

## AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS PSICROTOLERANTES DE BACTERIAS LÁCTICAS ENOLÓGICAS DE LA REGIÓN PATAGÓNICA

MANERA Camila\*, BRAVO-FERRADA Bárbara M, TYMCZYSZYN Elizabeth E, DELFEDERICO Lucrecia, OLGUÍN Nair T, SEMORILE Liliana, VALDÉS LA HENS Danay

Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña N°352, (1876) Bernal, Argentina.

camilamanera@gmail.com, bbferrada@unq.edu.ar, elitym@yahoo.com.ar,  
lucrecia.delfederico@gmail.com, ntolguin@gmail.com, lsemorile@unq.edu.ar, dvhens@unq.edu.ar

### Resumen

La vinificación de variedades tintas patagónicas ocurre en abril y mayo, con bajas temperaturas ambientales que inhiben el progreso de la fermentación maloláctica (FML), por ser un factor de estrés para las bacterias lácticas (BAL) que conducen el proceso. Las bodegas deben calentar los tanques de fermentación, incrementando los costos de producción. El desarrollo de cultivos malolácticos nativos, tolerantes a bajas temperaturas, constituye una herramienta estratégica para resolver el problema y potenciar el carácter regional de los vinos. El objetivo del trabajo consistió en obtener cepas enológicas patagónicas de BAL, capaces de sobrevivir y consumir ácido L-málico en vinificaciones a bajas temperaturas (4 y 10 °C). Los aislamientos psicrotolerantes procedieron de vino Pinot noir (bodega comercial de General Roca, Río Negro). Su identificación se realizó por secuenciación del gen *16S rRNA* y la similitud genética se analizó por RAPD-PCR con el *primer* M13. Como primer criterio de selección se evaluó su supervivencia en vino estéril incubado a bajas temperaturas. Posteriormente, las cepas que exhibieron mejor tolerancia, UNQoE19 (*O. oeni*) y UNQLh1.1 (*Lb. hilgardii*), se inocularon en vino, a escala de laboratorio, y se evaluaron su supervivencia y sus capacidades de implantación y de consumo de ácido L-málico, con resultados promisorios.

### Introducción

La vinificación es un proceso complejo donde las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, producen la fermentación alcohólica (FA) al consumir los azúcares de la uva para convertirlos en etanol, conduciendo así a la transformación del mosto en vino. Durante o después de la FA ocurre la fermentación maloláctica (FML), consistente en la decarboxilación del ácido L-málico y conversión en ácido L-láctico, proceso que desarrollan una o más especies de BAL, principalmente *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* (López et al. 2008, Miller et al. 2011, Bravo Ferrada et al. 2013, Valdés La Hens et al. 2015). La FML produce la deacidificación del vino con el concomitante incremento del pH, un efecto deseable en vinos de elevada acidez. También contribuye a la estabilidad microbiana, por remoción del ácido L-málico como posible fuente de carbono, y a la modificación del perfil aromático del vino, ligado a las actividades enzimáticas de BAL (Henick-Kling 1993, Maicas et al. 1999, Ugliano et al. 2003, Lerm et al. 2010). La FML suele ocurrir espontáneamente, por acción de las bacterias nativas provenientes de la uva y la bodega.

Sin embargo, las condiciones estresantes del vino (elevado nivel de etanol, bajo pH, presencia de sulfito, etc.) y la tecnología del proceso de vinificación, pueden reducir la viabilidad bacteriana y alterar su metabolismo. Asimismo, los procesos espontáneos pueden dar resultados no buscados, tales como incremento en la acidez volátil, consumo de azúcares residuales y formación de metabolitos indeseables como aminas biogénicas (López et al. 2008). Para evitar pérdidas en la producción pueden agregarse iniciadores malolácticos durante la vinificación, a fin de garantizar el éxito del proceso fermentativo, existiendo en el mercado diversos cultivos comerciales, principalmente de cepas de *O. oeni* y en menor medida de cepas *Lb. plantarum*, pero siempre formulados con cepas de regiones vitivinícolas foráneas. Otras especies de *Lactobacillus* están siendo evaluadas como posibles iniciadores malolácticos y algunas cepas de *Lb. hilgardii* han mostrado capacidad para completar la FML en tiempos similares a cepas de *O. oeni* (du Toit 2012). Los criterios de selección de cepas de BAL para su empleo como cultivos malolácticos incluyen: I- capacidad de resistencia al ambiente vino y al proceso de vinificación, II- buen consumo de AM e impacto positivo en el aroma, III- garantía de inocuidad (incapacidad de producción de aminas biogénicas) (du Toit et al. 2012). En trabajos previos de nuestro grupo se obtuvieron y caracterizaron numerosas cepas nativas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*, algunas con excelentes propiedades enológicas y tecnológicas que las convierten en potenciales candidatas para formular cultivos malolácticos, cuyo empleo podría evitar los riesgos de FML espontáneas y potenciar la tipicidad regional de vinos tintos patagónicos.

Por otra parte, y debido a las condiciones climáticas de la región vitivinícola Patagonia, la FML suele ocurrir a temperaturas ambientales bajas (inferiores a 15 °C), que afectan negativamente el normal desarrollo del proceso. Las bodegas resuelven el problema calentando los tanques o el ambiente de fermentación, incrementando significativamente los costos de producción del vino. La exposición de las BAL a ambientes fríos provoca cambios fisiológicos importantes, como disminución de la fluidez de la membrana plasmática y estabilización de estructuras secundarias en DNA y RNA. La respuesta bacteriana a estos efectos se denomina *cold-shock response* y permite la síntesis de distintas proteínas CIP (*Cold Induced Proteins*). Si bien la concentración de etanol del vino parece ser el factor de estrés determinante para las BAL, en regiones vitivinícolas de climas fríos la baja temperatura emerge como un segundo elemento importante de estrés, inhibiendo o retrasando el normal desarrollo de la FML. Surge entonces la necesidad de seleccionar cepas de BAL psicrotolerantes, capaces de conducir esta fermentación a temperaturas sub-óptimas. Hasta el momento sólo Vigentini et al. (2009) demostraron que *O. oeni* posee capacidad de crecer a 5 °C en MRS líquido y a 10 °C en vinificaciones de laboratorio. Tanto *O. oeni* como *Lb. plantarum* son capaces de expresar proteínas de respuesta a estrés ante *shocks* de baja temperatura (Spano and Massa 2006). Para la producción vitivinícola patagónica, la disponibilidad de cultivos iniciadores malolácticos formulados con cepas nativas de BAL capaces de adaptarse a diferentes temperaturas de vinificación, resulta una estrategia regional de bajo costo que permitiría garantizar FML exitosas en esta condición climática. La inoculación de cultivos iniciadores nativos garantiza la implantación y el rápido inicio del proceso fermentativo. Estas cepas ecotípicas, mejor adaptadas a las características agroecológicas de los cultivares de su región, además de presentar mayor capacidad de competencia que las cepas foráneas frente a la biota indígena durante la vinificación, respetan la tipicidad del terruño y potencian la expresión de las características organolépticas distintivas de los vinos regionales.

De acuerdo a las razones mencionadas, el objetivo del trabajo ha sido el de obtener una colección de cepas nativas de BAL psicotolerantes, con capacidad de mantenerse viables y desarrollar su actividad metabólica a temperaturas inferiores a la óptima, eficaces para inducir y completar exitosamente la FML y que potencien la expresión de las características organolépticas distintivas de los vinos regionales.

## **Materiales y Métodos**

### *Vino empleado para aislamiento de BAL psicotolerantes*

Se procesaron muestras de vino de vinificaciones comerciales de *Vitis vinifera*, varietal Pinot noir cosecha 2014, procedentes de una bodega ubicada en General Roca, a 39.2° de latitud sur, en el Alto Valle del Río Negro, Patagonia Argentina. Las FA y FML de este vino se realizaron espontáneamente, sin inoculación de iniciadores comerciales. Al final de la FA, el vino contenía 14,3% v/v de etanol, 2,3 g/L de ácido málico y pH 3,7.

### *Aislamiento de BAL psicotolerantes*

Para el aislamiento de BAL psicotolerantes los muestras de vino se mantuvieron 30 días en heladera y luego se procedió a la siembra en caldos MLO (Caspritz & Radler 1983) para *O. oeni* y MRS (De Man, Rogosa and Sharpe 1960) para otras especies de BAL, ambos adicionados de cicloheximida 100 ml/L. Los caldos se incubaron en microaerobiosis a temperaturas de 4 y 15 °C, durante 30 días, tomando muestras cada 5 días para sembrar en placas de agar MLO y MRS. Las placas se incubaron a 4 y 15 °C durante 30 días. Cada aislamiento puro se analizó mediante tinción de Gram y prueba de catalasa. Las bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas y catalasa negativas se consideraron BAL y se conservaron a -20 °C.

### *Crecimiento de los aislamientos*

Cada aislamiento se inoculó en caldo MRS (BAL) o MLO (*O. oeni*), según correspondiera, para obtener biomasa. Los caldos se incubaron a 28 °C, durante 48 h (MRS) o 7 días (MLO), en microaerobiosis. Al final de la incubación se controló la ausencia de contaminación y se determinó la concentración bacteriana.

### *Aclimatación de cultivos*

Previo a la inoculación en vino estéril, los cultivos se sometieron a un proceso de aclimatación, para mejorar su tolerancia a las condiciones estresantes del mismo. Los cultivos se centrifugaron y las bacterias se resuspendieron en 10 mL de medio de aclimatación ((50 g/L MRS, 40 g/L D (-) fructosa, 20 g/L D (-) glucosa, 4,5 g/L ácido L- málico, 1 g/L Tween 80, 0,1 mg/L piridoxina, etanol 10% (v / v), pH a 4,6) (Bravo Ferrada et al. 2014, 2016). Después de 48 h de incubación a 21 °C y a 15 °C, las células se recuperaron por centrifugación para ser posteriormente inoculadas en vino estéril.

### *Inoculación en vino estéril*

Las inoculaciones se realizaron en vino Pinot noir esterilizado por doble filtración (0,45 µm y 0,2 µm). De cada cultivo aclimatado se inoculó 1 mL (aprox. 10<sup>8</sup> UFC/mL) en 10 mL de vino estéril,

por triplicado, que se incubaron a 4, 10 y 21 °C, durante 20 días. Se tomaron muestras los días 0, 5, 10, 15 y 20, para recuentos de viables por diluciones seriadas y siembra en placas de MLO o MRS, según correspondiera, por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (*Analysis of Variance*) con el Programa *Graphpad* versión 6.01.

#### *Evaluación del consumo de ácido L-málico*

A los mismos tiempos, y para cada temperatura de incubación, se tomaron muestras de 500 µl para determinar la concentración de ácido L-málico remanente (AM) (g/L) mediante *L-Malic Acid Enology Enzymatic Kit*, *BioSystems SA*, Barcelona, España. El análisis de la cinética de consumo al día 20, se realizó mediante un modelo exponencial de decaimiento monofásico. La ecuación (1) del modelo:  $[MA_t] = ([MA_0] - [MA_i] e^{-Kt} + [MA_i])$  se obtuvo del *software GraphPad Prism®*, San Diego, CA, 2007. El porcentaje de AM consumido (%CAM), a los 20 días de incubación, se calculó con la ecuación (2):  $\%CAM\% = 100 - ([MA_t] 100 / [MA_0])$  (Brizuela et al. 2017), donde  $[MA_0]$  es la concentración inicial de AM en el vino y  $[MA_t]$  es la concentración a los 20 días. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías y con  $P < 0,0001$  las diferencias se consideraron estadísticamente significativas.

#### *Identificación y tipificación molecular*

Los aislamientos se cultivaron hasta fase exponencial en caldo MRS o MLO, según correspondiera, a 28 °C, en microaerobiosis, durante 48 h o 7 días, respectivamente. El DNA de cada aislamiento se extrajo de acuerdo a Bravo Ferrada et al. (2013). Mediante *Nanodrop (NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific)* se determinó su concentración y pureza. Para la identificación se amplificó, mediante PCR (*Eppendorf* modelo *Mastercycler Gradient*), un fragmento del gen *16S rRNA*, utilizando los *primers* pA-16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y pH-16SR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Rodas et al. 2003). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en agarosa 1%, se purificaron (*QIAquick PCR purification, QIAGEN Corp.* California, USA) y enviaron a secuenciar (*Macrogen Corp.*, Corea). El análisis de las secuencias se realizó por comparación con secuencias depositadas en el *GenBank* (Bethesda, Maryland, USA).

La tipificación se realizó mediante RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) con el *primer* M13 (Stendid et al. 1994). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,8%. La ausencia o presencia de bandas permitió construir una matriz de distancia aplicando el método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) (Delfederico et al. 2006).

#### *Comportamiento e implantación en vino a escala de laboratorio*

Las cepas seleccionadas por su viabilidad y consumo de AM en vino estéril, se inocularon en vino sin esterilizar para estudiar su capacidad de implantación y de consumo de ácido L-málico en esta nueva condición. Cultivos aclimatados de las mismas se inocularon en concentraciones de  $10^8$  UFC/mL, en alícuotas de 10 mL de vino Pinot noir (por triplicado), que se incubaron a 4, 10 y 21 °C, durante 20 días. Se tomaron muestras los días 0, 5, 10, 15 y 20 para determinar el ácido- L málico remanente y la viabilidad celular, usando como control vino no estéril sin inocular.

El análisis de implantación se realizó mediante RAPD-PCR con el *primer* M13 (Stendid et al. 1994). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en agarosa 1,8% usando un *ladder* 100 pb PB-L (Productos Bio-Lógicos-UNQ). La evaluación de implantación se realizó comparando los perfiles RAPD de las colonias tomadas al azar con los perfiles de los aislamientos inoculados.

## Resultados

### *Aislamiento de BAL psicotolerantes*

A los cultivos puros obtenidos se les realizó coloración de Gram, prueba de catalasa y determinación de presencia de esporos para seleccionar los BAL presuntivos. Se seleccionaron 20 aislamientos provenientes de agar MLO, con morfología de cocos elipsoides individuales o agrupados en cadenas cortas de hasta 8 células (Gram (+), catalasa (-), no esporulantes) y 20 provenientes de agar MRS, con morfología de bacilos dispuestos individualmente (Gram (+), catalasa (-), no esporulantes).

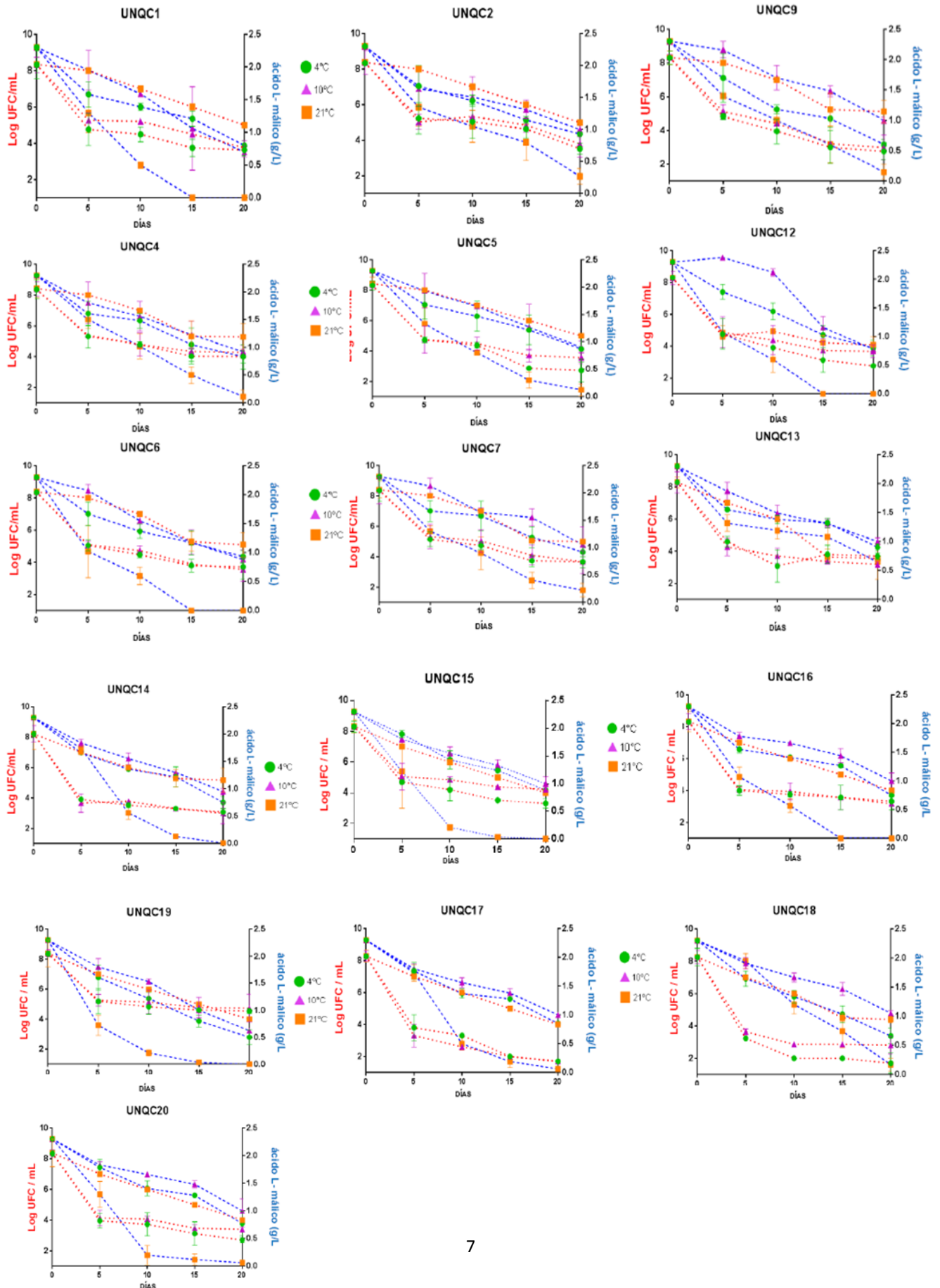
### *Viabilidad y capacidad de consumo de ácido L-málico en vino estéril*

Como primer criterio tecnológico de selección de BAL psicotolerantes se evaluó su comportamiento (viabilidad y capacidad de consumir ácido L málico) en vino estéril incubado a bajas temperaturas. Sólo se observó viabilidad cuando se inocularon en vino ( $10^8$  UFC/mL) los cultivos aclimatados a 21 °C. El 80% de los aislamientos de cocos (UNQC1, UNQC2, UNQC4, UNQC5, UNQC6, UNQC7, UNQC9, UNQC12, UNQC13, UNQC14, UNQC15, UNQC16, UNQC17, UNQC18, UNQC19, UNQC20) y el 45% de los lactobacilos (UNQL1.1, UNQL2.1, UNQL3.1, UNQL4.1, UNQL1.2, UNQL3.2, UNQL4.2, UNQL1.3 y UNQL2.3) se mantuvieron viables en el vino estéril, en diferente medida. Es decir que, en las condiciones ensayadas, se observó una mejor adaptación a las condiciones del vino estéril por parte de los cultivos psicotolerantes de cocos.

A partir de los valores de recuento de viables de los 16 aislamientos de cocos (Figura 1), se observó que 14 (87,5%) (UNQC1, UNQC2, UNQC4, UNQC5, UNQC6, UNQC7, UNQC9, UNQC12, UNQC14, UNQC15, UNQC16, UNQC17, UNQC18 y UNQC20) mostraban menor viabilidad a 4 °C que a 21 °C, observándose diferencias de uno a tres órdenes de magnitud entre ambas temperaturas, al día 20. Los aislamientos UNQC13 y UNQC19, mostraron viabilidades similares en el vino incubado a 4 °C y a 21 °C. A 10 °C, 9 de los 14 aislamientos mencionados (64,3%) mostraron al día 20 valores de viables del mismo orden de magnitud que a 4 °C (UNQC1, UNQC2, UNQC4, UNQC6, UNQC7, UNQC14, UNQC16, UNQC17 y UNQC20). Los 5 aislamientos restantes (35,7%) (UNQC5, UNQC9, UNQC12, UNQC15 y UNQC18 y UNQC20) exhibieron, al día 20, diferencias de un orden de magnitud entre los valores de viables a 4 y a 10 °C. Los aislamientos más sensibles a las bajas temperaturas fueron UNQC17 y UNQC18, con valores de viables del orden de  $10^1 - 10^2$  UFC/mL, a los 20 días de incubación. En tanto, UNQC4 y UNQC19, fueron los más tolerantes, con recuentos del orden de  $10^4$  UFC/mL a los 20 días de incubación. En términos generales, la viabilidad bacteriana a 4 °C y 10 °C desciende abruptamente hasta el día 5, para luego estabilizarse o descender lentamente. A 21 °C, en cambio, se observa un descenso más lento y gradual del número de bacterias viables.

Si bien todos los aislamientos de cocos mostraron capacidad de consumir AM en las distintas condiciones, el comportamiento resultó heterogéneo (Figura 1). A 21 °C la cinética de consumo de

AM resultó más rápida y la concentración remanente menor. Seis aislamientos (UNQC1, UNQC6, UNQC12, UNQC15, UNQC16 y UNQC19) consumieron el 100% del AM del vino entre los 15 y 20 días de incubación, cuatro de ellos (UNQC1, UNQC6, UNQC12 y UNQC16) a los 15 días y dos a los 20 días (UNQC15 y UNQC19). El AM consumido a 4 °C resultó mayor que a 10 °C en los aislamientos UNQC7, UNQC9, UNQC14, UNQC16, UNQC17, UNQC18, UNQC19 y UNQC20. El aislamiento UNQC19, tanto a 4 °C como a 10 °C, exhibió el mayor consumo de AM de la colección.

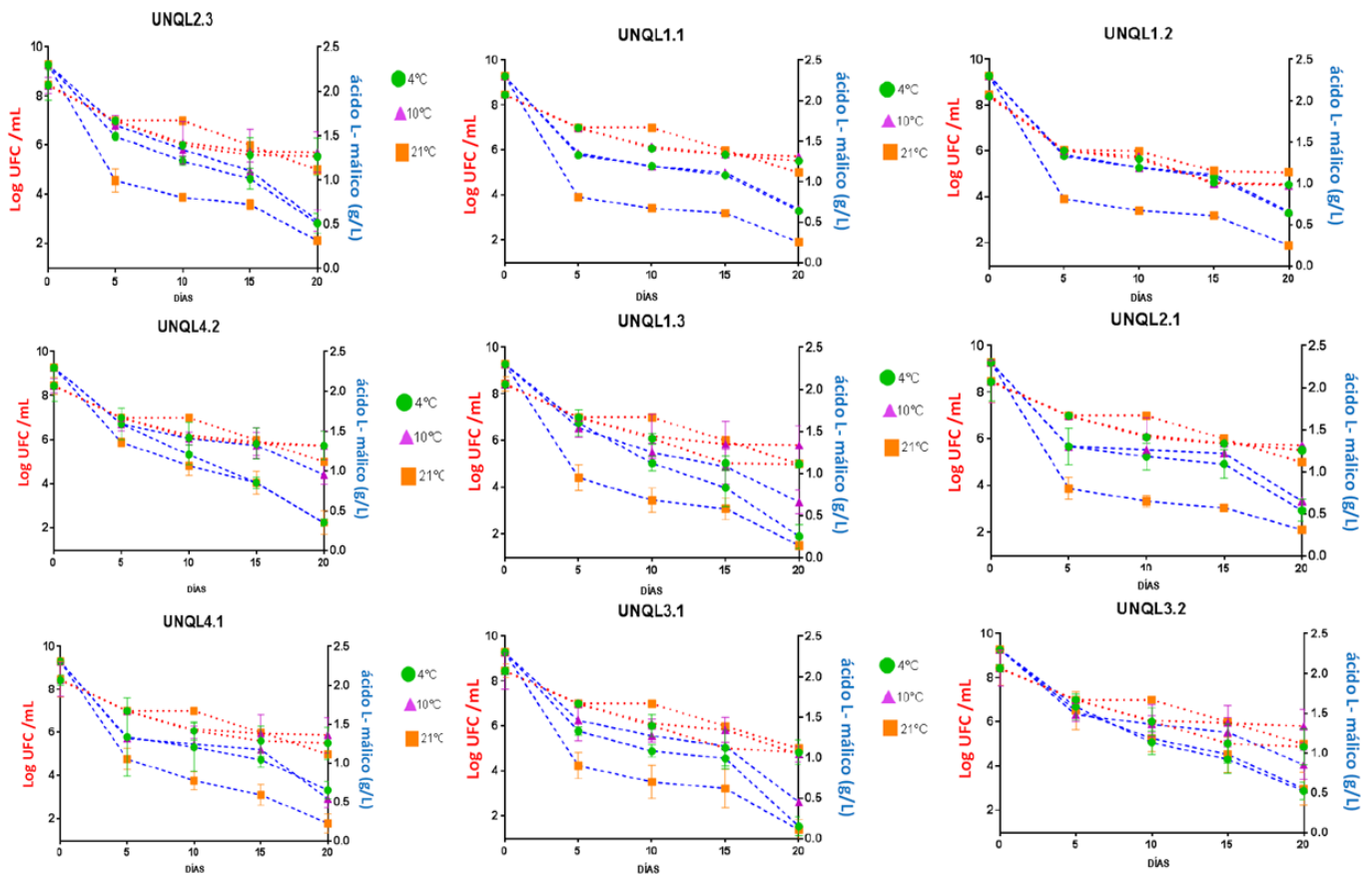


**Figura 1:** Evolución de los valores de concentración de ácido L-málico (---) y de viabilidad (.....) en vino estéril inoculado ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) con cada aislamiento de cocos. Los valores graficados son la media de tres réplicas independientes. Las incubaciones se realizaron a 4, 10 y 21 °C.

En el caso de los aislamientos de lactobacilos, si bien sólo 9 de los 20 mostraron viabilidad en el vino estéril incubado a bajas temperaturas, los valores de recuento de viables fueron superiores que en el caso de los aislamientos de cocos, oscilando entre  $10^4 - 10^5$  UFC/mL (Figura 2). Cinco aislamientos de lactobacilos (UNQL1.1, UNQL2.1, UNQL4.1, UNQL4.2, UNQL2.3) mostraron similares valores de viables a las tres temperaturas ensayadas. Otros dos, UNQL3.1 y UNQL1.2 exhibieron recuentos similares a 4 y 10 °C, y un valor mayor, en un orden de magnitud, a 21 °C. En tanto los restantes (UNQL3.2 y UNQL1.3) alcanzaron recuentos similares a 10 y 21 °C, y un valor menor, en un orden de magnitud, a 4 °C.

Las cinéticas de consumo de AM en los lactobacilos se muestran también en la Figura 2. A 21 °C, la disminución de la concentración de AM resultó más rápida y los valores de consumo fueron mayores. Los aislamientos UNQL1.1, UNQL1.2, UNQL1.3, UNQL2.1, UNQL3.1, UNQL4.1 y UNQL2.3, exhibieron cinéticas similares y ninguno alcanzó a consumir el 100% del AM contenido en el vino, a los 20 días de incubación.

El aislamiento UNQL3.1, tanto a 4 °C como a 10 °C, exhibió los mayores valores de consumo de AM. Ninguno de los 9 aislamientos fue capaz de consumir la totalidad del AM contenido en el vino estéril, ni siquiera cuando éste se incubó a 21 °C.

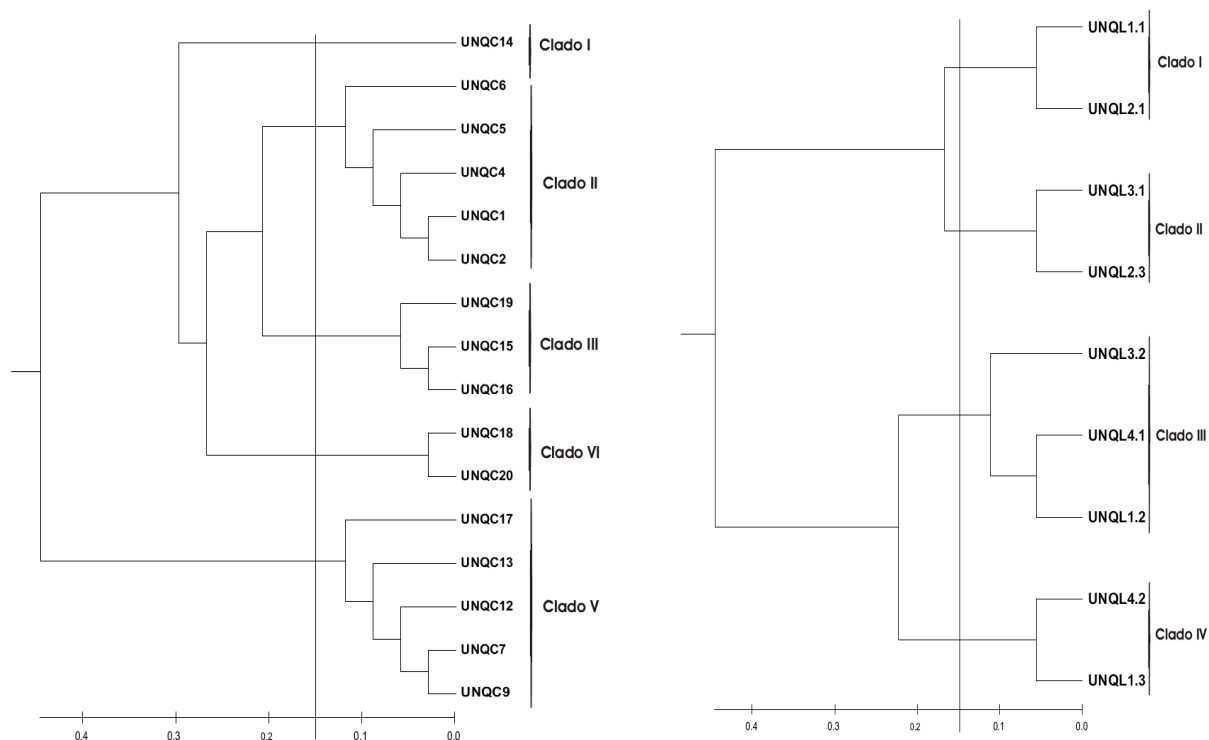




**Figura 2:** Evolución de los valores de concentración de ácido L-málico (---) y de viabilidad (.....) en vino estéril inoculado ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) con cada aislamiento de lactobacilos. Los valores graficados son la media de tres réplicas independientes. Las incubaciones se realizaron a 4, 10 y 21°C.

*Tipificación mediante PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Para explorar el grado de similitud genética de los aislamientos de cocos se realizó el análisis numérico de los perfiles electroforéticos de DNA, obtenidos por RAPD-PCR con el *primer* M13. El dendrograma generado se analizó considerando un valor de corte de 85% de similitud. Los aislamientos se agruparon en 5 clados, que muestran 12 genotipos diferentes (Figura 3 A). El clado I contiene a UNQC14, que aparece como el aislamiento más distante de la colección. El clado II está integrado por 5 aislamientos, de los cuales UNQC1 y UNQC2 mostraron 100% de similitud entre sí. El clado III contiene 3 aislamientos, siendo UNQC15 y UNQC16 100% similares. El clado IV agrupa los aislamientos UNQC18 y UNQC20 con un 100% de similitud entre sí. Finalmente, el clado V contiene 5 aislamientos de los cuales UNQC7 y UNQC9 comparten un 100% de similitud. El dendrograma generado para los aislamientos de lactobacilos se analizó con un valor de corte de 85,5% de similitud (Figura 3B). Los aislamientos se agruparon en 4 clados, que diferencian 5 genotipos. Los clados I, II y IV contienen dos aislamientos cada uno, que



muestran 100% de similitud entre ellos. El clado III contiene tres miembros, de los cuales UNQC4.1 y UNQC1.2 muestran un 100% de similitud.

**Figura 3.** Dendrogramas obtenidos por el método UPGMA para aislamientos de cocos (A) y de lactobacilos (B).

### *Identificación mediante análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA*

Los aislamientos de cocos y lactobacilos seleccionados por su comportamiento en vino estéril se identificaron mediante secuenciación del gen *16S rRNA*. A este efecto se realizaron las amplificaciones de dicho gen en los 25 aislamientos (16 cocos y 9 lactobacilos), que se remitieron a un servicio de secuenciación (*Macrogen*, Korea). Los datos de secuencia se analizaron mediante los programas BLAST y MEGA4 y las secuencias analizadas se enviaron para su publicación en la Base de Datos *GenBank* (Bethesda MD, USA).

A partir de las secuencias obtenidas para cada aislamiento de coco, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el Programa *Clustal X* (Thompson et al. 1994). Todas se alinearon con cepas de *Oenococcus oeni*, con porcentajes de similitud que variaron entre 96 y 99%. Los números de acceso publicados en *Genbank* son los siguientes: UNQOe9 (KY561596), UNQOe7 (KY561597), UNQOe6 (KY561598), UNQOe5 (KY561599), UNQOe4 (KY561600), UNQOe20 (KY561601), UNQOe2 (KY561602), UNQOe19 (KY561603), UNQOe18 (KY561604), UNQOe17 (KY561605), UNQOe14 (KY561606), UNQOe13 (KY561607), UNQOe12 (KY561609), UNQOe1 (KY561608).

Los aislamientos de lactobacilos mostraron similitudes de 95 a 98% con cepas de *Lactobacillus hilgardii*, siendo sus números de acceso en *Genbank* los siguientes: UNQLh4.2 (KY561610), UNQLh4.1 (KY561611), UNQLh3.2 (KY561612), UNQLh3.1 (KY561613), UNQLh2.1 (KY561615), UNQLh1.2 (KY561617), UNQLh1.1 (KY561618), UNQLh1.3 (KY561616).

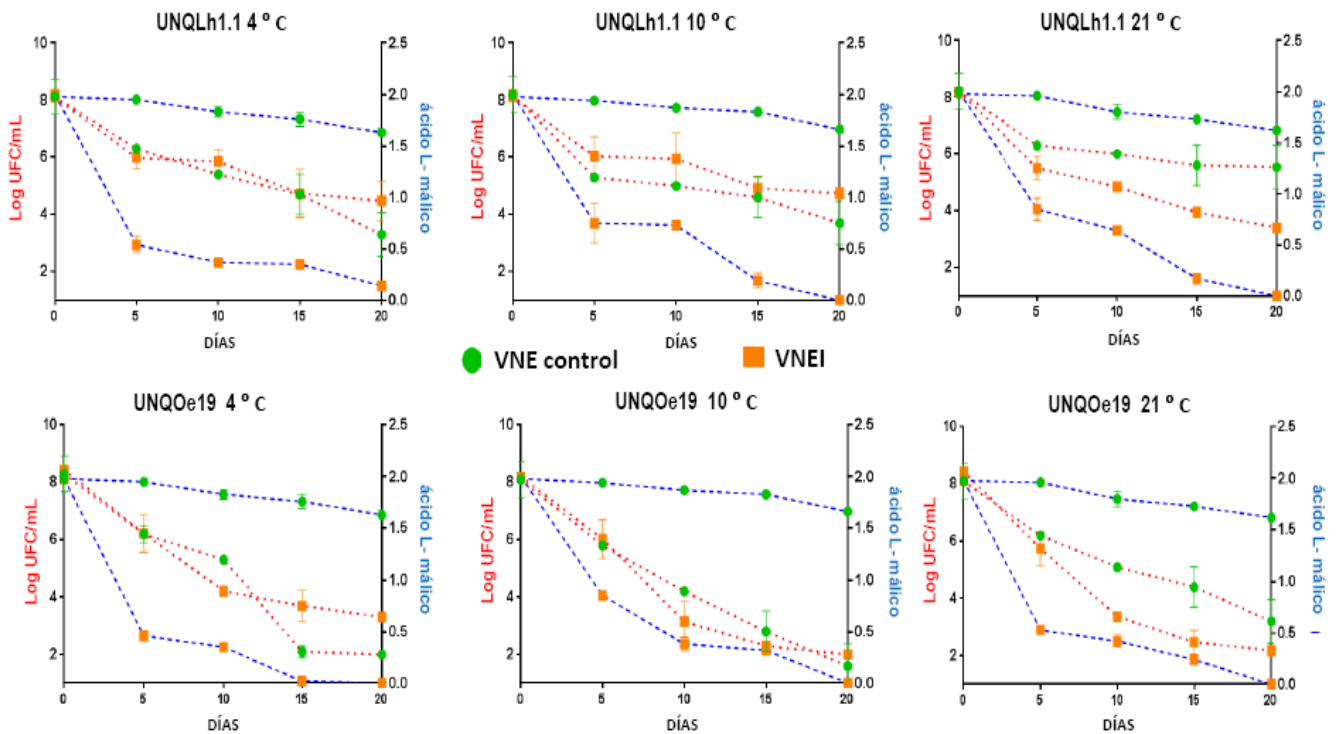
Finalizada la identificación molecular se establecieron nuevas nomenclaturas para las cepas de *Oenococcus oeni* (UNQOe) y para las cepas de *Lactobacillus hilgardii* (UNQLh).

### *Ensayos de vinificación a escala de laboratorio*

Para este ensayo se seleccionaron las cepas UNQOe19 y UNQLh1.1 por presentar una buena combinación de viabilidad y consumo de AM en vino estéril incubado a bajas temperaturas (Figura 4). Su inoculación en vino Pinot noir no estéril tuvo el propósito de evaluar su capacidad de implantación en presencia del consorcio microbiano nativo del vino, así como su comportamiento en relación a viabilidad, capacidad de consumo de AM y temperatura de incubación (4, 10 y 21 °C). Al día 20, la cepa UNQLh1.1 mostró valores similares de viabilidad ( $4,4 \times 10^6$  UFC/mL) a bajas temperaturas de incubación (4 y 10 °C), pero a 21 °C, la viabilidad descendió a valores de  $3,3 \times 10^6$  UFC/mL. En el vino sin inocular (control), incubado a 4 y 10 °C, el recuento de viables (biota nativa de BAL), resultó algo menor que el exhibido por la cepa UNQLh1.1, con valores de  $3,3 \times 10^6$  y  $3,7 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente. En cambio, a 21 °C, los recuentos de viables nativas resultaron mayores ( $5,5 \times 10^6$  UFC/mL) que en el vino inoculado con UNQLh1.1.

La cepa UNQOe19 mostró, al día 20 de vinificación a 4 °C, el mejor valor de viabilidad ( $3,3 \times 10^6$  UFC/mL), comparado con los tratamientos a 10 y 21 °C. Los valores de viabilidad a 10 y 21 °C resultaron similares entre sí. En el control no inoculado se encontró que la viabilidad de las cepas nativas de *O. oeni*, tanto a 4 como a 10 °C, resultó menor que la de la cepa inoculada. Sin embargo, a 21 °C, la viabilidad de las nativas fue mayor ( $3,2 \times 10^6$  UFC/mL), como ocurrió en el ensayo anterior con la cepa del lactobacilo.

La cinética de consumo de AM de la cepa UNQLh1.1 mostró su capacidad de consumir casi todo este ácido a 4 °C, y el 100% a 10 y 21 °C, a los 20 días de incubación. La cepa UNQOe19, en

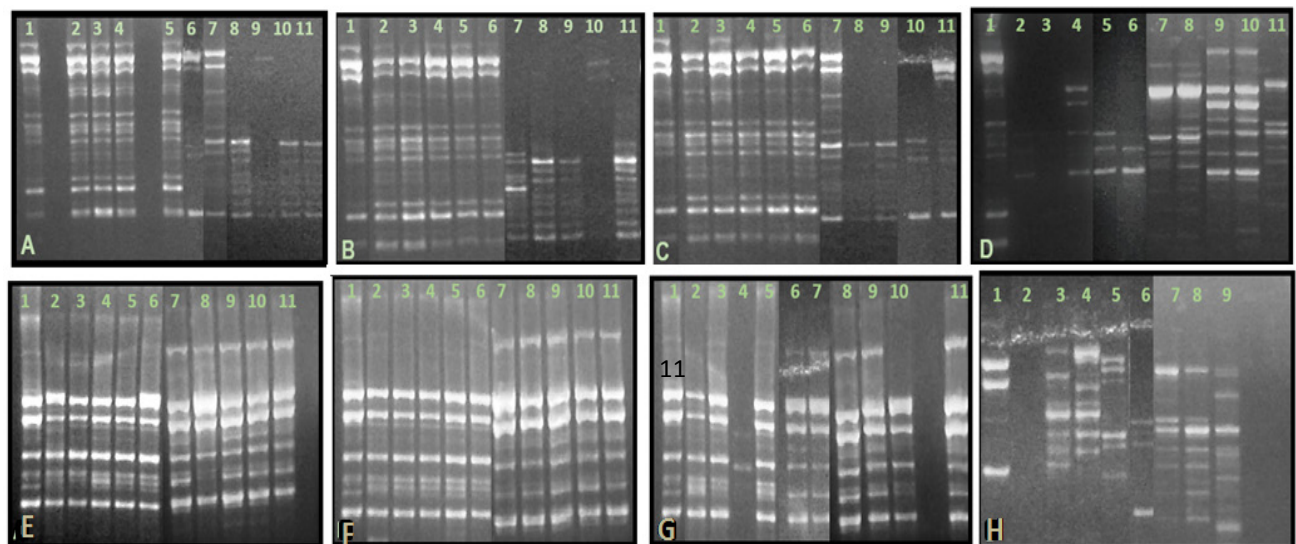


tanto, consumió la totalidad del AM a los 15 días, cuando el vino se incubó 4 °C, mientras que a 10 y 21 °C lo logró a los 20 días de incubación. En el control no inoculado prácticamente no se observó consumo de AM por parte de las BAL nativas del mismo.

**Figura 4:** Análisis de viabilidad y de consumo de ácido L-málico en vino Pinot noir no estéril (VNEI), incubado a 4, 10 y 21 °C, e inoculado con una concentración de  $10^8$  UFC/mL de las cepas UNQOe19 y UNQLh1.1. Control: vino no estéril sin inocular (VNE control).

*Análisis de implantación en vino de las cepas inoculadas*

En el caso de UNQOe19, se observaron perfiles similares a ésta, a 4, 10 y 21 °C (Figura 5). En el control no inoculado, no se hallaron perfiles similares al de UNQOe19 (Figura 5). Análogos resultados se encontraron en los vinos inoculados con la cepa UNQLb1.1 e incubados a 4, 10 y 21



°C. En este caso, los perfiles hallados correspondieron al de la cepa inoculada. En el vino control sin inocular, no se observó el perfil de la cepa UNQLb1.1 (Figura 5).

**Figura 5:** Análisis de implantación de las cepas UNQOe19 y UNQLh1.1 inoculados en vino Pinot noir no estéril ( $10^8$  UFC/mL). **A-** Vino inoculado con UNQOe19 e incubado a 4 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQOe19; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **B-** Vino inoculado con UNQOe19 e incubado a 10 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQOe19; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **C-** Vino inoculado con UNQOe19 e incubado a 21 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQOe19; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **D-** Vino no inoculado incubado a 21 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQOe19; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **E-** Vino inoculado con UNQOe19 e incubado a 4 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQLh1.1; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **F-** Vino inoculado con UNQLh1.1 e incubado a 10 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQLh1.1; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **G-** Vino inoculado con UNQLh1.1 e incubado a 21 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQLh1.1; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar. **H-** Vino no inoculado incubado a 21 °C. Calle 1- Perfil RAPD de UNQLh1.1; calles 2 a 11: perfiles RAPD de colonias picadas al azar.

## Discusión

Como etapa inicial de un estudio cuyo objetivo es el diseño de cultivos iniciadores malolácticos nativos y eficaces a las bajas temperaturas de esta región vitícola, se procedió a obtener aislamientos de BAL psicrotolerantes a partir de la biota láctica nativa de un varietal típico de la zona, el Pinot noir. Si bien distintos autores se han enfocado en el estudio de cepas enológicas de BAL (Henick-Kling et al. 1989, Bae et al. 2006, González-Arenzana et al. 2012, Valdés La Hens et al. 2015), procedentes de diferentes varietales y de distintas regiones vitivinícolas del mundo, éste es el primer estudio de obtención y caracterización de BAL psicrotolerantes presentes en FML espontáneas de vinos patagónicos. Si bien *O. oeni* es la especie mayoritariamente empleada en cultivos malolácticos comerciales, especies del género *Lactobacillus* también han mostrado capacidad de sobrevivir al ambiente hostil del vino (G-Alegría et al. 2004, Pozo-Bayón et al. 2005, du Toit et al. 2011), destacándose *Lb. plantarum* por su mayor potencial como cultivo iniciador (du Toit et al., 2011, Bravo-Ferrada et al. 2013).

La incubación de las muestras de vinos, durante 30 días, a baja temperatura fue la presión de selección aplicada. El posterior enriquecimiento de las mismas, por siembra en caldos MLO y MRS incubados otros 30 días a 4 y 15 °C, permitió incrementar sustancialmente la frecuencia de aislamiento de BAL psicrotolerantes, sugiriendo que ambas condiciones favorecieron el desarrollo de esta sub-población de BAL dentro de la microbiota nativa del vino. Es probable que este resultado sea consecuencia de la expresión de genes relacionados con el estrés por temperatura en ciertas cepas bacterianas presentes, las cuales pudieron así tolerar el medio vino, manteniéndose viables y haciendo posible su aislamiento.

Con el propósito de realizar una primera selección de la colección de aislamientos de BAL capaces de crecer a temperatura no óptima, se aplicó el criterio de analizar la tolerancia a la incubación en vino estéril a baja temperatura, evaluando la viabilidad bacteriana y su capacidad de consumir ácido L-málico. Previo a la inoculación en vino resultó necesario someter a los

aislamientos a un proceso de aclimatación, para garantizar su supervivencia en estas condiciones. Se ha demostrado que elevadas concentraciones de etanol y sulfito y un pH bajo, resultan importantes factores de inhibición de las bacterias lácticas durante el desarrollo de la FML (Bravo-Ferrada et al. 2016). Sin embargo, se ha hallado que ciertas cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* son capaces de crecer en estas condiciones si previamente se las adapta al medio ambiente del vino (Maicas et al. 2000, Bravo-Ferrada et al. 2015, Brizuela et al. 2016). Este proceso de adaptación conlleva cambios en la composición y propiedades de la membrana plasmática bacteriana, tales como modificaciones en la composición de ácidos grasos y en el perfil proteico. Por estas razones, previo a inocular los aislamientos de BAL psicotolerantes en vino estéril, se realizó su aclimatación, incubándolos durante 48 h a las temperaturas de 15 y 21 °C. Sólo pudo observarse viabilidad cuando la aclimatación se realizó a 21 °C, indicando la necesidad de realizar nuevos ensayos de aclimatación empleando temperaturas de incubación intermedias entre 15 y 21 °C y alargando el tiempo de incubación, para mejorar la adaptación bacteriana al ambiente hostil del vino. La pre-exposición de las BAL a condiciones de estrés sub-letales permite que las bacterias adquieran los mecanismos de tolerancia necesarios para mantener activa su maquinaria metabólica. En cepas de *O. oeni* se ha reportado la síntesis y regulación transcripcional de la proteína de choque térmico Lo18, de chaperonas y de proteasas (Beltramo et al. 2004). Por su parte, van de Guchte et al. (2002) describieron el fenómeno de adaptación como bimodal, con un componente fisiológico que implica sistemas enzimáticos, y otro inducido que requiere de cambios en la expresión genómica. En la adaptación al estrés por temperatura resulta necesaria la síntesis de proteínas que permitan mantener la actividad celular y la integridad de diferentes componentes bacterianos. La respuesta al estrés por frío requiere de futuros estudios sobre la regulación y expresión de genes en las cepas de BAL psicotolerantes obtenidas en este trabajo.

Si bien los aislamientos de cocos mostraron los mayores valores de viabilidad en vino estéril a 21 °C, que es la temperatura óptima, se destacó el comportamiento de UNQC13 y UNQC19, que exhibieron mayor viabilidad a temperaturas bajas (4 y 10 °C) que en los controles a 21 °C. En el caso de los lactobacilos se observó que 5 de los 9 aislamientos mostraron similares valores de viabilidad a las tres temperaturas analizadas, en tanto otros exhibieron viabilidades similares a 10 y 21 °C y los restantes presentaron mayor viabilidad a 21 °C. Estos resultados sugieren fuertemente que la población de BAL psicotolerantes analizada resultaba heterogénea en cuanto a su viabilidad en vino estéril incubado a bajas temperaturas. Si bien el número de aislamientos de lactobacilos que se mantuvieron viables en esta condición fue inferior al de los cocos (9 a 16), en general exhibieron valores de viabilidad mayores que los cocos al tiempo final de incubación (día 20). Esto sugiere que la población de lactobacilos estaría menos representada que la de cocos en el consorcio bacteriano del vino empleado, si bien exhibía mayor posibilidad de mantenerse viable en el rango de temperaturas de 4 a 21 °C, hecho que reviste singular importancia para una región vitivinícola con gran amplitud térmica, como la Patagonia. Podría suponerse que, en un proceso de vinificación desarrollado a baja temperatura, los cocos y lactobacilos psicotolerantes lograrían convertirse en la población mayoritaria activa. La comprobación de este supuesto requiere de ensayos de vinificación, en los cuales se inoculen estos aislamientos y se analice su comportamiento en relación al de la flora nativa.

Otro parámetro evaluado fue la capacidad de consumir el ácido L-málico contenido en el vino estéril, incubado a bajas temperaturas. En general se observó que los aislamientos de cocos

fueron capaces de consumir el 100% del mismo, a 21 °C, entre los 15 y 20 días de incubación, mientras que no alcanzaron ese porcentaje cuando la incubación se realizó a 4 y 10 °C. Este hallazgo indicaría que, a baja temperatura, la actividad maloláctica de estos aislamientos psicrotolerantes, requiere de un mayor tiempo de aclimatación de los cultivos previo a su inoculación en vino, o un mayor tiempo de incubación del vino para lograr consumir la totalidad del ácido L-málico. El aislamiento UNQC19, que presentó los mejores valores de viabilidad a 4 y 10 °C, también mostró los mayores porcentajes de consumo de ácido L-málico. Los lactobacilos, por su parte, exhibieron valores de consumo de ácido L-málico similares a las tres temperaturas, revelando un comportamiento más homogéneo. En particular, UNQL3.1 y UNQL1.3 consumieron la totalidad del mismo a los 20 días de incubación a 4 y 21 °C. Sin embargo, estos mismos aislamientos no mostraron los mejores valores de viabilidad, sugiriendo que no existe una correlación directa entre viabilidad y consumo de ácido L-málico. Entre los cocos, UNQC1.1 mostró una buena combinación de viabilidad y consumo de ácido L-málico.

Respecto a la identificación de los aislamientos, las secuencias correspondientes a los lactobacilos mostraron una similitud de 95 a 98% con cepas de *Lactobacillus hilgardii* depositadas en el *GenBank*. Si bien se ha reportado la capacidad de cepas de *Lb. hilgardii* de consumir ácido L-málico (du Toit et al. 2010, Ruiz et al, 2011), esta especie no había sido detectada hasta el momento en vinos patagónicos. En estudios previos de diversidad y dinámica de poblaciones de BAL durante FML espontáneas de vinos tintos patagónicos (varietales Pinot noir y Merlot de diferentes cosechas), por métodos independientes de cultivo, se detectaron como especies predominantes a *O. oeni* y *Lb. plantarum* (Valdés La Hens et al. 2015). Similares resultados se encontraron aplicando métodos dependientes de cultivo (Bravo-Ferrada et al. 2013, Valdés La Hens et al. 2015). En ambos casos pudieron identificarse otras especies de BAL, pero en ninguno de los vinos analizados se hallaron cepas de *Lb. hilgardii*. Por esta razón resultó sorprendente tanto el hallazgo de cepas psicrotolerantes de *Lb. hilgardii*, como la ausencia de aislamientos de *Lb. plantarum* y es probable que se deba al tipo de estrategia empleada en el aislamiento. A futuro será necesario diseñar nuevas estrategias de aislamiento de BAL psicrotolerantes con el propósito de recuperar cepas de *Lb. plantarum* psicrotolerantes, cuya presencia suponemos en vinos patagónicos. Pruebas preliminares con cepas patagónicas de *Lb. plantarum* de la colección de nuestro laboratorio, permitieron comprobar características de psicrotolerancia en las cepas UNQLp11 (Brizuela et al. 2017) y UNQLp155 (Bravo Ferrada et al. 2013).

Para los ensayos de vinificación a escala de laboratorio se seleccionaron las cepas UNQOe19 y UNQLh1.1, por presentar una buena combinación de viabilidad y de consumo de ácido L-málico a bajas temperaturas. Se las inoculó en vino Pinot noir no estéril, que se incubó a 4, 10 y 21 °C. El objetivo fue evaluar su capacidad de implantación en presencia del consorcio microbiano nativo del vino, así como su viabilidad y capacidad de consumo de ácido L-málico. En el vino control no inoculado se observó recuento bajo de las BAL nativas y no se registró consumo de ácido L-málico en los 20 días del ensayo. Sin embargo, en los vinos inoculados con las cepas seleccionadas, se observó buen consumo de ácido L-málico tanto a 4 como a 10 °C, sugiriendo que estas cepas se habrían implantado en el vino no estéril. Para demostrar esta implantación, se obtuvieron perfiles RAPD-PCR con el *primer* M13, a partir de 10 colonias seleccionadas al azar. El análisis de estos perfiles permitió constatar la implantación exitosa en el vino de las cepas seleccionadas, a todas las temperaturas ensayadas.

Si bien algunas de las empresas internacionales productoras de cultivos iniciadores malolácticos, tales como Lallemand, ofrecen *starters* compuestos por cepas de *O. oeni* que toleran temperaturas de vinificación en el rango de 13 a 24 °C (cultivo *Laivin 31*), la tendencia actual en enología es el empleo de cultivos malolácticos autóctonos de la región vitivinícola, que aseguren que el proceso sea exitoso por una mejor implantación y que a su vez resalten las características territoriales del vino. En este sentido, los aportes del presente trabajo constituyen una primera etapa para la formulación de iniciadores malolácticos nativos patagónicos con capacidad de funcionar a diferentes temperaturas ambientales.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por subsidios de la Universidad Nacional de Quilmes (Programa Microbiología Molecular Básica y Aplicada 2015-2019), de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA), de la ANPCyT (PICT SU 2012 N° 2804) y del CIN – CONICET (PDTs 2015 N° 173). Las Dras. Semorile y Valdés La Hens pertenecen a la Carrera de Investigador Científico y Tecnológico de la CIC-BA; las Dras. Tymczyszyn, Bravo Ferrada y Olguín pertenecen a la CICyT – CONICET y la Lic. Manera es Becaria Doctoral 2017 de la CIC-BA.

## Bibliografía

- Apostol, B.L., Black, W.C., Miller, B.R., Reiter, P. and Beaty, B.J. (1993) Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theoretical and Applied Genetics* **86**, 991–1000.
- Bae, S., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 712–727.
- Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Delfederico L, Valdés La Hens D, Caballero A, Semorile L (2013) Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1537-1549
- Bravo-Ferrada, B.M., Gonçalves, S., Semorile, L., Santos, N.C., Tymczyszyn, E.E. & Hollmann, A. (2015). Study of surface damage on cell envelope assessed by AFM and flow cytometry of *Lactobacillus plantarum* exposed to ethanol and dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 1409–1417.
- Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Brizuela N, Valdés La Hens D, Tymczyszyn EE, Semorile L (2016) Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiol* DOI 10.1007/s12223-016-0446-y
- Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F., & Guzzo, J. (2004) Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni clpP-clpL* locus expression in response to stress. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2200–2205
- Brizuela NS, Bárbara M. Bravo-Ferrada, D. L, Hollmann A, Delfederico L, Caballero A, Tymczyszyn E.E, Semorile L. Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT-Food Science and Technology*, 2017 April, **77**: 348-355. ISSN 0023-6438

Caspritz, G. and Radler, F. (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties and distribution among bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 4907–4910.

Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiol* DOI 10.1007/s12223-016-0446-y.

De Man, J.D., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 130–135.

Delfederico L, Hollmann A, Martínez M, Iglesias NG, De Antoni G, Semorile L (2006) Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J Dairy Res* 73:20–27

du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S (2012) *Lactobacillus*: The Next Generation of Malolactic Fermentation starter cultures. *Food Bioprocess Technol*, **4**:876-906

González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Tenorio, C. and López-Alfaro, I. (2012) Dynamics of indigenous lactic acid bacteria populations in wine fermentations from La Rioja (Spain) during three vintages. *Environmental Microbiology* **63**, 12–19.

Henick-Kling T (1993) Malolactic fermentation. *Wine microbiology and biotechnology. Fleet GH (ed). 1st. Edition.*

Liu, S.Q. (2002) Malolactic fermentation in wine beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 598–601.

López I, López R, Santamaría P, Torres C, Ruiz-Larrea F (2008) Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wine. *Vitis* **47**:123-129

Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2011) Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S Afr J Enol Vitic* 32:280-295

Miller BJ, Franz CM, Cho GS, du Toit M (2011) Expression of the malolactic enzyme gene (*mle*) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions. *Curr Microbiol* **62**:1682-1688

Maicas, S., Gil, J.V., Pardo, I. and Ferrer, S. (1999) Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* **32**, 491–496.

Maicas, S., Pardo, I. & Ferrer, S. (2000). The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 75-79.

Pozo-Bayón, M.A., G-Alegría, E., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P.J., Calvo De La Banda, M.T., & Moreno-Arribas, M.V. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8729-8735.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. y Lonvaud, A. (2003) *Microbiologia del vino. Vinificaciones*. En: *Tratado de Enología I*. Ed. Hemisferio Sur, Paris. p. 161-155.

Reguant, C., Carrete, R., Ferrer, N., & Bordons, A. (2005) Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 451–459.



Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Llanos Palop M (2010) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1555-1562.

Stendid J, Karlsson JO, Hogberg N (1994) Intraspecific genetic variation in *Heterobasidium mannosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol Res* 98:57–63

van de Gutche M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, et al. (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9274-9279

Vigentini I, Picozzi C, Tirelli A, Giugni A, Foschino R, (2009) Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *International Journal of Food Microbiology* 136: 123-128