida, C Gonçalves, S Teixeira, D Libkind, M Bontrager, I Masneuf-Pomarède, W Albertin, P Durrens, DJ Sherman, P Marullo, CT Hittinger, P Gonçalves, JP Sampaio. *Nature Communications*. DOI: 10.1038/ncomms5044 (2014)