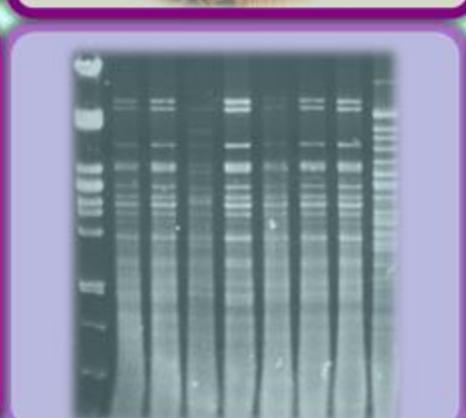


Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Saccharomyces uvarum de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia. Caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología
MSc. Gonzalez Flores Melisa

Director
Dr. Lopes Christian A.
Co-Directora
Dra. Rodriguez M. Eugenia
2019



Trabajo de posgrado titulado

***Saccharomyces uvarum* de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia. Caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas**



MSc. Gonzalez Flores Melisa



Dr. Lopes Christian Ariel



Dra. Rodriguez María Eugenia

Agradecimientos

Han pasado largos y hermosos cinco años desde que comencé con este trabajo, en el trayecto, hubo muchas personas que estuvieron conmigo. Por lo que hoy quiero agradecerles particularmente.

- A mis directores Chris y Euge, por haber confiado en mí, por sus enseñanzas y por haber impulsado en mí el encanto por la investigación. En estos años han fomentado siempre el crecimiento académico de los tesisistas, así como y el desarrollo de un grupo solidario, comprensivo y altruista.
- A mi familia por bancarme una carrera más y por acompañarme en todo. A mi princesa Ame quien nació en el principio de este trabajo y es mi motorcito para seguir adelante. A mi compañero de vida Lu por ponerse la familia al hombro varias veces para que pueda terminar concluir esta etapa de mi vida.
- A mis compañeras de Laboratorio especialmente a Andre y a Viky que han luchado en la mesada con mis fallas y mis aciertos y han sabido estar presentes siempre con una opinión un consejo o un mate.
- A mi hermano Puchy, aunque estemos muy lejos siempre sabes que sos mi soporte y mi inspiración para crecer.
- A mi amigo el Dr. M. Caldez “*neri*”, sos un ejemplo de investigador y de persona a seguir. Que tu lucha por la igualdad de las mujeres en la ciencia, que tu lucha sea la lucha de todos.
- A Romi, Lucia y Ale por sus aportes experimentales que formaron parte de esta tesis.
- A los enólogos del centro de formación profesional N°2 del Chañar Fermin y Seba, por sus asesoramientos en todo lo que concierne a los procesos de industrialización de Sidras.
- A todo el personal del PROBIEN, compañeros doctorandos e investigadores y al Director del Instituto Dr. Germán Mazza.
- Al CONICET por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral siendo becada. A la Universidad Nacional del Comahue por brindarme su espacio para mi formación profesional.

- Al Laboratorio de la Dra. Querol Amparo, por sus aportes experimentales que formaron parte de este trabajo.
- A mis profesores de los cursos de posgrado realizados en el marco del Doctorado, gracias a ellos pude hacer varios de los análisis que presento en esta tesis.
- A los comensales que desinteresadamente han probado esta bebida y aportado a los ensayos de sensorial de las sidras producidas en esta tesis.

RESUMEN

Las levaduras responsables de la transformación del mosto de manzana en sidra pertenecen al género *Saccharomyces*, y en general a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, aun cuando ésta es la especie más abundante, otras levaduras de este género como *Saccharomyces uvarum* también han sido descritas en este proceso. *S. uvarum* presenta características únicas que incluyen un sistema activo de transporte de fructosa (azúcar mayoritario en el mosto de manzana), buena capacidad fermentativa y criotolerancia. Produce además menor cantidad de etanol y mayor de glicerol que *S. cerevisiae*, y un perfil de compuestos volátiles que influyen directamente en el aroma del producto como el alcohol superior 2-feniletanol y su respectivo éster de acetato.

La gran diversidad de cepas de *S. uvarum* que coexisten en la Patagonia, tanto en ambientes naturales como en bebidas tradicionales, ofrecen un escenario ideal para estudiar de manera comparada las características fisiológicas y genotípicas de las distintas cepas y su potencial como cultivos iniciadores para la elaboración de sidras con características particulares y con impronta 100% patagónica. El objetivo de esta Tesis fue evidenciar la presencia de *S. uvarum* en sidras fermentadas a baja temperatura en la Norpatagonia y comparar fisiológica y genéticamente las cepas disponibles de esta especie obtenidas de diferentes ambientes a fin de conocer sus principales diferencias asociadas a su origen y su potencialidad para ser usadas como cultivos iniciadores en la producción de sidras con características organolépticas diferenciales.

En el primer capítulo de esta Tesis se evaluó el comportamiento fermentativo y otras propiedades tecnológicas y fisiológicas de interés para la elaboración de sidras, de 21 cepas de *S. uvarum* aisladas de chicha de manzana y sustratos naturales de la Norpatagonia y 13 cepas de su especie hermana *S. eubayanus* aisladas de los mismos ambientes naturales. Se observó un comportamiento similar entre cepas de igual origen, es decir las sidras fermentadas con cepas aisladas de ambientes naturales de ambas especies (*S. uvarum* y *S. eubayanus*) presentaron características fisicoquímicas y cinéticas similares, diferenciándose de las fermentadas con cepas de *S. uvarum* aisladas de chichas. Se analizó posteriormente la producción de metabolitos secundarios asociados con el aroma de las sidras utilizando una cepa seleccionada de cada especie y origen. Nuevamente, los perfiles obtenidos con las cepas aisladas de ambientes naturales (*S. uvarum* NPCC1290 y *S. eubayanus* NPCC1292) fueron similares, destacándose ambas por producir altas concentraciones de 2-feniletanol, mientras que la cepa aislada de chicha (*S. uvarum* NPCC1314) produjo concentraciones más elevadas de ésteres en general. Se seleccionó la cepa *S. uvarum* NPCC1314 para realizar fermentaciones con mosto de manzana no estéril a escala semi-piloto, utilizando como comparación la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213, usada para elaborar sidras en la región. Las fermentaciones se realizaron a 20°C y a 13°C obteniendo mayor implantación de *S. uvarum* (66% vs 100%, respectivamente) a 13°C. La levadura comercial evaluada no se implantó en ninguna condición. El análisis sensorial mostró preferencia por la sidra fermentada con *S. uvarum* NPCC1314 a 20°C y por *S. cerevisiae* BO213 a 13°C.

En paralelo, se realizó la búsqueda de nuevas cepas de *S. uvarum* en sidras, utilizando baja temperatura (13°C) como agente selectivo. Se detectaron varias cepas de *S. uvarum*, sólo a 13°C y en mosto Red Delicious. Este hallazgo representa el primer reporte de aislamiento de cepas de esta especie en un proceso fermentativo industrial en Argentina. Con estas nuevas cepas se realizó la misma caracterización fisiológica realizada previamente y se seleccionó la cepa de *S. uvarum* NPCC1420 para realizar fermentaciones a 13°C, a escala semipiloto

utilizando mostos manzana (variedades Granny Smith y Pink Lady) y pera (Packams/D'Anjou). Se utilizó con fines comparativos en este caso, la cepa de chicha *S. uvarum* NPCC1314. Los mayores porcentajes de implantación en esta oportunidad se obtuvieron con la cepa de sidra *S. uvarum* NPCC1420; y el análisis sensorial mostró preferencia por las sidras fermentadas con esta levadura solo en mosto de manzana Pink Lady, mientras que en mosto Granny Smith las sidras preferidas fueron las fermentadas con la levadura aislada de chicha.

En el segundo capítulo de la Tesis se realizaron ensayos comparativos a nivel genético y fisiológico utilizando todas las cepas de *S. uvarum* aisladas en este trabajo (33) y además 28 cepas de la misma especie aisladas de diferentes países de Europa y sustratos. Utilizando datos de secuencia de siete genes nucleares el análisis de estructura poblacional evidenció por primera vez tres subpoblaciones en la Patagonia, hasta ahora sólo sugeridas pero no respaldadas por análisis poblacionales quizás por el bajo número de cepas de ambientes fermentativos disponibles hasta ahora: Sudamérica-A, Sudamérica-B y Holártica. La subpoblación Sudamérica-B, altamente diferenciada del resto y representada únicamente por cepas aisladas de ambientes naturales, comparte nicho con la subpoblación Sudamérica-A sin evidenciar flujo génico. Las cepas aisladas de sidra pertenecieron principalmente a la subpoblación Holártica y las de chicha resultaron una mezcla de Holárticas y Sudamérica-A. El análisis del gen mitocondrial *COX2* si evidenció cierto flujo génico entre las dos subpoblaciones de ambientes naturales.

A nivel fisiológico se evaluó la respuesta de todas las cepas a diferentes condiciones de estrés típicas del proceso de elaboración de sidras: crecimiento en diferentes temperaturas y crecimiento en diferentes concentraciones de etanol, de SO₂ y de nitrógeno fácilmente asimilable. Se observó que las cepas europeas presentaron una mejor adaptación a temperaturas bajas (a 13°C) en relación a las patagónicas (independientemente del origen). Las cepas aisladas de ambientes naturales (patagónicas y europeas) presentaron muy baja resistencia al etanol. Asimismo, las cepas aisladas de ambientes fermentativos europeas mostraron un mayor requerimiento de nitrógeno que las de ambientes naturales. Por último, las cepas fermentativas europeas y las cepas de sidra de la Patagonia mostraron la mayor resistencia al SO₂, mientras que las de ambientes naturales y chicha una muy baja resistencia. Se evidenció en las cepas resistentes una traslocación entre los cromosomas XVI y el VII (7 cepas europeas y 3 patagónicas, todas fermentativas) que involucra al gen del transportador de sulfito *SSUI* y en ensayos de expresión diferencial del gen *SSUI* en condiciones de fermentación se observó un incremento en su expresión mayor a 10 veces en las cepas europeas con la translocación respecto de las patagónicas en fermentaciones con y sin sulfito, pudiendo concluir que esta traslocación provoca la expresión constitutiva del gen, lo que le otorga una alta resistencia a las cepas que contienen la traslocación. Estos datos pusieron en evidencia diferencias fisiológicas entre cepas de *S. uvarum* que podrían relacionarse al proceso de elaboración de bebidas fermentadas. Las principales diferencias fisiológicas observadas no se asocian directamente con las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas sino que más bien responden al ambiente de origen de las cepas en particular.

SUMMARY

Yeasts responsible for the transformation of apple must into cider belong to *Saccharomyces* genus and, in general, to *Saccharomyces cerevisiae* specie. Nevertheless, although this is the most abundant specie other yeasts belonging to this genus, like *Saccharomyces uvarum*, have been also described in this fermentations process. *S. uvarum* shows unique features that includes an active transport system of fructose (major sugar in apple must), good fermentative capacity and cryotolerance. It also produces lower amount of ethanol and higher glycerol than *S. cerevisiae* and volatile compounds profiles that affects in a direct way the aroma of the product, like the higher alcohol 2-phenylethanol and its respective acetate ester.

The great diversity of *S. uvarum* strains that coexist in Patagonia, both in natural environment and in traditional beverages, offer an ideal scenario for studding, in a comparative way, physiological and genotypic features of the different strains and its potential as starter cultures for producing ciders with particular characteristics and with a 100% Patagonian imprint. The objective of this Thesis was to evidence the presence of *S. uvarum* in ciders fermented at low temperature in North Patagonia and to compare physiologically and genetically available strains of this specie obtained from different environment, in order to know its main differences associated to its origin and its potentiality for employ them as started cultures in the production of ciders with different organoleptic characteristics.

In the first chapter of this Thesis the fermentative behaviour and other technologic and physiologic properties of interest for cider elaboration were evaluated, of 21 *S. uvarum* strains isolated from apple chicha and natural substrates from North Patagonia and 13 strains of its sister species *S. eubayanus*, isolated from the same natural environment. A similar behaviour between strains from the same origin was observed, ciders fermented with strains isolated from natural environment of both species (*S. uvarum* and *S. eubayanus*) showed similar physiologic and kinetic characteristics, differentiating from fermented with *S. uvarum* strains isolated from chichi. After that, secondary metabolites production associated with ciders aroma using a selected strain from each species and origin was evaluated. Again, profiles obtained with the strains isolated from natural environment (*S. uvarum* NPCC1290 and *S. eubayanus* NPCC1292) were similar, both producing high concentrations of 2-phenylethanol, while the strain isolated from chicha (*S. uvarum* NPCC1314) produced higher concentrations of general esters. *S. uvarum* NPCC1314 strain was selected for performing fermentations with no sterile apple must in semi-pilot scale, using *S. cerevisiae* BO213 strain in a comparative manner, employed for cider producing in the region. Fermentations were carried out at 20°C and 13°C, obtaining higher implantation of *S. uvarum* (66% vs 100%, respectively) at 13°C. Commercial yeast evaluated couldn't dominate the fermentations in any condition. Sensorial analysis evidenced preference for cider fermented with *S. uvarum* NPCC1314 at 20°C and for *S. cerevisiae* BO1213 at 13°C.

In the same way, new strains research of *S. uvarum* in ciders was carried out, employing low temperature (13°C) as a selective agent. Many *S. uvarum* strains were detected, only at 13°C in Red Delicious must. This finding represents the first isolation report of strains belonging to this species from industrial fermentative process in Argentina. These new strains were used for making the same physiologic characterization previously studied and *S. uvarum* NPCC1420 strain was selected for fermentations at 13°C at semi-pilot scale using apple must (Granny Smith and Pink Lady varieties) and pear (Packams/D'Anjou). *S. uvarum* NPCC1314 strain from chicha was used in a comparative way. In this case, the highest

implantation percentages were obtained with the cider *S. uvarum* NPCC1420 strain and the sensorial analysis showed preference for ciders fermented with this yeast only in Pink Lady must, while in Granny Smith must preferred ciders were the ones fermented with the yeast isolated from chicha.

In the second chapter of this Thesis, comparative assays at genetic and physiological levels were tested employing all the *S. uvarum* strains isolated in this work (33) and also 28 strains belonging to the same species isolated from different European countries and substrates. Using seven nuclear genes sequence data, the population structure analysis evidenced, for the first time, three subpopulations in Patagonia, only suggested but not supported by population analysis until now, possibly due to the low number of fermentative environment strains available up to now: South America-A, South America-B and Holarctic. South America-B subpopulation, markedly different from the rest and represented only for strains isolated from natural environment, shares niche with the South America-A population without evidencing genic flow.

The cider's strains belonged mainly to the Holarctic subpopulation and the strains isolated from chicha were a mixture between the Holarctic and South America-A subpopulation. In the analysis of the mitochondrial *COX2* gene a certain gene flow between the two subpopulations of natural environments was observed.

At the physiological level, the response of all the strains to different stress conditions typical of the cider production process was evaluated: growth at different temperatures and growth at different concentrations of ethanol, SO₂ and yeast assimilable nitrogen. The European strains showed a better adaptation to low temperatures (at 13°C) in relation to the Patagonians strains (independently of the origin). Strains isolated from natural environments (Patagonia and Europe) showed a very low resistance to ethanol. Further, strains isolated from fermentative environments showed a higher nitrogen requirement than the strains from natural environments.

Finally, the European fermentative strains and the cider strains of Patagonia showed the highest resistance to SO₂, while those isolated from natural environments and chicha showed a very low resistance. A translocation between chromosomes XVI and VII (7 European and 3 Patagonian strains, all fermentative) was found, which involve the *SSUI* sulphite transporter gene and in differential expression assays of the *SSUI* gene under fermentation conditions, an increase in its expression greater than 10-fold was observed in the European strains with the translocation compared to the Patagonian ones in fermentations with and without sulphite, being able to conclude that this translocation causes the expression constitutive of the gene, which gives a high resistance to the strains that contain the translocation. These data revealed physiological differences between strains of *S. uvarum* that could be related to the process of industrial fermented beverages. The main physiological differences observed are not directly associated with the phylogenetic relationships existing between the strains but rather respond to the environment of origin of the strains in particular.

INDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	iii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. La sidra	2
1.1. Definición e historia	2
1.2. Producción y Consumo	4
1.3. Elaboración	6
1.3.1. Procesos Pre-fermentativos	7
1.3.1.1. Ingreso de la fruta	10
1.3.1.2. Obtención del jugo	10
1.3.1.3. Sulfitación del mosto	10
1.3.1.4. Clarificación	11
1.3.2. Procesos Fermentativos	11
1.3.3. Operaciones Post-fermentativas	12
2. Levaduras	13
2.1. Levaduras en procesos fermentativos	14
2.2. Fermentaciones naturales y conducidas	16
2.3. Las levaduras y su relación con las características organolépticas (<i>flavor</i>) de las sidras	18
2.4. Las levaduras y los factores de stress de vinificación	23
2.5. El género <i>Saccharomyces</i>	27
2.5.1. <i>Saccharomyces</i> : diversidad y ecología	28
HIPOTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
Objetivos específicos	32
CAPITULO I	33
Introducción	34
Materiales	36
1. Mostos	36
2. Levaduras	36
3. Medios de Cultivo	37
4. Soluciones utilizadas para las determinaciones fisicoquímicas y aromáticas	38
5. Reactivos utilizados en estudios moleculares	39
Métodos	40
1. Fermentaciones	40
. Fermentaciones a escala de laboratorio	40
Para evaluación de características de las levaduras	40
Para aislamiento de levaduras	41
1.2. Fermentaciones a escala semipiloto	41
1.2.1. Gasificación por segunda fermentación	41
1.2.2. Gasificación artificial	42
2. Parámetros fisicoquímicos en sidras	43
2.1. Azúcares y alcoholes	43
2.2. Dióxido de azufre libre y total	44
2.3. Sólidos solubles	44

2.4. pH	45
3. Determinación de compuestos aromáticos	45
3.1. Ácidos orgánicos	45
3.2. Esteres, Alcoholes Superiores, Acetaldehído, Terpenos, Fenoles volátiles y Metanol	45
4. Detección de actividades enzimáticas	46
4.1. Actividad proteasa	46
4.2. Actividad pectinasa	46
4.3. Actividad β -glicosidasa	46
5. Actividad antagonista	47
6. Criterios de selección de levaduras	47
7. Aislamiento e identificación de levaduras	48
7.1. Aislamiento	48
7.2. Identificación	48
7.2.1 Identificación de especies del género <i>Saccharomyces</i>	50
7.3. Caracterización molecular de cepas de las levaduras identificadas como <i>S. uvarum</i>	50
7.3.1. RAPD-PCR	51
7.3.2. mtDNA-RFLP	51
8. Índice de Biodiversidad	51
9. Métodos estadísticos	52
9.1. Cinéticas de fermentaciones	52
9.1.1. Microfermentaciones de 50 mL	52
9.1.2. Fermentaciones de 1 L y semipiloto.	53
9.2. Análisis de datos fisicoquímico	54
10. Análisis sensorial de las sidras	55
Parte I	56
Resultados Parte I	57
1. Caracterización fisiológica de cepas de <i>S. uvarum</i> y <i>S. eubayanus</i>	57
1.1. Aptitud fermentativa en mosto de manzana	57
1.2. Actividad enzimática y antagonista	58
1.3. Fermentaciones a escala de 1 L	61
1.3.1. Cinética de fermentaciones	62
1.3.2. Propiedades Fisicoquímicas y Aromáticas de las Sidras	64
1.4. Fermentaciones a escala semipiloto	69
1.4.1. Cinética de fermentación	70
1.4.2. Implantación de las cepas inoculadas	70
1.4.3. Propiedades fisicoquímicas y perfil aromático de las sidras base	71
1.4.4. Análisis sensorial de las sidras	74
1.5. Fermentaciones a escala semipiloto realizadas a 13°C	76
Discusión Parte I	85
Parte II	102
Resultados Parte II	103
1. Biodiversidad y propiedades cinéticas y fisicoquímicas en Sidras de la Patagonia	103
1.1. Cinética de fermentación	103
1.2. Propiedades fisicoquímicas de las sidras base	105
1.3. Aislamiento de levaduras autóctonas en Sidra	106

1.3.1. Diversidad de especies aisladas en Sidras	106
1.3.2. Caracterización intraespecífica de <i>S. uvarum</i>	108
1.4. Microfermentaciones (35mL) de nuevas cepas de <i>S. uvarum</i>	110
1.5. Actividad enzimática y antagonista	112
1.6. Fermentaciones a escala Semipiloto	115
1.6.1. Selección de cepa	115
1.6.2. Cinética de fermentación	115
1.6.3. Implantación de cepas en escala piloto	117
1.4.3. Propiedades fisicoquímicas y perfil aromático de las sidras	120
1.4.4. Análisis sensorial de las sidras	127
Discusión Parte II	129
CAPITULO II	142
Introducción	143
Materiales	144
1. Mosto	144
2. Levaduras	144
3. Medios de Cultivo	144
3.1. Medios de cultivo generales	144
3.2. Medios de cultivo para ensayos de estrés y competencias	144
4. Reactivos utilizados en estudios moleculares	145
4.1. Soluciones	145
4.2. Enzimas y reactivos	146
Métodos	147
1. Análisis Evolutivos de <i>S. uvarum</i>	147
1.1. Análisis Filogeográfico	147
1.2. Análisis Filogenéticos	148
1.2.1. Árboles filogenéticos	148
1.2.2. Estructura poblacional	149
2. Ensayo de tolerancia a factores de estrés	149
2.1. Preparación del inóculo	150
2.2. Crecimiento en microplacas de 96 pocillos	150
2.3. Ensayo de crecimiento celular a diferentes concentraciones de SO ₂ en placas	150
2.4. Cinéticas de crecimiento	151
2.5. Análisis estadísticos de agrupamiento	151
2.5.1. Gráficos de calor (<i>Heatmaps</i>)	151
2.5.2. UPGMA	151
3. Competencias entre cepas de <i>Saccharomyces uvarum</i>	152
4. Traslocación del Cromosoma XVI por VII	152
5. Expresión génica del gen <i>SSUI</i> por PCR-RT	153
Parte I	154
Resultados Parte I	155
1. Análisis evolutivo de <i>Saccharomyces uvarum</i>	155
1.1. Filogeografía de cepas de <i>Saccharomyces uvarum</i> patagónicas	155
1.2. Análisis filogenético global de <i>Saccharomyces uvarum</i>	158
1.3. Estructura poblacional de <i>Saccharomyces uvarum</i>	160
1.4. Índices evolutivos	162
1.4. Evolución mitocondrial en <i>Saccharomyces uvarum</i>	164

Discusión Parte I	167
Parte II	181
Resultados Parte II	182
2. Análisis fisiológico comparado de cepas de <i>Saccharomyces uvarum</i>	182
2.1. Respuesta de las levaduras a la disponibilidad de nitrógeno fácilmente asimilable (FAN)	182
2.1.1. Ensayos en microplacas	
2.1.2. Ensayos de competencia	188
2.2. Respuesta de las levaduras a la temperatura	189
2.2.1. Ensayos en microplacas	189
2.2.1. Ensayos de competencia	191
2.3. Respuesta de las levaduras al etanol	194
2.3.1. Ensayos en microplacas	194
2.3.2. Ensayos de competencias	198
2.4. Respuesta de levaduras al SO ₂	198
2.4.1. Ensayos en placa	198
2.4.2. Ensayos de competencia	201
2.4.3. Análisis genómico	201
2.4.4. Ensayos de expresión del gen <i>SSU1</i>	206
Discusión Parte II	207
CONCLUSIONES	221
BIBLIOGRAFÍA	225
PAPER RESPALDO	256

Introducción

1. LA SIDRA

1.1. Definición e historia

La sidra es la bebida alcohólica que resulta de la fermentación del jugo de manzana obtenido a partir de la molienda y prensado de estas frutas sanas y limpias. Esta bebida típicamente europea, comenzó a elaborarse hace aproximadamente 2000 años (Durieux et al., 2005).

A lo largo de la historia del hombre numerosos documentos nombran a los pomares (plantaciones de manzanos) y el consumo de bebidas preparadas a partir del jugo de manzana. Esta práctica fue muy popular entre la población celta, y también se ha descrito durante la invasión romana a Inglaterra (Durieux et al., 2005). En regiones templadas de Europa como la Normandía y la Britania francesa como la zona de Asturias en España, la explotación del manzano, la elaboración y el consumo de sidra datan de los siglos VIII y IX (Edad Media). Luego de la invención de la prensa, durante los siglos XII y XIII, ambas actividades productivas se transformaron en la mayor riqueza de estas regiones consolidándose finalmente durante el siglo XIX. Durante este tiempo, se lograron resolver dificultades técnicas que entrañaba la sidra natural, particularmente relacionados a su estabilización microbiológica, lo que permitió diversificar la producción y así ampliar horizontes hacia la elaboración de otros productos como vinagre de manzana, coñac y espumante de manzana (Durieux et al., 2005).

La sidra se mantuvo como una bebida popular en EE.UU. y Nueva Inglaterra hasta la Guerra Civil (1936-1939), donde la cerveza comenzó a tomar su lugar en el mercado americano debido a la influencia de inmigrantes alemanes en los EE.UU. En las últimas décadas del siglo XX, la sidra volvió a reinstalarse en el mercado americano (EEUU) y europeo gracias a las mejoras tecnológicas que repercutieron en mejoras en la calidad del producto, nuevas estrategias de marketing y a la cultura alimenticia de los comensales (Rowles, 2000).

La producción de sidra en Argentina estuvo directamente ligado a la introducción de cultivares de manzana durante la colonización (Siglo XV y XVI). Particularmente en la Patagonia, gracias a la llegada de inmigrantes principalmente italianos y españoles la producción de frutas de pepita se volvió una de las principales actividades agrícolas, y de la mano de ésta, surgieron los mercados para la fruta comestible, producción de jugos, frutas secas, y sidra. Las variedades de manzana que se utilizan en nuestro país para la elaboración de esta bebida no son cultivares seleccionados para sidra como sucede en Asturias u otros países del mundo. Al contrario, las variedades de manzana utilizadas en

nuestra región son principalmente variedades comestibles, y en la mayoría de los casos, se utilizan manzanas de descarte (manzanas que no pueden ser ingresadas en el mercado de fruta fresca) y/o manzanas fuera de estación o con algún defecto visual. Sin embargo, en los últimos años la existencia de demandas concretas por parte de los productores junto al interés de algunos fruticultores en diversificar y agregar valor a la manzana, ha llevado a estos últimos a destinar parcelas exclusivamente para el cultivo de frutas de calidad para la elaboración de sidras (Calvo et al., 2010).

El Código Alimentario Argentino (CAA, Ley 18.284 – 18/07/09 – Decreto 2126/7. Reglamentario de la Ley 18284) en su artículo 1085 del Capítulo XIII – (Bebidas fermentadas) define a la sidra base como “la bebida que resulta exclusivamente de la fermentación alcohólica normal del jugo recién obtenido de manzanas sanas y limpias de uso industrial, con o sin la adición de hasta un 10 % de jugo de pera obtenido en idénticas condiciones que el jugo de manzana y fermentado en forma conjunta o separada”, y a la sidra como “la sidra base, endulzada y gasificada” (Artículo 1085 bis). Las graduaciones alcohólicas mínimas permitidas por el código para la sidra base y la sidra son $4,5 \pm 0,3$ % v/v y $4,0 \pm 0,3$ % v/v a 20 °C, respectivamente.

En general, la bebida presenta un color amarillo dorado intenso, con tonalidades verdosas; su aspecto es límpido, brillante y luminoso denotándose la presencia de finas burbujas y buena densidad en copa. Desde el punto de vista aromático denota una nariz limpia y franca de intensidad media, con aroma de manzana, notas cítricas de lima y pomelo y presencia de aromas secundarios propios de la fermentación (Chandon, 2003). Más allá de esta descripción general, las cualidades de la sidra se encuentran íntimamente ligadas a las características y calidad de la materia prima, a las prácticas involucradas en el proceso de elaboración y a las características de la biota microbiana asociada a los procesos fermentativos (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010; Johansen, 2000).

Además de la sidra, en la patagónica existe otra bebida muy popular realizada con este fruto denominada “chicha de manzana”. Esta es una bebida tradicional elaborada por las comunidades originarias de la Patagonia tanto de Chile como de Argentina. La chicha era una bebida que típicamente se realizaba con el maíz, pero con la llegada de los españoles y junto con ellos las manzanas, los mapuches incorporaron este fruto en sus prácticas culturales y comenzaron a elaborar chicha de manzana (Pardo y Pizarro 2005). En la actualidad es una bebida que se realiza únicamente en zonas rurales y con manzanos “asilvestrados”, es decir, manzanos que fueron dispersados por los mismos mapuches en

sus caminos y que a través del tiempo se han diferenciado de las variedades domesticadas o confinadas al consumo (Calvo et al., 2010).

1.2. Producción y Consumo

El Reino Unido, en particular el sudeste de Inglaterra con una producción de 60 millones de Litros anuales, tiene la mayor producción de sidra *per capita* (Johansen, 2000; Rowles, 2000; Becerra 2016). Le siguen en importancia en cuanto a la producción de sidra anual Francia, España y Estados Unidos. En cuanto al consumo Estado Unidos es el principal consumidor con cifras que van desde los 60 millones de Litros anuales y le siguen Francia, España (principalmente la zona de Asturias) y Reino Unido (Becerra 2016).

En todos ellos la sidra constituye no sólo una bebida tradicional y popular sino también el centro de una actividad turística de gran relevancia para las economías regionales (Perez-Mendez 2012).

La Argentina se ubica entre los 10 principales productores a nivel mundial, detrás de Canadá, Alemania y Finlandia (Becerra 2016). En Argentina, la elaboración de sidra está estrechamente ligada a la producción de frutas de pepita (manzanas y peras), actividad productiva que se concentra principalmente en las regiones Norpatagónica (provincia de Río Negro) y Cuyana (provincias de Mendoza y San Juan). Existen en el país 15 empresas elaboradoras de sidra a gran escala de las cuales siete plantas industriales se encuentran en Mendoza, siete en Río Negro y una en San Juan. De estas 15 empresas, cuatro producen el 75 % de la sidra nacional y 3 de ellas están localizadas en la región Norpatagónica (Fuente web: Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2012). En la Figura 1 se muestra la localización de las principales sidreras de la Argentina.

Históricamente, el destino de la producción de manzanas registra la siguiente distribución: 35% consumo en fresco, 17% exportación y 48% industria. Por su parte, la industria destina el 83% del volumen que procesa a jugo concentrado, 5% a manzana deshidratada (y otros productos derivados de la molienda) y 12 % a la elaboración de sidra. La cantidad de manzanas destinada a la elaboración nacional de sidras se estima en 40 millones de Litros (Fuente web: Secretaría de Fruticultura de Río Negro, Alimentos Argentinos, 2010).

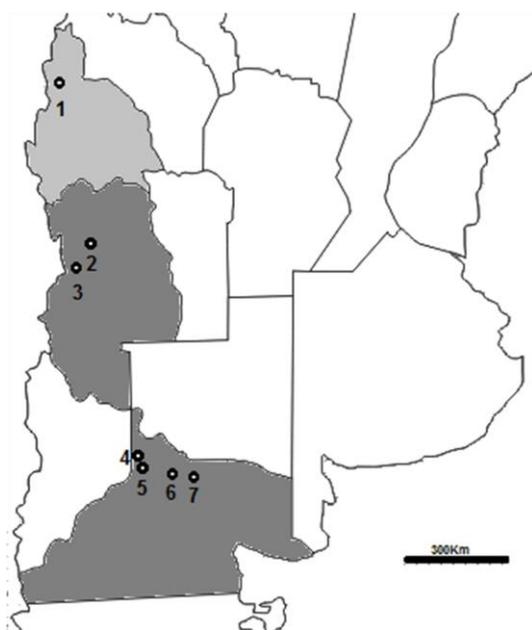


Figura 1: Localización de las principales sidreras de la Argentina. San Juan: 1: Zona de Calingasta. Mendoza: 2: Vista Flores. 3: Valle de Uco. Río Negro: 4: Cipolletti. 5: Allen. 6: General Roca. 7: Villa Regina.

No existen datos actualizados, sin embargo, considerando la estimación de la producción nacional, se observa que el consumo *per capita* no podría superar el litro por habitante por año. Este nivel de consumo se mantiene constante desde los últimos años (2000-2010), incluso con tendencia declinante pese a la progresiva disminución del precio del producto según datos publicados por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. El consumo *per capita* en el año 2010 fue de 0,84 litros. Sin embargo, en el año 2012 la producción de sidra, alcanzó los 80 millones de litros al año, lo que evidencia un consumo de casi 2 L por persona al año (Fuente web: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2012) con una marcada estacionalidad del consumo de la sidra, ya que el 80% del mismo se encuentra concentrado en los meses que van entre octubre y diciembre, con un mayor consumo durante las fiestas de fin de año. De tal forma, el consumo de sidra se encuentra prácticamente limitado a una época del año específica, pasando a ser un producto temporal y con fuertes competidores en el mercado de las bebidas alcohólicas.

A nivel nacional y regional el sector productivo ya ha iniciado acciones con el objetivo de reposicionar a la sidra como bebida saludable, natural y sabrosa, elaborada a base de manzanas seleccionadas, apuntando a desestacionalizar su consumo y convertirla nuevamente en la bebida más popular para las fiestas. Cabe destacar, que casi la totalidad de lo que compran los argentinos es producido dentro de su propia frontera. Las

importaciones son prácticamente nulas, llegando en años excepcionales como 2011 a 200 mil litros (Fuente web: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca).

En los últimos cinco años la sidra ha comenzado a resurgir en todo el País y particularmente en nuestra región debido a la disponibilidad de materia prima de alta calidad. Ya es tendencia la producción de sidras artesanales, con el aumento de pequeños productores que apuestan a reinventar el mercado con productos de altas calidad, realizados con manzanas seleccionadas (sidras varietales), sidras de pera, sidras champagnizadas y sidra tirada que se comenzó a comercializar en bares y vinotecas de todo el País (Fuente web: Diario Río Negro 01/11/2017; Clarín 01/04/2017; El Cronista 21/12/2016).

1.3. Elaboración

Debido a su alto contenido en ácido málico, el jugo de manzana es un líquido muy cáustico y como consecuencia el equipamiento utilizado en las sidreras sólo puede estar construido con ciertos tipos de materiales capaces de resistir a la corrosión. Esto motivó que durante muchos años se utilizara la madera para el proceso de prensado, fermentación y almacenamiento. Aunque en algunos países como Irlanda y España todavía se sigue utilizando este tipo de equipamiento (Morrissey et al., 2004), en la actualidad los materiales más utilizados para su construcción son acero inoxidable, plásticos, fibra de vidrio y/o resinas epoxy.

A continuación, se describen brevemente los procesos que involucran la elaboración de la sidra agrupados en procesos pre-fermentativos, fermentativos y post-fermentativos y que, a su vez, se encuentran representados en la Figura 2.

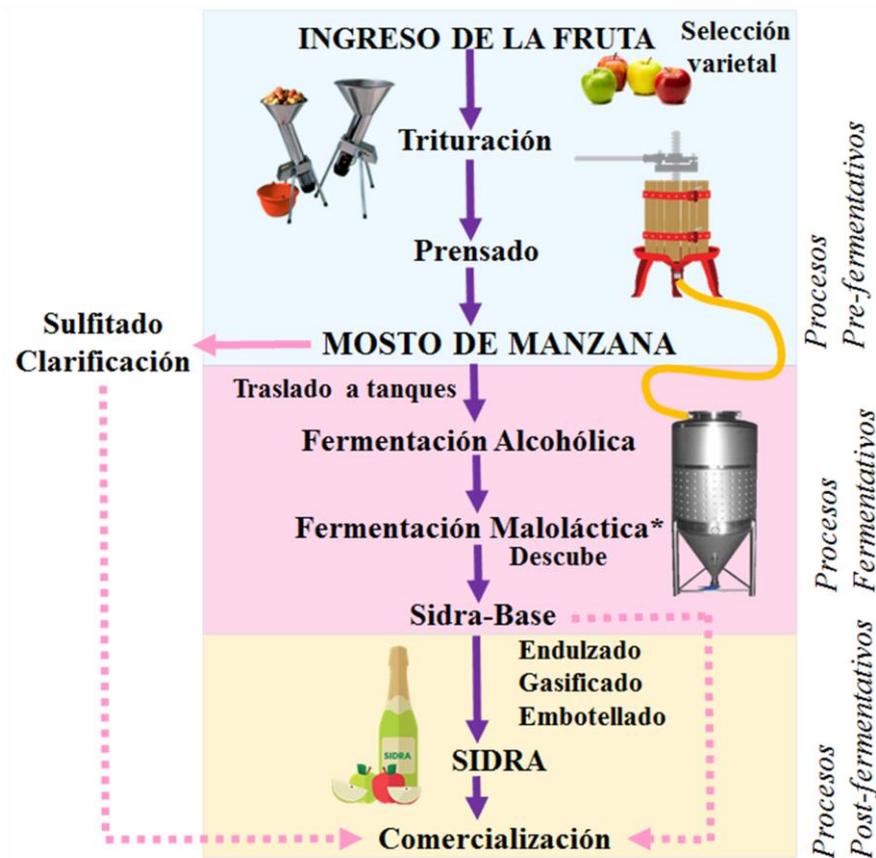


Figura 2: Resumen esquemático del proceso de producción de sidra, desde el ingreso de la fruta hasta su comercialización. *Pasos opcionales del proceso

1.3.1. Procesos Pre-fermentativos

La etapa pre-fermentativa comienza con la recolección de la manzana continúa con la extracción del mosto y finaliza con la clarificación (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). En cuanto a la manzana destinada a la elaboración de sidra, los principales países productores de esta bebida como España, Francia y EE.UU. utilizan variedades específicas que se clasifican en tipos o bloques tecnológicos relacionados con su contenido de azúcares (hasta el 15% m/v), su acidez (0,1-1% de ácido málico), su estructura fibrosa y los contenidos de polifenoles (taninos) (Lea, 1995). En particular, las manzanas para sidra presentan mayor proporción de polifenoles que las destinadas a consumo en fresco o de mesa; su concentración varía entre 0,1 y 5 g/Kg de peso fresco, aunque han sido detectadas concentraciones por encima de 10 g/Kg. El agrupamiento en bloques tecnológicos es muy útil para realizar por ejemplo una adecuada mezcla de materia prima durante el proceso de elaboración de la sidra Figura 2.

Aunque intervienen los diferentes parámetros antes mencionados, los grupos tecnológicos se establecen particularmente en función de la cantidad presente en el fruto de dos grupos de moléculas que contribuyen al *flavour* (aroma y sabor) de la manzana: los ácidos y los polifenoles. Así, por ejemplo, una variedad ácida se caracteriza por presentar una proporción elevada de ácidos orgánicos y bajo contenido de taninos; una variedad amarga se caracteriza por tener una concentración baja de ácidos y muy elevada de polifenoles y una variedad dulce por tener una baja cantidad de ácidos y polifenoles. Como se deduce de la definición del bloque dulce, una variedad perteneciente a este grupo, no tiene por qué tener mayor cantidad de azúcares que una ácida o una amarga, ya que la pertenencia a él no está en función del nivel de azúcares que presente el fruto. Además de estos tres bloques tecnológicos principales, se pueden encontrar otros con características intermedias (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). En la Tabla 1 se muestran los valores de la concentración de ácidos totales (expresados como ácido sulfúrico) y taninos (expresados como ácido tánico) que determinan los diferentes grupos tecnológicos, junto con las principales variedades de manzanas cultivadas en Argentina. Aunque en las zonas productivas de nuestro país se cultivan variedades pertenecientes a todos los bloques tecnológicos, la mayor producción de sidras se realiza con manzanas de segunda calidad, provienen del descarte de aquellas que no cumplen con los estándares de calidad para su consumo en fresco en el mercado internacional. Esto, a su vez, provoca que los mostos se realicen con mezclas de varios tipos de manzana, lo cual influye en una disminución de la calidad del producto final.

Tabla 1: Clasificación de las variedades de manzana destinada a la elaboración de sidras, en función del contenido en ácidos y taninos en la Argentina

Bloque tecnológico	Acidez (H₂SO₄ g/L)	Taninos (ácido tánico g/L)	Variedades de manzana
Amargo	≤3,29	≥2,00	Johnn Apple, Royal Wilding
Ácido	≥4,8	≤1,45	Granny Smith, Calville Blanc, Belle de Boskoop, Lakely
Dulce	≤3,29	≤1,45	Fuji, Red Delicious, Royal Gala
Dulce-Amargo	≤3,29	(1,45-2)	Catshead
Ácido-amargo	≥4,8	(1,45-2)	Byfor Wonder, Carlisle Codling
Acidulado	(3,29-4,8)	≤1,45	Royal Golden, Pink Lady

Datos proporcionados por la EEA INTA-Alto Valle, Río Negro (Argentina).

La manzana contiene además numerosos compuestos que son metabolizados por microorganismos, o transformados químicamente durante el proceso de elaboración de las sidras. Los principales compuestos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición química de la manzana (*Malus domestica*).

Nutrientes	% m/m	Nutrientes	% m/m
Azúcares		Xantofilas	
Azúcares totales (g)	10,39	Epigalocatequina (mg)	0,3
Sacarosa (g)	2,07	Flavonoles	
Glucosa (g)	2,43	Epicatequina (mg)	7,5
Fructosa (g)	5,9	Epigalocatequina-3-galate (mg)	0,2
Minerales		Luteolina (mg)	0,1
Calcio (mg)	6	Kaenferol (mg)	0,1
Hierro (mg)	0,12	Quercetina (mg)	4
Magnesio (mg)	5	Catequina (mg)	1,3
Fosforo (mg)	11	Ácidos orgánicos	
Potasio (mg)	107	Ácido málico (g)	0,3-1
Sodio (mg)	1	Ácido cítrico (mg)	5
Zinc (mg)	0,004	Ácido isocítrico (mg)	5
Cobre (mg)	0,027	Ácido succínico (mg)	1
Manganeso (mg)	0,035	Ácido fumárico (mg)	2
Flúor (µg)	3,3	Ácido quínico (mg)	1
Vitaminas		Ácido shikímico (mg)	1
Ácido ascórbico (Vit C) (mg)	4,6	Aminoácidos	
Tiamina (mg)	0,017	Triptófano (g)	0,001
Riboflavina (Vit B2) (mg)	0,026	Treonina (g)	0,006
Niacina (Vit B3) (mg)	0,091	Isoleucina (g)	0,006
Ácido pantoténico (B5) (mg)	0,061	Leucina (g)	0,013
Vitamina B6(mg)	0,041	Lisina (g)	0,012
Folato total (µg)	3	Metionina (g)	0,001
Folato (en comidas) (µg)	3	Cisteína (g)	0,001
Folato DFE (µg)	3	Fenilalanina (g)	0,006
Betaína (µg)	0,1	Tirosina (g)	0,001
Vitamina A (µg)	3	Valina (g)	0,012
Betacaroteno(µg)	27	Arginina (g)	0,006
Betacriptoxantina (µg)	11	Histidina (g)	0,005
Luteína + Zeoxantina (µg)	29	Alanina (g)	0,011
Vitamina E (mg)	0,18	Ácido aspártico (g)	0,07
Vitamina K (µg)	2,2	Ácido glutámico (g)	0,025
Ácidos Grasos		Glicina (g)	0,009
Fitoesteroles (mg)	12	Prolina (g)	0,006
Flavonoles		Serina (g)	0,01
Cianidina (mg)	1,6	Agua (g)	85,56

Datos tomados del servicio de cromatografía para los alimentos USDA 2010

Los azúcares derivan de la fotosíntesis, mientras que los ácidos orgánicos son generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Si bien el ácido málico es el principal ácido orgánico presente en la manzana existen en menores proporciones otros ácidos como el ácido cítrico, isocítrico, succínico, fumárico, quínico y shikímico (Eisele y Drake, 2005). La concentración de málico es muy variable y depende fundamentalmente de la

variedad, la madurez y las condiciones climáticas durante el almacenamiento del fruto (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010).

Con respecto a fracción nitrogenada constituida por aminoácidos, el 50% aprox. del total de la fracción aminoacídica está constituida por los ácidos aspártico y glutámico (Tabla 2) (Blanco et al., 1990; Ackermann et al., 1992). Las proporciones de todos estos compuestos varían con la variedad de manzana a utilizar y, por consiguiente, también varía el producto final elaborado, la sidra.

1.3.1.1. Ingreso de la fruta

Las manzanas que ingresan a las sidreras son volcadas en los lagares (piletas destinadas al almacenamiento de las manzanas en las condiciones de ingreso) desde donde, mediante corriente de agua potable y por flotación, son transportadas hasta las trituradoras. Este transporte implica el lavado indirecto de la fruta (Figura 2).

1.3.1.2. Obtención del jugo

Trituración. Existen diferentes tipos, algunas son mecánicas donde la fruta es elevada hasta las tolvas mediante cintas transportadoras, la fruta cae y mediante golpe y compresión sobre una lámina metálica cribada es triturada, obteniéndose la pulpa. Otras más modernas son contienen un sistema de cuchillas y las frutas son volcados a una especie de cono, la pulpa cae por un sistema de bombas (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010).

Prensado. Las prensas pueden ser hidráulicas o de cintas. En estas últimas, de proceso continuo, la pulpa ingresa a un sistema de cintas de doble malla sintética montado sobre una plataforma horizontal y a medida que avanza entre las cintas es sometida a presiones crecientes ejercidas por una serie de rodillos dispuestos por encima y por debajo de las mismas en una extensión de aproximadamente 4 metros. El jugo turbio de primera extracción o mosto, escurre y se recoge en una bandeja de acero inoxidable que se encuentra en la parte inferior (Barbagelata 2010).

El jugo que sale de las prensas es conducido hacia un sistema de cañerías que lo transportará hasta las piletas de fermentación (Figura 2).

1.3.1.3. Sulfitación del mosto

El SO₂ (anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre) es uno de los compuestos más antiguos usados en la industria de elaboración de alimentos y bebidas por sus propiedades

antioxidantes y antimicrobianas (du Toit y Pretorius, 2000). El acondicionamiento del mosto para dar inicio al proceso fermentativo involucra la adición de SO₂, práctica conocida como sulfitación. Una elevada concentración de dióxido de azufre puede comprometer el aroma y el sabor del producto final (Pretorius y Hoj, 2005) debido a una excesiva formación de sulfuro de hidrógeno y mercaptanos (Jiranek, 2003), así como también provocar efectos indeseables sobre la salud de ciertos consumidores (du Toit y Pretorius, 2000), por lo que el agregado de SO₂ en cualquiera de sus formas debe garantizar la protección del mosto sin caer en excesos perjudiciales. Se estima que son necesarias concentraciones del orden de 100 mg/L de SO₂ molecular para evitar cualquier actividad fermentativa (Cabranes et al., 1990). El código alimentario de Argentina establece que las sidras no deben superar los 20mg/L de SO₂ molecular al momento de ser ingeridas (Fuente web: ANMAT, 2012)

1.3.1.4. Clarificación

Como paso previo al desarrollo del proceso fermentativo puede ser necesaria la realización de una clarificación del mosto, en el caso de que éste presente una elevada turbidez. El tipo de clarificación más comúnmente usado es la clarificación enzimática con pectinasas que provocan que las partículas en suspensión puedan flocular (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010).

1.3.2. Procesos Fermentativos

Efectuada la etapa de ajuste del SO₂ y la clarificación (optativa), el mosto es transportado a la pileta o el fermentador donde definitivamente se dará inicio a la fermentación primaria o alcohólica, llevada a cabo por las levaduras. El inicio y la velocidad de la fermentación se encuentran en relación directa con las condiciones de aireación y de temperatura que se establecen al inicio del proceso, así como también con la adición (fermentaciones conducidas) o no (fermentaciones espontáneas o naturales) de cultivos iniciadores constituidos por cepas de levaduras seleccionadas.

Respecto de la temperatura de fermentación, aspecto de relevancia para este trabajo, las fermentaciones naturales raramente progresan por debajo de los 10°C, entre 10°C y 30°C su velocidad crece linealmente con el aumento de la temperatura y entre 35°C y 40°C ésta se convierte en un factor limitante del crecimiento celular. Temperaturas de fermentación elevadas (>25°C) favorecen también la evaporación de compuestos de importancia para el aroma del producto. Por lo expuesto, la temperatura de fermentación

requiere un riguroso control con el fin de evitar paradas de la fermentación o deterioro en la calidad organoléptica de la sidra (Suárez-Lepe, 1997). Una vez finalizada la fermentación alcohólica y la densidad del mosto es de aproximadamente 1,003 g/L (concentración de azúcares menor a 2 g/L), se efectúa el primer trasiego con el objetivo de eliminar las borras de fermentación depositadas en el fondo de las piletas, seguido de un período de reposo o maduración (15 días aprox.). Durante la maduración el producto se clarifica naturalmente o por el agregado de agentes clarificantes, uno de los principales que se utiliza en la industria es la filtración o el clarificado con bentonita con posterior decantación por gravedad. El producto final, filtrado, se denomina “sidra base” de acuerdo al Código Alimentario Argentino, aunque a nivel industrial se lo conoce también como “caldo de sidra”.

Seguido al proceso de fermentación primaria o alcohólica puede o no ocurrir una fermentación secundaria o maloláctica (FML), llevada a cabo por las bacterias lácticas (Beech, 1972; Herrero et al., 1999; Nedovic et al., 2000). Este proceso consiste en la conversión del ácido L-málico en L-láctico y contribuye a la deacidificación de la sidra, así como también a la estabilidad microbiológica y a la complejidad de su aroma. La fermentación maloláctica se produce espontáneamente cuando los caldos base son reservados por mucho tiempo sin ser clarificados, no obstante, algunas bodegas inducen la fermentación maloláctica con la inoculación de bacterias lácticas en aquellas sidras que presentan una acidez en boca muy alta (Xu et al., 2005).

1.3.3. Operaciones Post-fermentativas

Con el fin de lograr un producto con sabor balanceado, en términos de acidez y contenido de taninos, se puede efectuar el mezclado o corte de sidras base. Luego se procede a efectuar el endulzado con sacarosa y gasificación obteniéndose el producto final listo para ser embotellado. Existen dos estrategias para gasificar las sidras, el gasificado artificial y el método *champenoise*. El primero consiste en el agregado del gas CO₂ directamente a la sidra-base, el segundo consiste en realizar una segunda fermentación en botella, donde se agrega azúcar y la levadura a la sidra-base obtenida en la primera fermentación, luego de realizada la 2° fermentación se procede a la clarificación (extracción de la borra) por decantación dentro de la botella, las mismas se colocan en pupitres con una inclinación de 45° y se giran una vez por día durante tres meses aproximadamente. Una vez clarificado el producto se procede al denominado “degüelle” que implica extraer las levaduras que se juntan en la punta de la botella (dentro

del bidul) para ello se abren las botellas e inmediatamente se realizan las correcciones de acidez, y el corte final de azúcares para conseguir el “corte” final, práctica denominada “dosaje”. Las diferentes clasificaciones en función de las concentraciones de azúcares de la bebida son: Nature (0 g/L); Extra brut (1-6 g/L); Brut (7-12 g/L); sec (13-30 g/L); demi-sec (31-50 g/L); dulce (>50) dentro de la categoría de Chandon (2003).

El producto final denominado “sidra” por el Código Alimentario Argentino (CAA) establece densidades de 1,025 g/L para la sidra dulce y de 1,015 g/L para la sidra semidulce, y respecto del gasificado, la concentración máxima permitida para la sidra (con gasificación artificial) es de 5 %v/v, sin embargo, para la sidra champagnizadas se permiten concentraciones máximas de 7 %v/v (CAA Artículo 1085 -Resolución Conjunta SPRyRS N° 87/04 y SAGPyA N° 566/04).

2. Levaduras

Actualmente se define a las levaduras como “hongos unicelulares, ascomicetes o *basidiomycetes*, que se reproducen vegetativamente por brotación o fisión y que pueden o no presentar estados sexuales que no están contenidos en cuerpos de fructificación” (Kurtzman, *et al.*, 2011). Las levaduras que presentan estadios sexuales se denominan levaduras perfectas o formas teleomórficas y a las que no los presentan levaduras imperfectas o formas anamórficas. Históricamente ligadas al hombre a través de la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas, las levaduras constituyen probablemente el grupo microbiano con más tradición en biotecnología. Pueden ser aisladas de ambientes terrestres, acuáticos o aéreos (Hagler y Ahearn, 1987; Gadanho *et al.*, 2003; Libkind *et al.*, 2003; Martini, 1992; Phaff y Starmer, 1987; Silva-Bedoya *et al.*, 2014) incluso de ambientes extremos (Russo *et al.*, 2006; 2008; Vishniac y Onofri, 2003).

Desde el punto de vista nutricional, las levaduras son eucariotas heterótrofos quimiorganotrofos capaces de utilizar ciertos hidratos de carbono, glucosa en particular, como fuente de carbono y de energía (Gancedo y Serrano, 1989; Kurtzman y Fell, 1998). Conforme a sus requerimientos de oxígeno las levaduras se clasifican en aeróbicas estrictas y aeróbicas facultativas. Las levaduras aeróbicas facultativas pueden a su vez diferenciarse en respiratorias y fermentativas. Durante el crecimiento aeróbico, las levaduras respiratorias, que incluyen la mayoría de las especies de levaduras, metabolizan menos del 30% del azúcar vía fermentación alcohólica. Ejemplos típicos de este subgrupo de levaduras anaerobias facultativas son ciertas especies de los géneros *Cyida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*, muchas de las cuales son relevantes en el proceso

La transformación natural o espontánea del mosto de manzana en sidra base es llevada a cabo por la acción secuencial de diferentes especies de levaduras salvajes naturalmente presentes en la superficie de las manzanas o sobre el equipamiento de la sidrera (Barbagelata, 2010; Cabranes et al., 1990; Coton et al., 2006; Martini y Martini, 1990; Sipiczki et al., 2001). En este tipo de fermentaciones, la etapa inicial está dominada por levaduras de bajo poder fermentativo como las pertenecientes a los géneros *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Lachancea*, *Mesherozyma*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* y *Zygosaccharomyces* denominadas *no-sacaromicéticas* (Cabranes et al., 1990; Coton et al., 2006; Dueñas et al., 1994; le Quéré y; Suarez-Valles et al., 2007a). Estas levaduras, se encuentran presentes originariamente en la piel de las manzanas y en menor proporción en la superficie del equipamiento de las bodegas (Fleet, 2003). Las mismas son transferidas al mosto, iniciando espontáneamente la fermentación alcohólica. Las levaduras no-sacaromicéticas dominan la etapa inicial del proceso y luego de unos 3-4 días (estadio medio de la fermentación), su número y diversidad comienza a declinar hasta desaparecer como consecuencia del efecto tóxico generado por el etanol, entre otros factores que se discutirán más adelante. Paralelamente a esto, cepas de levaduras con alto poder fermentativo comienzan a dominar a la fermentación (1×10^7 - 1×10^8 UFC/mL) conduciéndola hasta su finalización, principalmente, en sidras y vinos, *Saccharomyces cerevisiae* es la especie que domina el proceso fermentativo.

No obstante, otras especies del género *Saccharomyces* como *S. uvarum* y la especie híbrida *S. bayanus* han sido encontradas dominando fermentaciones espontáneas de sidra producidas a bajas temperaturas (Coton et al., 2006; Naumov et al., 2001; Suárez Valles et al., 2007b). Este hallazgo rápidamente impulsó nuevas investigaciones orientadas a la producción de aromas diferenciales y calidad sensorial de las bebidas fermentadas con las mismas.

En la Tabla 3 se describe la diversidad de especies pertenecientes al género *Saccharomyces* y sus híbridos naturales, aisladas de fermentaciones naturales en sidras en todo el mundo.

Tabla 3: Especies del género *Saccharomyces* aisladas en fermentaciones naturales de sidras de manzana y pera y chicha de manzana del mundo

País	Especie	Método de identificación	Referencia
Irlanda	<i>S. cerevisiae</i>	PCR-RFLP (5.8S-ITS)	Morrissey et al., 2004
España (Asturias)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Caracterización fenotípica PCR-RFLP (5.8S-ITS)	Cabranes et al., 1990 Suarez-Valles et al., 2007b; Perez-Traves et al., 2014
Francia	<i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bayanus</i>	PCR-RFLP (5.8S-ITS)	Coton et al., 2006
País Vasco	<i>S. cerevisiae</i>	Caracterización fenotípica	Dueñas et al., 1994
Francia (Bretaña)	CID1 (híbrido interespecífico entre <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i> x <i>S. kudriavzevii</i>)	PCR-RFLP <i>MET2</i>	Masneuf et al., 1998
Francia (Bretaña y Normandía)	<i>S. uvarum</i> y <i>S. cerevisiae</i>	PCR-RFLP <i>NTS2</i>	Naumov et al., 2001
Alemania	<i>S. uvarum</i>		Perez-Traves et al., 2014
Argentina	<i>S. cerevisiae</i>	PCR-RFLP (5.8S-ITS)	Barbagelata, 2010

2.2. Fermentaciones naturales y conducidas

Cuando la fermentación alcohólica se produce espontáneamente sin agregado de levaduras comerciales al proceso se denomina fermentación natural y se lleva a cabo por las poblaciones mixtas de levaduras indígenas presentes en la superficie de las manzanas y los equipos de bodega. La característica principal de las sidras obtenidos a partir de estas fermentaciones es que, debido a esta diversidad microbiológica y metabólica, presentan una gran complejidad organoléptica, sin embargo, las contribuciones individuales y colectivas de las diferentes especies y cepas nativas son difíciles de predecir, por ende, las características de las sidras obtenidas también lo son. Ante un mercado de ventas que exige calidad constante, esta falta de reproducibilidad propia de las fermentaciones naturales representa un serio problema industrial. Por esta razón, se ha introducido como práctica enológica el uso de cultivos iniciadores (*starters*) de levaduras, que permite realizar un mejor control microbiológico del proceso, mediante la normalización de la biota participante (Pretorius, 2000). Este tipo de fermentaciones se conoce como fermentaciones conducidas y resuelven el problema de falta de reproducibilidad en la calidad final de las sidras. Adicionalmente, disminuyen los riesgos de contaminación de los mostos y de detenimiento de las fermentaciones observadas con cierta frecuencia en las fermentaciones naturales (Querol et al., 1992). La industria del

vino lleva la delantera en la utilización de starters comerciales, es por ello que en la actualidad existen cientos de starters para vino y muy pocos para sira.

Sin embargo, a pesar de los aparentes beneficios de su uso, algunos productores o elaboradores de bebidas fermentadas son, aun actualmente, reacios a su utilización. La crítica más importante es que la fermentaciones alcohólicas conducidas con cultivos puros de *S. cerevisiae* producen bebidas de calidad sensorial estándar, con perfiles aromáticos planos que pierden muchas, sino todas, de las características distintivas otorgada por la compleja biota de levaduras indígenas presente en las fermentaciones naturales (Pretorius 2000). Con el fin de resolver estos problemas, han surgido modalidades fermentativas nuevas que hacen uso del empleo de cultivos iniciadores formados con levaduras seleccionadas indígenas de cada región particular, el uso de especies de *Saccharomyces no-cerevisiae*, el uso de cultivos mixtos entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* conocidos como *multistarters* y la utilización de híbridos entre diferentes especies del género *Saccharomyces* adaptadas a diferentes condiciones ambientales (Soden *et al.*, 1998; Rainieri y Pretorius, 2000; Romano *et al.*, 2003, Suzzi *et al.*, 2012; Ciani *et al.*, 2016).

La especie *S. uvarum* es reportada como una especie con propiedades fermentativas destacables para ser usada como cultivo iniciador, se destaca principalmente por producir una alta concentración de glicerol, alcoholes superiores y ésteres al igual que los híbridos artificiales entre esta especie y *S. cerevisiae* (Gamero *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014), y por presentar productos fermentados con mayor intensidad aromática que cepas de *S. cerevisiae* (Coloretti *et al.*, 2006; Eglinton *et al.*, 2000). Todas las características fisiológicas interesantes que presenta *S. uvarum* ya han sido aprovechadas para desarrollar la primera cepa comercial de *S. uvarum* para vino; esta levadura fue seleccionada y patentada por el grupo de investigación de la Dra. Querol (IATA-CSIC, Valencia, España) y comercializada actualmente por la empresa Lallemand S.A. bajo el nombre comercial de VELLUTO BMV58 YSEO®.

Otra especie, *S. pastorianus*, ha sido utilizada ampliamente como cultivo iniciador en la producción de cerveza a muy bajas temperaturas en comparación con otros procesos de fermentación industriales. Este género incluye cepas híbridas entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Kodama *et al.*, 2006) y es beneficiado obteniendo características fisiológicas provenientes de ambos genomas, lo que resulta en una fuerte capacidad fermentativa a baja temperatura (Gibson y Liti, 2015).

Los criterios generales establecidos para cepas de *S. cerevisiae* se basan en la evaluación de ciertas características metabólicas y fisiológicas de las mismas que les otorgan propiedades interesantes desde el punto de vista cualitativo y ventajoso desde el punto de vista tecnológico, las que se describen en la Tabla 4. Más recientemente algunos autores han considerado importante incorporar algunos criterios ecológicos, como la evaluación de la conducta *killer* (biotipo *killer*) (Lopes et al., 2005).

Tabla 4: Criterios de selección de levaduras para elaboración de sidras.

PROPIEDADES CUALITATIVAS	PROPIEDADES TECNOLÓGICAS
<ul style="list-style-type: none"> • Baja formación de sulfhídrico, tioles y dimetilsulfóxido • Baja producción de acidez volátil • Alta producción de glicerol • β-glucosidasas • Proteasas • Producción diferencial de ésteres • Autólisis 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia fermentativa • Rápida iniciación de la fermentación • Alta tolerancia al etanol • Baja temperatura de fermentación (10-18°C) • Alta osmotolerancia • Alta estabilidad genética • Alta tolerancia al sulfito • Baja formación de espuma • Factor <i>killer</i>

Actualmente se han desarrollado cultivos iniciadores específicamente para sidras, en la Tabla 5 se describen los principales cultivos iniciadores comerciales utilizados en fermentaciones conducidas y sus principales características de interés industrial por las cuales fueron seleccionadas

No obstante, a fin de comprender mejor la influencia de las diferentes levaduras en el proceso es necesario conocer un poco más acerca de su metabolismo secundario y su relación con las características organolépticas de las sidras.

2.3. Las levaduras y su relación con las características organolépticas (*flavor*) de las sidras

El *flavor* es la característica organoléptica distintiva de una bebida fermentada, y en un sentido amplio, es la impresión sensorial que brindan compuestos que aportan tanto al aroma como al sabor, y puede también incluir aspectos tales como acidez, dulzura, astringencia, entre otros. Sin embargo, más comúnmente se refiere al *flavor* de una bebida

como su aroma (Lambrechts y Pretorius, 2000). El mismo, no se constituye únicamente por los compuestos sintetizados por las levaduras involucradas en la fermentación alcohólica, sino también por aromas que provienen desde el varietal hasta de las prácticas tecnológicas involucradas en la bebida.

Tabla 5: Principales *starters* comerciales desarrollados para sidras

Nombre comercial	Especie/s- Cultivo	Características
Merit	<i>S. cerevisiae</i> Puro	Tolerancia al alcohol por encima de 16% v/v Perfecta para inocular con levaduras no-Saccharomyces y/o bacterias malolácticas Baja producción de H ₂ S
Prelude	<i>Torulaspóra delbrueckii</i> Puro	Alta producción de manoproteínas/ polisacáridos Sedosa sensación en boca, aumento del cuerpo en paladar Baja producción de SO ₂ y H ₂ S
Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> Puro	Acentúa los frutos rojos y especias negras Baja producción de SO ₂ y H ₂ S
Melody	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. thermotolerans</i> <i>T. delbrueckii</i> Mixto	Tres cepas de levaduras en proporción 60:20:20 Mayor intensidad y complejidad frutal Puede tolerar altas concentraciones de alcohol Baja producción de SO ₂ y H ₂ S
Rhythm	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. thermotolerans</i> Mixto	Dos cepas de levaduras en proporción 60:40 Complejidad con notas frutales Puede tolerar altas concentraciones de alcohol Baja producción de SO ₂ y H ₂ S
Harmony	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. thermotolerans</i> , <i>T. delbrueckii</i> Mixto	Tres cepas de levaduras en proporción 80:10:10 Incremento de sensación en boca Matices de complejidad frutal Baja producción de SO ₂ y H ₂ S

Fuente web: *Gusmer Enterprice, Inc* ®

A continuación, se detallan los tipos de aromas que forman en su conjunto el *flavor* de las sidras.

1) Aroma primario o varietal: proviene de la materia prima, en este caso de la manzana y depende de la variedad de la misma y de todos los factores que afectan la fisiología de las frutas, como ser la madurez y el clima. El aroma varietal está conformado por varias familias de compuestos, tales como terpenos, metoxipirazinas, derivados de norisoprenoides, entre otros. El total de compuestos que lo conforman puede dividirse en dos grandes categorías: los que constituyen el aroma varietal libre (fracción libre) y los precursores aromáticos (fracción ligada) (Baumes 2009). Algunos compuestos no son volátiles porque están conjugados con azúcares (gliconjugados). La liberación de los aromas a partir de estas moléculas se produce por hidrólisis ácida o enzimática, siendo esta última de mucha más relevancia. Muchas levaduras, principalmente no-sacromicéticas, disponen enzimas (β -glucosidasa, β xilosidasa) capaces de hidrolizar las moléculas gliconjugadas y liberar los compuestos asociados a los azúcares transformándolos en compuestos volátiles y aromáticos (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010; Ugliano, 2009).

2) Aroma fermentativo o secundario: formado durante la fermentación, está constituido por compuestos derivados del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica y de las bacterias lácticas, en el caso en que se realice la fermentación maloláctica.

3) Aroma post-fermentativo: incluye todos los compuestos volátiles que se forman durante la conservación. En sidras este último es de poca importancia ya que por lo general las sidras no se reservan y se producen para el consumo rápido.

Debido a que las levaduras se relacionan con el aroma secundario o fermentativo de la bebida, en este apartado se hará especial hincapié en este tipo de aroma y los procesos metabólicos que los producen.

Glicerol

Aunque la producción de etanol es la vía más importante para generar NAD^+ , existe una alternativa, llamada fermentación gliceropirúvica, a partir de la cual la célula produce glicerol como producto final (Prior y Hohmann, 1996). La fermentación de glucosa en levaduras en presencia de sulfito produce glicerol en cantidades elevadas, ya que el sulfito se combina con el etanal, el cual previene la regeneración de NAD^+ vía alcohol deshidrogenasa. Bajo estas condiciones, las levaduras necesitan oxidar NADH a través

de una vía alternativa con el fin de compensar su déficit, siendo la producción de glicerol la única manera. Durante este proceso metabólico se consume ATP siendo, sin embargo, necesario para compensar el desbalance redox producido en la célula.

Aunque la fermentación gliceropirúvica fue inicialmente descubierta a través del efecto de sulfitos, puede activarse también ante otras situaciones. Al inicio de la fermentación el crecimiento de las levaduras implica la biosíntesis muy activa de proteínas, lípidos, nucleótidos, entre otras biomoléculas, que son sintetizadas utilizando piruvato como sustrato. La utilización anabólica de moléculas de piruvato genera déficit de NAD^+ , requiriendo su reconstitución a través de la vía gliceropirúvica. Por esta razón, el glicerol es principalmente producido durante los primeros pasos de la fermentación alcohólica, cuando las células incrementan su biomasa (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Además, las levaduras producen glicerol a modo de protección contra la presión osmótica (Prior y Hohmann, 1996). Por esta razón, el glicerol es un compuesto sintetizado en elevadas concentraciones en las fermentaciones de sidra principalmente a bajas temperaturas (Izawa et al., 2004), con concentraciones entre 3-5 g/L y aporta a la calidad de la bebida confiriéndole dulzor y cuerpo (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010) (Figura 3).

Acetaldehído

El acetaldehído, también conocidos como etanal, es un intermediario de la fermentación alcohólica obtenido de la descarboxilación de piruvato (Figura 3). Luego es reducido principalmente a etanol, en pequeñas cantidades pueden aportar complejidad asociándose con un aroma a manzana verde. Sin embargo, en altas concentraciones puede dar la percepción de una bebida oxidada, o un sabor punzante e irritante que recuerda al pasto verde (Liu y Piloni 2000).

Ácidos orgánicos

Los ácidos láctico y acético son, también productos secundarios de la fermentación alcohólica. Las levaduras sintetizan ácido láctico a partir del ácido pirúvico mediante la enzima lactato deshidrogenasa. Este proceso permite regenerar NAD^+ para que prosiga la glucólisis. Sin embargo, no todo el láctico que se encuentra en la sidra se debe proviene del metabolismo de las levaduras. La presencia de más de 0,5 g/L de este ácido es un indicativo de que ocurrió fermentación maloláctica (FML) llevada a cabo por las bacterias lácticas como se mencionó previamente. Por otro lado, el ácido acético es el principal ácido volátil detectado en las sidras, siendo uno de los principales parámetros de análisis enológico. Aunque puede ser producido por levaduras, bacterias lácticas y acéticas,

normalmente, *S. cerevisiae* produce bajas concentraciones del mismo (0,1- 0,3 g/L) en fermentaciones normales. Sin embargo, paradas de fermentación o ralentización pueden producir elevados niveles de este ácido. La elevada producción de ácido acético puede darse como consecuencia del desarrollo de enfermedades lácticas o por una producción de ácido acético mayor de lo normal por parte de las levaduras por hidrólisis de acetyl-CoA (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010).

Alcoholes superiores

La mayoría de los alcoholes superiores se producen por la reacción de Ehrlich, que permite la transformación de un cetoácido en un aldehído y este a su vez se puede convertir en un alcohol a través de la acción de las enzimas alcohol deshidrogenasas (Ehrlich y Sachs, 1899). La producción de alcoholes superiores depende de varios factores, entre los que cabe señalar: i) la cepa de levadura: algunos investigadores observaron que cuando la levadura posee mayor demanda de nitrógeno producen una menor cantidad de alcoholes superiores (Torrea et al., 2003) ii) La temperatura de fermentación, a mayor temperatura se estimula la producción de estos compuestos (Cabranes et al., 1998) iii) el nivel de aireación ya que moderadas aireaciones mejoran la producción de alcoholes (Buescher et al. 2001) iv) la concentración de aminoácidos y amonio del medio ya que una disminución del contenido de nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura potencia la producción de alcoholes superiores (Beltran 2005).

Ésteres

En las sidras, como en las bebidas fermentadas en general, se pueden detectar dos grupos importantes de ésteres: a) ésteres de acetato y b) ésteres de etilo (de ácidos grasos de cadena media). Los ésteres de acetato se sintetizan a partir del acetyl-CoA y un alcohol superior, con la consecuente liberación del grupo CoA. Las enzimas que llevan a cabo esta síntesis son transferasas y carboxiesterasas. En consecuencia, la producción de estos compuestos está muy vinculada al metabolismo de los azúcares y de los aminoácidos (Morrissey et al., 2004). El éster más importante cuantitativamente es el acetato de etilo derivado de la etanolisis del Acetyl-CoA. En las especies del género *Saccharomyces*, el acetato es producido como un intermediario en el *bypass* de la enzima piruvato deshidrogenasa, camino responsable de la conversión de piruvato en acetyl CoA. Este camino metabólico además de ser la única fuente citosólica de acetyl-CoA, indispensable para la biosíntesis de lípidos, rinde poder reductor [NAD(P)H] también indispensable para el anabolismo (Swiegers et al., 2005). Por último, los ésteres de etilo provienen de acetyl-CoA y etanol (Zamora, 2009), la síntesis de estos últimos está directamente

influenciada por la concentración de ácidos grasos de cadena media lo que estimula su producción (Saerens et al., 2008).

En la Figura 3 se representan simplificadas las vías de síntesis de estos compuestos y en la Tabla 6 se detallan los principales compuestos aromáticos que se encuentran en la manzana, asociado a su descriptor (aroma al que se asocia a nivel sensorial), el umbral de detección por el paladar humano (umbral de percepción).

Tabla 6: Compuestos volátiles más representativos del aroma de la sidra. Extraído de (Swiegers et al., 2005) con modificaciones.

Compuesto	Concentración en sidra (mg/L)	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptor aromático
Acetaldehído	10-75	100	Almendra, manzana, cítrico
Ácido acético	100-1150	700-1100	Vinagre, picante
Ácido cítrico	65	0,28	-
Ácido láctico	30	2	-
Ácido málico	5000	30	Acidez muy pronunciada
<i>Esteres</i>			
Acetato de etilo	22,5-63,5	160	Barniz, solvente, picado
Acetato de hexilo	0-4,8	0,7	Dulce, perfume
Acetato de isoamilo	0,03-8,1	0,26	Banana, ananá
Acetato de isobutilo	0,01-0,8	1,6	Banana
Acetato de 2-fenietilo	0,01-4,5	3,8	Rosa, miel, floral, frutal
Butirato de etilo	0,01-3	0,4	Floreale, frutal
Hexanoato de etilo	0,03-3,4	0,08	Manzana, banana
Octanoato de etilo	0,05-3,8	0,58	Ananá, pera
Decanoato de etilo	0-2,1	0,2	Floral, jabón
Lactato de etilo	8,3	250	Leche agria
<i>Alcoholes superiores</i>			
Alcohol isoamílico	45-490	300	Crema de almendras
Alcohol isobutílico	9-28	500	Alcohólico
1-propanol	9-68	500	Alcohólico
1-butanol	0,5-8,5	150	Combustible
1-hexanol	0,3-12	5,2	---
2-feniletanol	10-180	7,5	Floral, rosa

2.4. Las levaduras y los factores de stress de vinificación

Es sabido que la acumulación de etanol a lo largo de las fermentaciones puede significar un factor de estrés, asociado particularmente a etapas avanzadas de la fermentación y aunque *S. cerevisiae* es muy tolerante, concentraciones relativamente elevadas pueden inhibir el crecimiento y la viabilidad celular (Pretorius, 2000). La estructura de la membrana celular es el blanco principal para el etanol, tanto en sus proteínas hidrofílicas como hidrofóbicas, por lo que la exposición a dicho compuesto puede resultar en un incremento de la fluidez de la membrana y consecuente pérdida de

la integridad celular. Una disminución en la disponibilidad de agua dada por la presencia de etanol genera la inhibición de las enzimas clave de la glicólisis generando la desnaturalización de las mismas (Stanley et al., 2010), que por lo tanto conlleva a un desbalance generalizado de las funciones celulares. Diversos estudios se han realizado a fines de conocer la capacidad de respuesta a etanol y los mecanismos desarrollados por parte de levaduras en procesos fermentativos (Arroyo-lópez et al., 2010; Pina et al., 2004). Con respecto a las sidras, las concentraciones de alcohol en la mayoría de los casos no exceden los 5% v/v, siendo significativamente inferior a las concentraciones alcanzadas en vinos (entre 10-14 % v/v) por lo que el estrés generado por el etanol no es una de las principales causas de paradas de fermentación, sin embargo aquellas levaduras con mayor resistencia al etanol, presentan una ventaja adaptativa que les podría permitir una mayor capacidad de implantación en la fermentación por lo que la resistencia al etanol sigue siendo un criterio de importancia para la selección de levaduras involucrados en lo.

El SO_2 que se adiciona a las sidras es otro de los principales factores de estrés para las levaduras. Cuando el dióxido de azufre se agrega, se disocia en tres especies moleculares tal como se muestra en la Figura 4. La persistencia de cada una de las formas iónicas es dependiente del pH del mosto, prevaleciendo la forma molecular a pH 0-2, el anión bisulfito a pH 2-7 y sulfito a pH 7-10. Debido a que el pH de las sidras varía entre 3 y 4, dominan las especies bisulfito y el anión HSO_3^- . Por esta razón también el pH de la sidra juega un papel importante en fermentación y se convierte en un factor adicional de estrés.

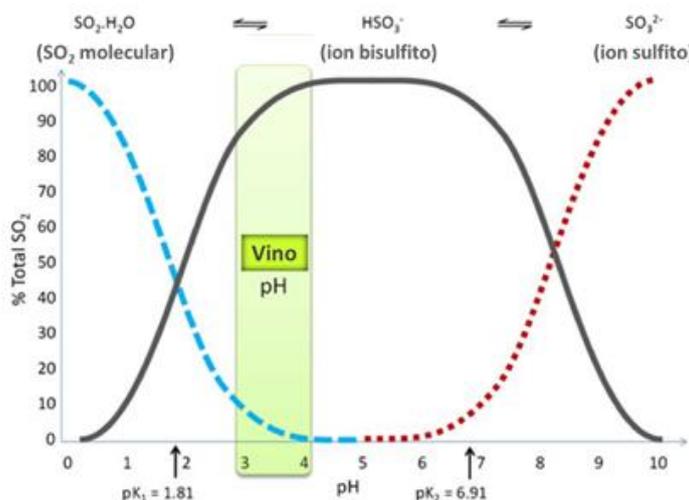


Figura 4: Especies de SO_2 en solución acuosa y su representación en porcentaje del SO_2 total a lo largo del rango de pH. pK_1 es la constante de disociación de la reacción química de $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$, mientras que pK_2 es la constante de la reacción $\text{HSO}_3^- \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{H}^+$. Extraído de Divol et al. 2012

El SO₂ se agrega a las sidras con motivo de prevenir la oxidación de ciertos compuestos, como las antocianinas. Las formas iónicas HSO₃⁻ y SO₃²⁻ son las más reactivas pudiendo, por lo tanto, unirse a diversos compuestos tales como acetaldehído, antocianinas y ácidos orgánicos presentes en la sidra. Por ello se dice que existe una forma “libre” y una “combinada” de este compuesto. Debido a que el SO₂ puede unirse a metabolitos tales como glucosa, fosfato-dihidroxiacetato, piruvato, acetaldehído, ácido oxalacético y ácido α-cetoglutámico, previene su uso como sustratos en vías metabólicas microbianas. De hecho, ha sido demostrado que el SO₂ molecular, como parte de la porción libre, posee propiedades antisépticas ya que una vez dentro de la célula el bisulfito se vuelve la forma dominante -debido al pH intracelular- inhibiendo el crecimiento microbiano. Algunas de las alteraciones que puede generar en la célula son: (a) daño a la membrana celular por unión a receptores específicos presentes en la misma, (b) pérdida por filtración de metabolitos intracelulares, (c) aumento intracelular de la concentración de ATP (Divol et al., 2012). Además de inhibir vías metabólicas claves, el sulfito se une a proteínas (rompiendo los puentes disulfuro que las componen), coenzimas (NAD⁺ y FAD⁺) y co-factores tales como tiamina y menadiona. También se ha demostrado que el sulfito puede causar mutaciones puntuales en el DNA del microorganismo. Sin embargo, las levaduras presentan diversos mecanismos de resistencia poligénicos y heredables ante el SO₂, aún en ausencia del mismo. Dicha tolerancia es muy variable, no sólo entre especies de levaduras, sino también entre cepas y varía durante las diferentes fases de crecimiento (Divol et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos de la resistencia a este agente son un área de continuo estudio en levaduras fermentativas.

La temperatura de fermentación es un conocido factor que genera enlentecimiento y paradas de fermentación, como así también la presencia de microorganismos competidores y la posible producción de toxinas por parte de los mismos, utilizadas como mecanismo de supervivencia, conocidas como *killer* (Moreno-Arribas y Polo, 2005). La estimación del rango de temperatura de crecimiento de los microorganismos es muy importante para la industria alimenticia para garantizar u optimizar las condiciones fermentativas. Se ha reportado que la tasa de crecimiento de las levaduras y la fermentación alcohólica aumentan con el incremento de la temperatura, con tasas máximas entre 20°C y 25°C, no obstante, temperaturas superiores afectan el crecimiento de las levaduras como consecuencia de daños generados en la membrana celular y desnaturalización de las proteínas (Belloch et al., 2008). Por su parte, las bajas temperaturas afectan la fluidez de las membrana plasmática de las levaduras aumentando

la insaturación de los ácidos grasos que la componen (Torija et al., 2003). Específicamente la necesidad de contar con levaduras criotolerantes es un requisito indispensable para la elaboración de sidra para minimizar la pérdida de compuestos volátiles. Debido a que *S. cerevisiae* no es eficiente en general para llevar a cabo este tipo de fermentaciones, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de levaduras de especies criotolerantes del género aisladas de ambientes naturales y antrópicos e incluso híbridos interespecíficos (Castellari et al., 1994; Eizaguirre et al., 2018; Gamero et al., 2013; Giudici et al., 1999; Gonzalez et al., 2006; Magalhães et al., 2017a, 2017b; Origone et al., 2018).

El estrés osmótico causado por las elevadas concentraciones de glucosa y fructosa al inicio de la fermentación también afecta significativamente el metabolismo de las levaduras. La respuesta de *S. cerevisiae* al estrés osmótico ha sido intensamente estudiado en las últimas dos décadas. Cambios en la actividad del agua y concentración de solutos dentro de las células pueden ocurrir como resultado de cambios en el medio ambiente o incluso de la actividad metabólica propia. Desde el punto fisiológico se requiere una tasa crítica de agua libre y ligada para mantener el volumen celular apropiado y proporcionar un medio favorable para las reacciones bioquímicas. El estrés hiperosmótico externo resulta en la plasmólisis debido al eflujo de agua, como resultado la célula se encoge y absorbe iones y compuestos orgánicos de bajo peso molecular (solutos compatibles) en un intento de lograr el equilibrio osmótico (Hohmann 2002).

Como consecuencia, en los últimos años se han comenzado a realizar estudios en los que se evalúa la tolerancia de las levaduras a los diferentes factores propios del proceso fermentativo para mejorar la producción de Sidra. Entre estos factores se evaluaron la utilización de híbridos interespecíficos que resistan fermentaciones a bajas temperaturas combinadas con la resistencia al etanol (Magalhaes et al., 2017b), así también como la cinética de fermentación, resistencia a las presiones osmóticas propias de mostos con altas concentraciones de azúcares (Pando Bedriñana et al., 2017).

En estos casos se ha propuesto, que estos estudios se tengan en cuenta al momento de seleccionar nuevas levaduras que vayan a utilizarse en el desarrollo de cultivos iniciadores. Contar con levaduras adaptadas a las diferentes condiciones de estrés aseguraría fermentaciones controladas, rápidas y completas, con una elevada viabilidad celular de los microorganismos empleados y, por lo tanto, la generación de productos de fermentación estables y de calidad superior.

2.5. El género *Saccharomyces*

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sido aisladas tanto de ambientes naturales como de procesos industriales. Este género se compone de diez especies, tres de ellas asociadas a procesos de fermentación industrial (*S. uvarum*, *S. cerevisiae*, y *S. pastorianus*) y seis aisladas de hábitats naturales (*S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*; *S. eubayanus*) (Kurtzman y Robnett, 2003; Libkind et al., 2011; Wang y Bai, 2008). De las tres aisladas en ambiente de fermentación, *S. cerevisiae* es la especie más ampliamente difundida en procesos de fermentación alcohólica. La especie *S. uvarum* está presente en fermentaciones de vinos y sidras de las regiones frías de Europa y en otras partes del mundo (Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2001) y el taxón *S. pastorianus* incluye cepas híbridas entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* que son responsables de la producción de cerveza lager (Kodama et al., 2006). El resto de las especies se asocian únicamente con hábitats naturales, con la excepción algunas cepas de *S. paradoxus* aisladas de viñedos croatas (Redzepovic et al., 2002) y que han mostrado un buen desempeño en la elaboración de vino (Orlic et al., 2010).

2.5.1. *Saccharomyces*: diversidad y ecología

La especie más estudiada a nivel mundial, por su gran diversidad y distribución cosmopolita es *S. cerevisiae*. Los primeros estudios filogenéticos de la especie permitieron separar entre poblaciones salvajes y domesticadas (Fay y Benavides, 2005), y desde entonces se reconocieron una variedad de linajes distantes filogenéticamente desde los ambientes naturales a los ambientes asociados con el hombre (Cromie et al., 2013; Sniegowski et al., 2002). La filogenética global de esta especie indica que las cepas pueden agruparse no solo por su origen geográfico sino también por los procesos de fermentación (Cromie et al., 2013; Legras et al., 2007). Liti et al., (2009) detectaron cepas de cinco linajes “puros” a las que denominaron (1) Malasia, (2) África Occidental, (3) Sake, (4) Norteamérica y (5) vino/Europa y otras cepas “mosaicos” (recombinantes) que se podrían haber originado por el tráfico humano y la subsecuente recombinación entre ellas. Un trabajo recientemente publicado por Duan et al., (2018) que contribuye a la historia evolutiva de esta especie, describe que la diversidad de las poblaciones domesticadas de *S. cerevisiae* en China es mucho más alta que la observada en otras regiones del mundo. Los aislamientos que pertenecen al linaje del vino (grupo vino/Europa caracterizados en el trabajo de Liti et al., (2009) también están presentes en

las frutas y huertas en China esto sugiere que China o el Lejano Oriente asiático es probablemente el centro de origen de las poblaciones domesticadas de *S. cerevisiae*.

Al ser una especie distribuida por todo el globo y con una alta diversidad *S. cerevisiae* ha sido descrita como una especie nómada sin nicho natural (Goddard y Greig, 2015) La notable plasticidad del genoma de esta especie y su capacidad única para adaptarse rápidamente a muchos nichos ecológicos como los producidos por los seres humanos es lo que se traduce hoy en un sorprendente complejo de poblaciones especializadas (Legras et al., 2018).

Por otro lado, la historia es diferente cuando se trata de las dos especies hermanas recientemente descritas- *S. eubayanus* y *S. uvarum*. Estas dos especies criotolerantes no tienen una distribución tan amplia ni una diversidad comparable. Pero en los últimos años, hallazgos de cepas de estas especies en diferentes partes del mundo han permitido ampliar el conocimiento sobre la historia evolutiva de las mismas.

La especie *S. eubayanus* ha sido descrita por primera vez en la Patagonia asociada a *Nothofagus spp.* y *Cyttaria spp.* (Libkind et al., 2011). En los últimos años se amplió la distribución a Norteamérica, Asia, Nueva Zelanda y nuevamente en la Patagonia asociada a *A. araucana*, seis especies de *Nothofagus* y *Quercus spp* (Bing et al., 2014; Eizaguirre et al., 2018; Gayevskiy y Goddard, 2016; Peris et al., 2016, 2014). Los estudios poblacionales y filogenéticos en esta especie evidencian que dos poblaciones altamente variables existen en la Patagonia (Patagonia A y Patagonia B/Holártica) y también dos poblaciones divergentes en Asia (Bing et al., 2014; Peris et al., 2016). Dentro de la población PB/Holártica hay un linaje separado que contiene aislados del Tibet y el Norte de Carolina, los cuales son los parientes silvestres más cercano de las levaduras Lager (Peris et al., 2016).

S. eubayanus y su especie hermana *S. uvarum* coexisten en la Patagonia, lo que ha llevado a algunos autores proponer que el ancestro común de ambas prosperó en el hemisferio sur en asociación con el *Nothofagus spp.* Mientras que otros linajes probablemente migraron al hemisferio norte a través del sudeste asiático, la única región del mundo donde se encuentra la haya y roble (*Fagaceae*). La distribución del roble en el hemisferio norte puede asociarse con la formación de otras especies como *S. arboricola* y *S. mikatae* inclusive *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* (Almeida et al., 2014).

La Patagonia es actualmente la región donde se ha encontrado la mayor diversidad de *S. eubayanus* y *S. uvarum*, lo que la convierte en un escenario único para estudiar y profundizar aspectos relacionados a la diversidad, ecología, así como historia evolutiva

de estas dos especies criotolerantes. *S. uvarum* también ha sido aislada de ambientes naturales como la corteza de *Nothofagus* y de hongos parásitos de estos árboles (Eizaguirre et al., 2018; Libkind et al., 2011), y de corteza y semillas de *Araucaria araucana* junto con *S. eubayanus* (Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, en la Patagonia, aunque la diversidad es muy alta no ha sido detectada aún en procesos fermentativos industriales como son la elaboración de vinos o sidras regionales. Los trabajos ecológicos y filogenéticos en *S. uvarum* son escasos. El único trabajo realizado hasta el momento utilizando el análisis de secuencia completa y cepas representativas de la distribución mundial fue realizado por Almeida et al., (2014), quienes proponen que el origen de la especie probablemente fue en la Patagonia Argentina (siguiendo una historia evolutiva cercana a la de *S. eubayanus*), y se reporta el hallazgo de dos poblaciones altamente diferenciadas a las que llaman Sudamérica B (SA-B) y Sudamérica A (SA-A). La población SA-B está íntimamente relacionada a los ambientes naturales y tiene una geolocalización más austral, mientras que la población SA-A se localiza más al norte de la Patagonia. Por el análisis filogenético se propone que esta población originó a la población Holártica distribuida por todo el mundo (Europa, Estado Unidos, Canadá, Japón) (Figura 5).

Posterior al trabajo publicado por Almeida et al., (2014), Rodríguez et al., (2017) reportó el aislamiento y descripción genética de cepas patagónicas de *S. uvarum* asociadas a un ambiente fermentativo de tipo natural -chicha de manzana, una bebida tradicional realizada por los mapuches en la zona de Chile. Los autores detectaron una población puramente patagónica formada por cepas aisladas de ambientes naturales (a la que denominan Sudamérica) y otra formada por cepas fermentativas de Europa donde también quedaron incluidas todas las cepas aisladas de chicha en la Patagonia. En base a los análisis filogenéticos realizados con las cepas patagónicas en comparación con las europeas, postularon que probablemente las cepas aisladas de chicha podrían haber ingresado con la manzana en la zona de Chile asociadas a la colonización por los españoles en los siglos XVI o XVII, luego cuando los nativos (aborígenes mapuches) incorporaron en su dieta la manzana, dispersaron las poblaciones de levaduras al ambiente natural, principalmente a los árboles *A. araucana*, debido a que utilizaban su fruto (piñón) para realizar una bebida tradicional (*mudai*) la población Holártica tomó contacto con población SA-B generando algunas cepas mosaicos que son principalmente detectadas en los ambientes donde la presencia del hombre es habitual, mientras que en los ambientes menos antrópicos solo se encuentran la población SA-B (Rodríguez et al., 2017).

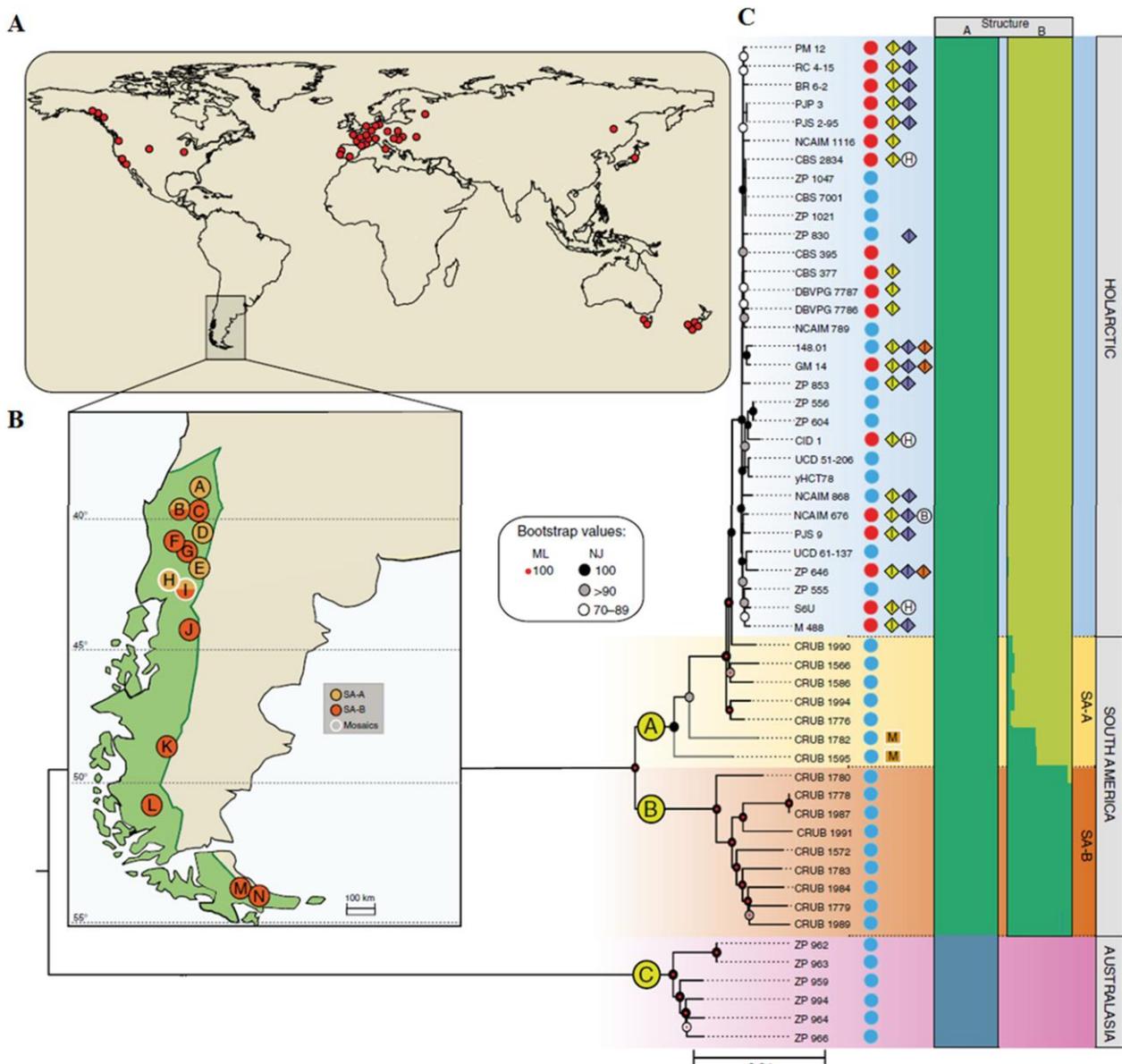


Figura 5. Distribución y Filogenética actual de la especie *S. uvarum*. A: Distribución mundial. B: Distribución en la Patagonia Argentina. C: Arbol filogenético (Neighbor Joining) y análisis de estructura poblacional utilizando SNPs del genoma completo. Extraído de Almeida et al., 2014.

HIPOTESIS

El estudio de la diversidad fisiológica y genética de S. uvarum aislada de ambientes naturales y de bebidas fermentadas con diferente grado de industrialización en la Norpatagonia, permite seleccionar cepas adecuadas para ser usadas en la elaboración de sidras a bajas temperaturas y con características diferenciales.

OBJETIVO GENERAL

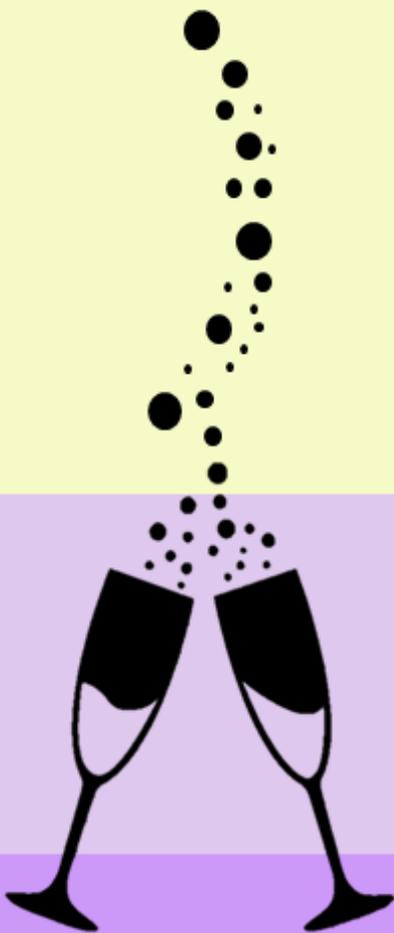
Comparar fisiológica y genéticamente cepas de la levadura criotolerante *S. uvarum* aisladas de ambientes naturales y bebidas fermentadas tradicionales e industriales de la Norpatagonia y evaluar su potencialidad para ser usadas como cultivos iniciadores en la producción de sidras con características organolépticas diferenciales.

Objetivos específicos

1. Caracterizar molecularmente aislamientos de la especie criotolerante *S. uvarum* aislados de procesos de elaboración de sidras regionales.
2. Evaluar las relaciones filogenéticas de cepas de *S. uvarum* aisladas de ambientes naturales, bebidas fermentadas tradicionales (chichas de manzana) e industriales (sidras) de la Norpatagonia.
3. Comparar las características fisiológicas de las cepas de diferentes orígenes, incluyendo la respuesta a factores de stress típicos de las fermentaciones, el perfil de consumo de diferentes nutrientes, el comportamiento fermentativo y la expresión diferencial de genes durante la fermentación.
4. Seleccionar cepas con características fisiológicas interesantes para evaluar su potencial uso como iniciadores en la elaboración de sidras a baja temperatura.
5. Evaluar la capacidad de competencia e implantación de las cepas seleccionadas de *S. uvarum* en mostos de manzana frente a las especies de levaduras naturalmente presentes en los mostos y/o levaduras comerciales. Establecer las mejores condiciones para su uso industrial.
6. Evaluar las cepas con mejor capacidad de competencia en fermentaciones a escala piloto y seleccionar la/s cepa/s más adecuadas para su potencial uso como iniciadores en la elaboración de sidras a bajas temperaturas.
7. Conservar las levaduras, de gran valor biotecnológico, en un Banco Genético para futuros desarrollos.

CAPITULO I

Caracterización biotecnológica de especies criotolerantes y selección de cepas de *S. uvarum* para la industria sidrera en la Norpatagonia



INTRODUCCIÓN

En particular, la especie *S. uvarum* es importante en la elaboración de cierto tipo de bebidas fermentadas y junto con *S. bayanus* (grupo de cepas híbridas entre *S. uvarum* y *S. eubayanus*) y *S. pastorianus* (híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*), comparten características fisiológicas únicas dentro del género que incluyen un sistema activo de transporte de fructosa, buena capacidad fermentativa y criotolerancia (Tronchoni et al., 2009). En comparación con los cultivos iniciadores de fermentaciones comerciales muchas cepas de *S. uvarum* en particular son capaces de fermentar completamente los mostos, produciendo menor cantidad de etanol y mayor de glicerol que *S. cerevisiae*, sin que esto conlleve un incremento de la cantidad de ácido acético (Gamero et al., 2013; Gonzalez et al., 2006; Tosi et al., 2009) *S. uvarum* produce también compuestos volátiles que influyen directamente en el aroma de las bebidas fermentadas tales como el 2-feniletanol y su respectivo (Masneuf et al., 2002).

A pesar de todas sus propiedades de interés, la menor producción y tolerancia al etanol que presentan la mayor parte de las cepas de *S. uvarum* puede suponer una desventaja competitiva respecto a *S. cerevisiae*. Es entonces necesario establecer las condiciones especiales de fermentación que permitan una implantación exitosa de esta especie en fermentaciones.

Muchas de las características fisiológicas interesantes que presenta *S. uvarum* ya han sido aprovechadas para desarrollar la primera cepa comercial de *S. uvarum* para vino; esta levadura fue seleccionada y patentada por el grupo de investigación de la Dra. Querol (IATA-CSIC, Valencia, España) y comercializada actualmente por la empresa Lallemand S.A., bajo el nombre comercial de VELLUTO BMV58 YSEO®. No obstante, frente a las más de 400 cepas comerciales diferentes de *S. cerevisiae*, es evidente que aún existe un gran campo de investigación en relación a *S. uvarum* y su potencialidad para el desarrollo de cultivos iniciadores para bebidas fermentadas.

La Patagonia parece ser un lugar único en el mundo en lo referido a diversidad de especies criotolerantes del género *Saccharomyces*, especialmente de *S. uvarum*. Esta levadura ha sido aislada de ambientes naturales junto a *S. eubayanus*- corteza de *Nothofagus* y de hongos parásitos de estos árboles (Libkind et al., 2011) y de corteza y semillas de *Araucaria araucana* (Rodriguez et al., 2014)- como también de bebidas fermentadas

tradicionales- chichas de manzana (Rodríguez et al., 2017). Sin embargo, en procesos fermentativos industriales, como son la elaboración de vinos o sidras regionales, esta especie aún no ha sido detectada (Lopes et al., 2002); no obstante, es probable que esto sea consecuencia de la técnica de aislamiento de levaduras utilizada. Normalmente la temperatura de incubación durante el aislamiento osciló entre 25°C y 30°C, este rango de temperatura favorece ampliamente el desarrollo de *S. cerevisiae* y afecta el de *S. uvarum*, una especie criotolerante.

Es por ello que en este capítulo exploraremos las características de mayor relevancia biotecnológica en relación a la industria sidrera utilizando diferentes cepas de *S. uvarum*.

En función de los objetivos planteados este capítulo se organizó en dos partes:

Parte 1: Se realizó la evaluación de la aptitud fermentativa en mosto de manzana y de otras características fisiológicas relevantes de cepas de las especies criotolerantes *S. uvarum* y *S. eubayanus* disponibles en la colección de microorganismos del PROBIEN. Se analizaron también las propiedades fisicoquímicas y aromáticas de las sidras base obtenidas con cada una de ellas. Posteriormente, las cepas con mejores características se utilizaron para fermentar a escala semipiloto y los productos finales fueron analizados desde el punto de vista fisicoquímico, aromático y sensorial.

Parte 2: Se profundizó la búsqueda de nuevas cepas criotolerantes de *S. uvarum* en ambientes fermentativos industriales (mostos de manzana provenientes de sidrera). En este contexto se evaluó la diversidad de levaduras presentes en fermentaciones de mostos de manzana realizadas a bajas temperaturas y se seleccionó, siguiendo los mismos protocolos usados en la parte 1, una cepa con las mejores características para ser comparada con la seleccionada anteriormente. Esta comparación se realizó nuevamente en fermentaciones a escala semipiloto.

MATERIALES

1. Mostos

Se utilizaron mostos de manzanas de las siguientes variedades: Royal Gala, Granny Smith, Red Delicious y Pink Lady y mosto de pera Packams/D'anyou. Las características de los mismos se detallan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características fisicoquímicas de los mostos utilizados para las diferentes fermentaciones en este capítulo

Mosto	Cosecha	°Brix	Azúcares reductores totales	Acidez total	SO ₂ total mg/L	SO ₂ libre mg/L	pH	Escala de Fermentación	Utilizados en RESULTADOS punto
Royal Gala RG	2012	11,9	125,7	4,73	112	70	3,56	35 mL 1 L	Etapa 1: 1.1
Granny Smith GS	2012	12,5	132,3	5,58	90	58	3,54	1 L	Etapa 1: 1.3
Granny Smith GS	2014	12	121	5,77	0	0	3,7	1 L	Etapa 2: 1.1
Red Delicious RD	2014	12,5	130	4,28	0	0	3,4	1 L	Etapa 2: 1.1
Granny Smith GS	2015	12,8	130	6,03	*	*	3,58	10 L	Etapa 1: 1.4
Granny Smith GS	2016	12,8	148,2	5,94	0	0	3,52	35 mL 10 L	Etapa 2: 1.4 Etapa 1: 1.5
Granny Smith GS	2018	12,5	123,7	5,62	**	**	3,52	10 L	Etapa 2: 1.6
Pink Lady PL	2018	13	113,7	5,01	**	**	3,72	10 L	Etapa 2: 1.6
Packams/D'Anjou P/D	2018	12,8	112,9	3,02	**	**	4,21	10 L	Etapa 2: 1.6

*. Mosto suplementado con 100 mg/L de K₂S₂O₅

**.. Mosto suplementado con 200 mg/L de K₂S₂O₅

2. Levaduras

Se utilizaron 19 cepas de la especie *S. uvarum* y 13 de *S. eubayanus* previamente aisladas y caracterizadas a nivel molecular en nuestro laboratorio (Rodríguez et al., 2017, 2014). Además, se agregó a modo comparativo la cepa vínica regional de la especie *S. cerevisiae* NPCC1178. Todas las cepas se encuentran depositadas en el banco genético NPCC (North Patagonian Culture Collection) localizado en el PROBIEN (CONICET-UNCo), Neuquén, Argentina. La geolocalización y origen de las cepas utilizadas en este capítulo se detallan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Origen y geolocalización de las cepas utilizadas en las fermentaciones a 35 mL

Especie	Área de muestreo	Fuente	NPCC	mtDNA-RFLP	Referencia			
<i>S. eubayanus</i>	Caviahue, Argentina -38,4679722; 71,0894444	<i>A. araucana</i>	1282	E4	Rodríguez et al. 2014			
			1283	E2				
			1284	E5				
			1285	E6				
			1286	E1				
			1287	E3				
	Tromen, Argentina -39,9546127; 71,69547611	<i>A. araucana</i>	1291	E12	Rodríguez et al. 2014			
			1292	E8				
			1294	E13				
			1296	E7				
			1297	E9				
			1301	E10				
			1302	E11				
<i>S. uvarum</i>	Huechulafquen, Argentina -39,8132062; -71,1902905	<i>A. araucana</i>	1289	U1	Rodríguez et al. 2014			
			1293	U2				
			Tromen, Argentina -39,9546127; 71,69547611	<i>A. araucana</i>		1298	U3	Rodríguez et al. 2014
						1290	U4	
						1288	U5	
	Villarrica, Chile -39,2798444; -72,2307167	Chicha de manzana	1309	U-I	Rodríguez et al. 2017			
			1311	U-II				
			1323	U-III				
			1324	U-IV				
			1328	U-V				
			1330	U-VII				
	Pucón, Chile -39,2681389; -71,9785944	Chicha de manzana	1309	U-I	Rodríguez et al. 2017			
			1314	U-VIII				
			1317	U-IX				
	Tirúa, Chile -38,337333; -73,4962944	Chicha de manzana	1309	U-I	Rodríguez et al. 2017			
			1315	U-X				
1316			U-XI					
1319			U-XIII					
1320			U-XIV					
			1321	U-XV				
			1322	U-XVI				

3. Medios de Cultivo

3.1. Medios de Cultivo generales

Medio GPY-caldo (m/v): 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % peptona, 2 % glucosa.

Medio GPY-agar (m/v): 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % peptona, 2 % glucosa, 2 % agar.

3.2. Medio para esporulación

Medio de acetato de potasio (m/v): 1 % acetato de potasio, 0,1 % Glucosa, 0,125 % extracto de levadura, 2 % agar.

3.3. Medios de cultivo para determinación actividad enzimática y antagonista

Medio agar-leche (m/v): 0,67 % YNB (*Yeast Nitrogen Base* con sulfato de amonio), 0,2 % glucosa, 1 % de leche descremada en polvo, 2 % agar.

Medio agar-peptina (m/v): 0,67 % YNB (*Yeast Nitrogen Base* con sulfato de amonio), 4% peptina, 2 % agar.

Medio de agar-arbutina (m/v): 0,67 % YNB (*Yeast Nitrogen Base* con sulfato de amonio), 0,5% arbutina, 2 % agar.

Medio de agar-esculina (m/v): 0,67 % YNB (*Yeast Nitrogen Base* con sulfato de amonio), 0,5 % esculina, 0,1 % glucosa, 0,02 % citrato de amonio férrico 2 % agar llevado a pH 5.

Medio YEPD-MB (m/v): 1 % extracto de levadura, 2 % glucosa, 2 % peptona, 2 % agar, 0.0003 % metileno azul llevado a pH 4.6 con 0,5 M de solución reguladora citrato-fosfato.

4. Soluciones utilizadas para las determinaciones fisicoquímicas y aromáticas

Solución de NaOH 0,1 N

Solución de NaOH 0,5 N

Solución de KOH 1 N

Solución de fenolftaleína al 0,5 % m/v.

Solución de Iodo 50 N

Solución de almidón 1%

Reactivo de DNS: 2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 75 g de tartrato de sodio y potasio y 8 g de cloruro de sodio en 250 mL de agua destilada.

Estándares usados en Cromatografía Gaseosa (GC): Los estándares utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, excepto 1-propanol, acetato de etilo, 1-butanol, metanol que fueron adquiridos en Merck y el alcohol bencílico marca DR. EHRENSTORFER.

Estándares para cromatografía Líquida de alta performance (HPLC): Los estándares de los ácidos orgánicos: málico, shikímico, cítrico, láctico y acético, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich calidad HPLC.

5. Reactivos utilizados en estudios moleculares

5.1. Soluciones para extracción de ADN y electroforesis

Solución 1 (400 mL): 372,27 mL sorbitol 1 M y 72,72 EDTA mL 0,5 M.

Solución 2 (400 mL): 20 mL de Tris-HCl 1 M, 16 mL de EDTA 0,5 M y H₂O destilada c.s.p. 400 mL. Ajustada a pH 7,4 y autoclavada.

Acetato de potasio, AcK (5M/3M): a 60 mL de una solución de AcK 5 M se añadió ácido acético glacial hasta llegar a pH 4,8 y se llevó a 100 mL con H₂O destilada.

Solución reguladora TBE 5X: 45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 8.

5.2. Enzimas y reactivos

-La Zimoliasa 20T utilizada fue provista por *US Biological* (Estados Unidos), y se utilizó resuspendida en Solución 1 (2 mg/mL)

-La *Taq* ADN polimerasa, Cl₂Mg y dNTPs fueron provistos por Inbio Highway (Argentina).

-Los cebadores *nl-1*, *nl-4*, *p24*, *p28*, *bre5*, *cat8*, *cyc3*, *gal4*, *met6*, *egt2*, *mnl1*, *cox2* fueron suministrados por Genbiotech (Argentina). La secuencia de los cebadores se detalla en la Tabla 1.3.

-Enzimas *Hinf I* y RNAasa fueron provistas por Roche Diagnostics© (Germany)

-Las enzimas de restricción *Hinf I*, *Asp I*, *Msp I*, *Taq I* fueron provistas por Thermo Scientific (Estado Unidos).

-Los marcadores de peso molecular de 100 bp y 50 bp fueron provistos por Inbio Highway (Argentina).

-La agarosa fue provista por Genbiotech (Argentina).

-El *Gel Red* fue de la marca por Biotum (California).

-El Sorbitol fue provisto por Anedra (Argentina).

-El agua milliQ utilizada fue de Sintorgan® (Argentina).

-El kit de purificación de ADN fue de la marca AccuPrep® (Cat.No. k-3034,K-3034-

1) Bioneer, Inc., Korea.

El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad pro-análisis.

Tabla 1.3. Secuencias de los cebadores utilizados en este trabajo

Cebador	Foward	Reverse
<i>nll-nl4^a</i>	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG
<i>bre5^{b, c}</i>	5'TGATTATAGCCACGGGTGARATGTTYTGG	5'TTCATTCATCAACTTTGAGGCCCATGTCAT
<i>cat8^{b, c}</i>	5'TCCAATATTAGTATCAACAACCTTTCTATAYCARAAYGA	5'CTACTTGGCRTTTTGCCAYTGRAA
<i>cy3^{b, c}</i>	5'CTACAAAAAATGGGTTGGTTTTGGGG	5'GGGAACAGTAGGCCGCACARRTGCATCCA
<i>egt2^{b, c}</i>	5'-GTACGGACCCAGAYCAYTGGTT	5'CATTGGTAAATCAACRGTRAACCA
<i>gal4^{b, c}</i>	5'TGTGCCAAGTGTCTGAAGAAYAAYTGGGA	5'GCGATTTCAATCTGATTATTRTACARCATCAT
<i>met6^{b, c}</i>	5'CTAGACCTGTCTATTGGGTCCAGTTTCTTACTT	5'TTAGCTTCTAGGGCAGCAGCAACRTCTTGACC
<i>mnl1^c</i>	5'TCGTTGAAAAC TAARTGTAAAAAYGAYTGG	5'ATCTCACCTCTTGGGRCAACCACAT
<i>cox2^c</i>	5'ATTTATTGTTCTTTAATCA	5'GGTATTTTAGAATTACATGA
<i>p24^e</i>	5'GCGTGACTTG*	
<i>p28^e</i>	5'AGGAGGAGGA*	

a- Amplificación del dominio D1/D2 correspondiente a la región 26S del rDNA

b- Genes nucleares con los que se realizó RFLP-PCR para caracterización de especies del género *Saccharomyces*

c- Genes nucleares secuenciados

d- Gen mitocondrial secuenciado

e- Cebadores utilizados para la técnica de RAPD-PCR para caracterización a nivel de cepa

*-Se amplifica utilizando un único cebador

MÉTODOS

1. Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron utilizando diferentes mostos y con diferentes objetivos. Las dos temperaturas de fermentación ensayadas en esta tesis fueron 20°C, debido a que la misma representa la temperatura óptima de crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo (Origone et al., 2017) y 13°C debido a que representa la temperatura más baja en la que se conocen las propiedades de fermentación de las levaduras pertenecientes a la especie *S. uvarum* y *S. eubayanus* (Lopes-Malo et al., 2013; Magalhães et al., 2017a). A continuación, se describe la metodología que se utilizó en cada caso.

1.1. Fermentaciones a escala de laboratorio

1.1.1. Para evaluación de características de las levaduras

Microfermentaciones de 50 mL

Las microfermentaciones fueron llevadas a cabo en frascos color caramelo de 50 mL conteniendo 35 mL de mosto de manzana esterilizado (120 °C, 15 minutos) variedad Royal Gala cosecha 2012 y Granny Smith 2016 (ver Tabla 1.1). Las fermentaciones fueron inoculadas individualmente con las cepas correspondientes a cada ensayo en una concentración de 2×10^6 células/mL y se incubaron a 20°C sin agitación. La evolución de la fermentación fue seguida diariamente por medición de la pérdida de peso hasta no observar

cambios en dos medidas consecutivas. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Fermentaciones de 1 L

Se realizaron en frascos de 1 L conteniendo 800 mL de mosto sometido a vapor fluyente por 15 min a fin de reducir la carga microbiana sin afectar significativamente a los distintos compuestos químicos precursores de los aromas secundarios. Se utilizaron dos variedades de manzana: Royal Gala y Granny Smith cosecha 2012 (ver Tabla 1.1). Las fermentaciones fueron inoculadas individualmente con las cepas correspondientes a cada ensayo en una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL y se incubaron a 20°C o 13°C sin agitación y se siguió la evolución por medición diaria de °Brix. Todas se realizaron por duplicado.

1.1.2. Para aislamiento de levaduras

Las mismas se realizaron con mosto sin esterilizar de la variedad Granny Smith y Red Delicious cosecha 2014 (ver propiedades en Tabla 1.1) en frascos de 1 L conteniendo 800 mL de mosto. Se realizaron a 13 °C y 25 °C, por duplicado y la evolución de las mismas se siguió por medición diaria de °Brix. Se tomaron muestras en el estadio inicial, medio y final de las fermentaciones para el aislamiento e identificación de levaduras naturales.

1.2. Fermentaciones a escala semipiloto

Se llevaron a cabo en bidones de 10 L conteniendo 8 L de mosto Granny Smith cosecha 2015, 2016 y 2018, mosto Pink Lady y mosto de pera variedad Packams/D'anjou ambos cosecha 2018 y sin esterilizar (ver Tabla 1.1). Las fermentaciones se inocularon con cepas seleccionadas y se realizaron a dos temperaturas 13°C y 20°C por duplicado. La evolución se siguió por medición diaria de °Brix hasta valor constante y luego por medición de azúcares reductores totales por el método de DNS. El proceso se consideró finalizado cuando la concentración de azúcares residuales fue menor a 2 g/L. Luego de finalizada la fermentación se realizó la corrección del contenido de SO₂ para obtener un producto con 50 mg/L de SO₂ libre (ver punto 2.2). Posteriormente se realizó la clarificación que consistió en el agregado de 1 g/L de bentonita hidratada que permite la floculación y decantación de las levaduras y otros sólidos. Luego se realizó el trasiego que consiste en retirar el caldo base por decantación

obteniendo un líquido clarificado (sidra base) que se utilizó para la elaboración de las sidras con segunda fermentación o sidras gasificadas artificialmente.

1.2.1. Gasificación por segunda fermentación

Para realizar la segunda fermentación las levaduras fueron pre-adaptadas al etanol siguiendo el protocolo que se utiliza en las sidreras para realizar el denominado “tiraje” que implica la adaptación de las levaduras a las concentraciones de etanol del caldo base (producido en la 1° fermentación) para el posterior embotellado y se detalla a continuación:

1. Se mezclaron 5 g de azúcar en 200 mL de agua a 25 °C y se agregó una concentración de $2 \cdot 10^8$ células/mL
2. A las dos horas se agregó 20 mL de caldo base (conteniendo aproximadamente 7 %v/v de etanol) y 20 mL de agua a 25 °C.
3. A la hora se agregó 40 mL del mismo caldo base y 40 mL de agua.
4. A la hora se realizó nuevamente el paso 3 y se agregó 5 g de azúcar (sacarosa comercial).
5. A las cuatro horas se agregó 7 g de azúcar y 200 mL de caldo base y 100 mL de agua.
6. A las dos horas se agregó 200 mL de caldo base
7. Pasado 12 horas se agregó 7 g de azúcar y 200 mL de caldo base
8. Pasadas seis horas se repitió el paso 7
9. Pasadas seis horas más, nuevamente se repitió el paso 7 y se adaptó el pie de cuba a 15 °C por dos horas, temperatura en la que están los caldos base (de la 1° fermentación), con el objetivo de que el pie de cuba esté a la misma temperatura y las levaduras no sufran ni estrés por etanol ni por temperatura.
10. Se realizó nuevamente recuento de células para inocular una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL en la botella con la cepa correspondiente.

Posteriormente se fraccionó esta preparación (caldo base+ pie de cuba) en botellas de 780 mL conteniendo 750 mL de la sidra base y 30 mL de azúcar (520 g/L de sacarosa comercial) para lograr una concentración final de 20 g/L. Las botellas se taparon con bidules (para retención de levaduras) y tapas de chapa. La segunda fermentación se llevó a cabo en la botella en posición horizontal por aproximadamente 20 días o hasta que la presión en

botella sea de 6 atmosferas. Posteriormente se sometieron a la clarificación en botella utilizando el método *champenoise* que consistió en la puesta en pupitres y rotación cada tres días de las botellas por un periodo aproximado de 6 meses, para luego eliminar los bidules en el proceso conocido como “degüelle”. Por último, se realizó la corrección de acidez por agregado de 0,1 g/L de ácido cítrico y el agregado de 30 mL de líquido de expedición (que consiste en sacarosa comercial en una concentración de 300 g/L) para conseguir un producto con 12 g/L final de azúcar correspondiente a un corte *extra brut* según la clasificación de acuerdo al contenido de azúcar final de las bebidas establecido por el Reglamento Vitivinícola del Mercosur. Los pasos mencionados se esquematizan de forma sintética en la Figura 1.1.

1.2.2. Gasificación artificial

Otro método que utilizamos para gasificar los caldos base y obtener sidras fue la gasificación artificial. Los caldos base fueron tratados de igual forma que se mencionó previamente, donde se realizó la corrección por sulfito para obtener sidras con 50 mg/L de SO₂ libre final, trasiego, clarificación con bentonita y desborrado. Luego se agregó azúcar (sacarosa comercial) para obtener sidras con 30 g/L de azúcar correspondientes a la clasificación *demi sec*. La corrección de la acidez se realizó únicamente en las sidras de pera agregando 0,5 g/L de ácido cítrico. La gasificación se realizó de manera artificial agregando CO₂ contenido en una garrafa, y se inoculó utilizando un sifón que contiene una válvula que permite el agregado del gas con una presión aproximada de 3 atmósferas (Figura 1.1).

2. Parámetros fisicoquímicos en sidras

2.1. Azúcares y alcoholes

Los azúcares reductores totales, evaluados en los mostos y en el seguimiento de las fermentaciones se realizaron siguiendo la técnica DNS descrita por Miller 1959.

Los azúcares de los caldos base y sidras obtenidas como ser la glucosa, fructosa y sorbitol y los alcoholes: etanol y glicerol se determinaron por cromatografía líquida HPLC (en el laboratorio de Cromatografía del PROBIEN, CONICET-UNCo) utilizando el equipo Agilent 1260 (Quat Pump VL, ALS, TCC) con detector RID 55°C. La fase estacionaria se llevó a cabo con una columna HIPLEX H (300 x 7,7 mm) y la fase móvil se realizó por

gradiente isocrático (100 % H₂SO₄ 0,001 M Flujo: 0,4 ml/min). Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon 0,22 µm e inyectadas directamente (20 µL) en la columna cromatográfica. Las soluciones estándar fueron de pureza HPLC mayor a 99,8 % provistas por SIGMA. Los valores calculados para cada muestra fueron el resultado de dos medidas experimentales.

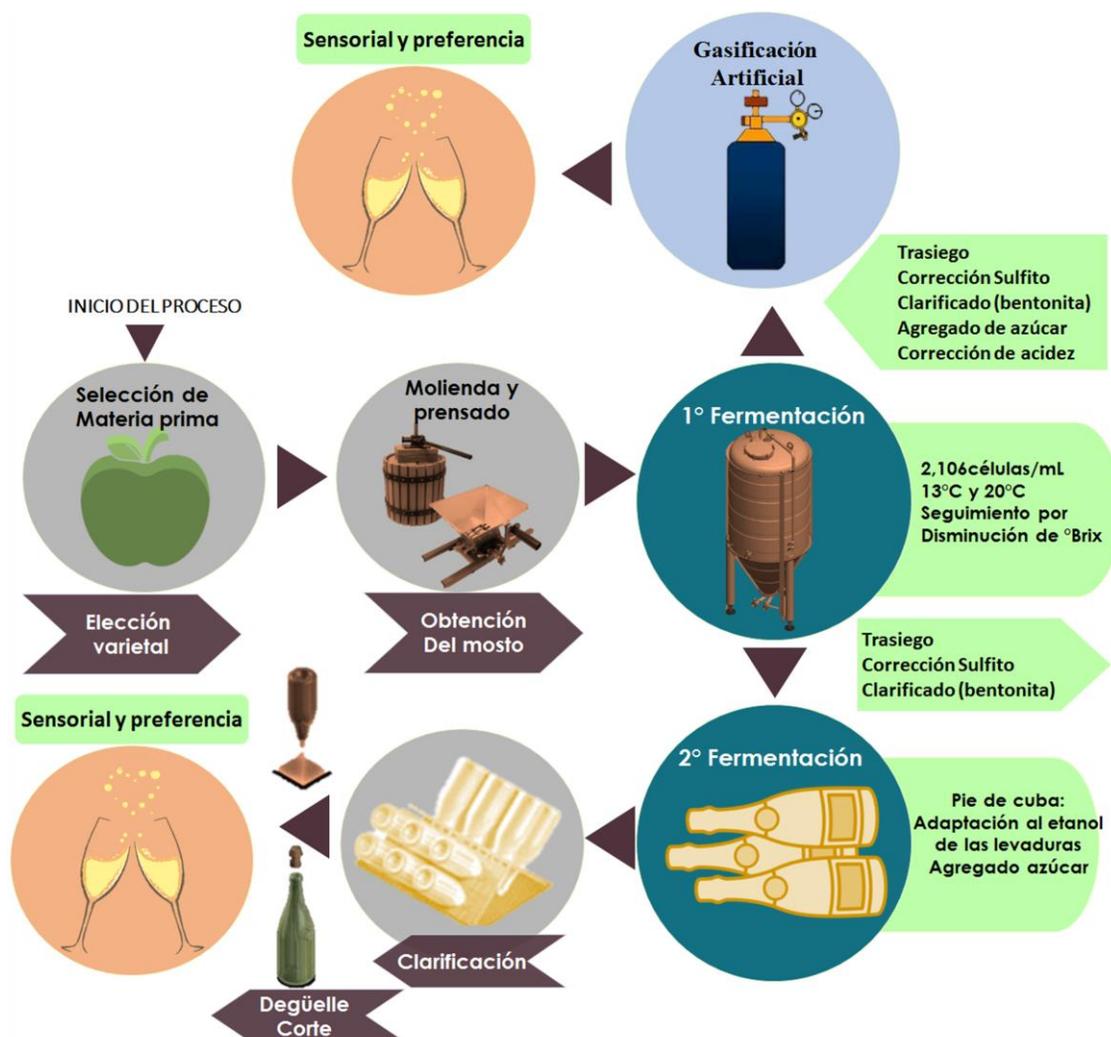


Figura 1.1. Resumen del proceso de elaboración de sidras con segunda fermentación en botella y gasificación artificial.

2.2. Dióxido de azufre libre y total

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ribereau-Gayon *et al.* (2003). El SO₂ libre se determinó mediante titulación directa con yodo y el SO₂ total se determinó mediante tratamiento de muestra con KOH (1 N) seguido por valoración con yodo.

2.3. Sólidos solubles

Se determinó por refractometría a 20 °C utilizando un refractómetro de mano marca ICOSA-OPTIC. Los resultados se expresaron en °Brix (% m/m).

2.4. pH

Se determinó empleando pH-metro (Oakton) con electrodo de pH rango de 0 a 14. Previo a cada medición, el equipo se calibró utilizando soluciones estándar de pH 4 y pH 7 a 20 °C.

3. Determinación de compuestos aromáticos

3.1. Ácidos orgánicos

La determinación de los ácidos orgánicos acético, láctico, málico y shikímico se determinaron en el laboratorio de cromatografía del PROBIEN (CONICET-UNCo) siguiendo la metodología detallada en el ítem 2.1 utilizando un detector DAD (214 nm).

3.2. Esteres, Alcoholes Superiores, Acetaldehído, Terpenos, Fenoles volátiles y Metanol

La determinación de los alcoholes superiores 1-butanol, alcohol isoamílico y alcohol isobutílico y los ésteres acetato de etilo y lactato de etilo se realizó mediante cromatografía gaseosa en un equipo GC 7890 (HS-GC-FID), equipado con detector de ionización por llama (FID) y una columna capilar HP-Innowax (Hewlett-Packard) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase. Como fase móvil se empleó Helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 220°C y la del detector de 250°C. La temperatura del horno fue inicialmente de 35°C durante 10 min y con gradientes térmicos de 2,5°C/min hasta 180°C, de 5°C/min hasta 240°C, temperatura que se mantuvo durante 15 min.

La determinación de los alcoholes superiores 1-hexanol, 1-propanol y 2-feniletanol y alcohol bencílico, de los ésteres acetato de hexilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo,

acetato de 2 feniletilo, acetato de bencilo, butirato de etilo, decanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo, los terpenos alfa-terpineol, limoneno, linalol, nerol y geraniol, los fenoles volátiles 4-etilfenol y 4-etilguaiacol y el acetaldehído se realizó mediante cromatografía gaseosa con microextracción en fase sólida y detector de espectrometría de masas (SPME-GC-MS) con una columna capilar HP-Innowa (Hewlett-Packard) 60 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,5 μm de espesor de fase. La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector de 260°C. La temperatura del horno fue inicialmente de 40 °C durante 7 min y con gradientes térmicos de 2,5 °C/min hasta 180°C, de 5°C/min hasta 260°C, temperatura que se mantuvo durante 15 min.

La identificación de los picos se realizó teniendo en cuenta el tiempo de retención del compuesto y el de los estándares inyectados.

4. Detección de actividades enzimáticas

La evaluación de las actividades enzimáticas proteasa, pectinasa y β -glucosidasa se realizó de manera semicuantitativa en placa. Se sembraron 5 μL de la suspensión de 1.10^7 células/mL de la levadura a evaluar, obtenida a partir de un cultivo joven desarrollado en GPY. Luego de la incubación a 25°C se evidenció la presencia/ausencia de un halo alrededor de la colonia como indicativo de la presencia/ausencia de actividad enzimática, respectivamente. En los casos positivos (presencia de actividad) se midió el diámetro del halo a fin de semicuantificar la capacidad de producción de cada actividad enzimática ensayada. A continuación, se describen las particularidades y medios de cultivo utilizados en cada caso.

4.1. Actividad proteasa

Se llevó a cabo en placas de Petri utilizando medio de cultivo agar-leche. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días y la presencia de una zona clara alrededor de la colonia fue indicativa de actividad proteolítica (Gonzalez et al., 2004).

4.2. Actividad pectinasa

Se realizó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar-pectina adicionado con una solución de Lugol 1 %m/v. Se utilizó pectina cítrica a pH 5. Luego de la inoculación, las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días (Strauss et al., 2001). El revelado de la actividad

enzimática se realizó por visualización directa de la placa observándose un halo claro alrededor de la colonia respecto del resto del medio de color violeta-marrón (Fernandes-Salomão et al., 1996).

4.3. Actividad β -glucosidasa

Para evaluación de esta actividad las levaduras se sembraron en tubos de hemolisis (5 mL) conteniendo de 2,5 mL de un medio YNB-agar básico con 1 mM de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) o p-nitrofenil- β -Dxyloside (pNPX) para evaluar actividades β -glucosidasa (β Gl) o β -xilosidasa (β Xy), respectivamente. Los tubos se incubaron durante 5 días a 25°C. Las colonias que presentaron actividad enzimática fueron identificadas por el cambio de coloración del medio de cultivo (de transparente a color amarillo). En este caso, se utilizó una escala arbitraria de intensidad de color del medio de cultivo a fin de determinar las mejores productoras de β -glucosidasa (Rosi et al., 1994). Además, se evaluó la actividad β Gl en medio agar esculina mostrando actividad enzimática las colonias que desarrollaron un halo marrón oscuro alrededor de la colonia (Hernandez et al., 2003).

5. Actividad antagonista

La actividad antagonista se evaluó usando el método conocido como método *killer*, en placa conteniendo medio de cultivo YEPD-MB (Sangorin et al., 2002). Se utilizaron como referencias dos cepas sensibles de colección: *S. cerevisiae* P351 y *Candida glabrata* NCYC388. La presencia de un halo de inhibición alrededor de la estría rodeado o no por una zona azul de células muertas indica la presencia de actividad antagónica.

6. Criterios de selección de levaduras

La selección de levaduras para llevarlas a escalas de fermentación mayores (1L y escala semipiloto) se tuvieron en cuenta las siguientes propiedades basadas en las principales características de interés reportadas por diferentes autores:

- Cinética de fermentación: Incluyendo mayor producción de CO₂, velocidad de fermentación, tasa de consumo de sustrato (de azúcares) (Belloch et al., 2009; Tronchoni et al., 2009).

- Actividad enzimática y antagonista en contra de cepas que se encuentran en ambientes de fermentación (Gonzalez et al., 2004; Sangorin et al., 20002).
- Mayor producción de glicerol y menor producción de acidez volátil (Gonzalez et al., 2006).
- Producción de alcoholes superiores, esteroides, fenoles volátiles y terpenos dentro de los umbrales de percepción óptimos (Swieger et al., 2005).
- Baja producción de metanol y SO₂ (Swieger et al., 2005).

7. Aislamiento e identificación de levaduras

7.1. Aislamiento

El aislamiento de las levaduras se realizó a partir de las fermentaciones espontáneas descritas en el ítem 1.2 para los mostos Red Delicious y Granny Smith realizadas a dos temperaturas 13°C y 20°C. Se tomaron muestras a partir de los estadios inicial, medio (8° Brix) y final (valor estable de 4 °Brix). El estadio inicial fue común para las fermentaciones llevadas a cabo en ambas temperaturas. A partir de una alícuota de cada etapa se realizaron diluciones (10⁻⁵; 10⁻⁶) en agua destilada estéril y posteriormente se sembraron las mismas en placas de GPY-agar suplementado con cloranfenicol (50 mg/L). Luego de 2-4 días de incubación, se tomaron 20 colonias al azar de cada placa y se preservaron a -20°C en glicerol (20 %v/v) para futuros análisis.

7.2. Identificación

La identificación de las levaduras se realizó por el método de secuenciación del dominio D1/D2 perteneciente a rDNA 26S (Kurtzman, 2003). Para ello se realizó la extracción del ADN total de las colonias aisladas utilizando el protocolo de extracción de ADN propuesto por (Lopez et al., 2001) con modificaciones que se detalla a continuación:

1. Las levaduras se incubaron por 24hs en 1mL de GPY-líquido
2. Se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min.
3. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y de centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores. Este paso se repitió dos veces más para lavar bien el sedimento de células.

4. Se centrifugó (3000 x g 5min) para decantar el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 μ L de la Solución 1.
5. Se añadió 30 μ L de una suspensión de Zimoliasa 20T (2 mg/mL) y se homogeneizó bien la suspensión con ayuda de una micropipeta.
6. Se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación (200 rpm).
7. Se centrifugó a 10000 x g durante 3 min y se descartó el sobrenadante.
8. Se resuspendió el sedimento con ayuda de una pipeta automática en 500 μ L de Solución 2.
9. Se añadió 15 μ L de una solución de SDS al 10 % m/v y se agitó en *vortex*.
10. Se incubó a 65°C durante 15 min.
11. Se añadió 200 μ L de acetato potásico 5M/3M y se dejó en hielo durante 5 min.
12. Se centrifugaron las muestras a 20000 x g durante 15 min a 4°C.
13. Se transfirió el sobrenadante (700 μ L aproximadamente) a otro tubo (1,5 mL) y se conservó durante 15 min a -20°C.
14. Se centrifugó nuevamente a 20000 x g durante 15 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo (1,5 mL) con 700 μ L de isopropanol.
15. Se agitó suavemente y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min.
16. Se centrifugó a 20000 x g durante 15 min.
17. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 μ L de etanol al 70%.
18. Se repitió el paso anterior dos veces.
19. Se sacó el alcohol con ayuda de una micropipeta y se evaporaron los restos del alcohol en estufa a 50°C durante 40 min aproximadamente.
20. Una vez seco se resuspendió el sedimento en 20 μ l de agua milliQ.
21. Se conservar las muestras a -20°C hasta su utilización.

Posteriormente se realizó la amplificación por PCR del dominio D1/D2 perteneciente a rDNA 26S (Kurtzman y Robnett, 2003) utilizando los cebadores *nl1* y *nl4* (Tabla 1.2). La amplificación se realizó de la siguiente manera: Se resuspendieron 2 μ L de ADN diluido (1/20) en 18 μ L de la mezcla de amplificación conteniendo 0,16 μ L de solución acuosa 50 μ M de cada cebador, 1,6 μ L de una solución acuosa 1 mM de deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 0,8 μ L de MgCl₂ (25 mM), 4 μ L de solución reguladora para *Taq* ADN

polimerasa (1X), 11,2 µL de agua destilada estéril y 0,1 µL de *Taq* ADN polimerasa (1 U/µL). Los parámetros del termociclador fueron: un ciclo de desnaturalización (95°C por 5 min), luego 35 ciclos de tres pasos, desnaturalización (94°C por 1 min), hibridación (55,5°C por 2 min) y extensión (72°C por 2 min) y por último un ciclo de extensión (72°C por 10 min).

Los amplicones obtenidos se separaron en geles de agarosa al 1,5 % m/v, con solución reguladora TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron con *Gel Red 5000X* (0,3 µL/mL) y se revelaron bajo luz ultravioleta (UV). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de ADN de 100 pb.

Una vez evidenciada la correcta amplificación las muestras, los amplicones se purificaron utilizando los kits de purificación de marca Bioneer Inc (Korea) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La secuenciación se realizó utilizando el servicio de MacroGen (Korea) y las secuencias obtenidas como se compararon con las disponibles en la base de datos de NCBI utilizando BLASTn. Para identificar las especies se compararon con las cepas tipo más cercanas disponibles en la base de datos del NCBI.

7.2.1 Identificación de especies del género *Saccharomyces*

Debido a que el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 no permite diferenciar entre las especies hermanas *S. uvarum* y *S. eubayanus*, se procedió a la caracterización por RFLP-PCR de seis genes nucleares: *BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2* utilizando las enzimas de restricción *Hinf I*, *Msp I*, *Hinf I*, *Taq I*, *Asp I* y *Hinf I* respectivamente, siguiendo la metodología propuesta por Perez-Tráves et al. 2014 y Rodriguez et al. 2017. La misma se resume a continuación:

La amplificación se realizó siguiendo la misma metodología detallada en el punto 6.2 para el dominio D1/D2, los cebadores se detallan en la Tabla 1.3. Los productos de PCR se digirieron con la endonucleasa de restricción respectiva para cada gen a 37°C con excepción de la digestión llevada a cabo con la enzima *Taq I* que se realizó a 60°C (temperatura óptima de digestión de esta enzima) todas *over night*. Los amplicones, como también los fragmentos de restricción obtenidos se separaron en geles de agarosa al 1,5 %m/v y 3 %m/v respectivamente, con solución reguladora TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron y revelaron de la misma forma que se detalló en el punto 6.2.

Los perfiles RFLP-PCR obtenidos se compararon con los descriptos por Pérez-Través et al., 2014 y Rodríguez et al., 2017 para identificar las especies del género *Saccharomyces*.

7.3. Caracterización molecular de cepas de las levaduras identificadas como *S. uvarum*

Para la caracterización intraespecífica se realizaron dos técnicas: RAPD-PCR (Amplificación por PCR al azar de regiones polimórficas del ADN) y mtDNA-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial).

7.3.1. RAPD-PCR

La amplificación se realizó utilizando los cebadores *p24* y *p28* respectivamente siguiendo la metodología descrita por Baleiras Couto et al. 1996 con modificaciones. La misma se llevó cabo en un volumen final de 20 μ l de una mezcla de reacción conteniendo 8,3 μ L de agua destilada estéril, 4 μ L de solución reguladora para *Taq* ADN polimerasa (1X), 0,8 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1,8 μ L de una solución acuosa 1 mM de deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1 μ L de cebadores *p24* o *p28* (50 μ M) según se requiera, 0,1 μ L de *Taq* polimerasa (1 U/ μ L) y 4 μ L de ADN diluido (1/20). Los parámetros del termociclador fueron: 35 ciclos consistentes de tres pasos, desnaturalización (92 °C 1 min), hibridación (72°C 1min) y extensión (72°C 5 min) y por último un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % con tampón TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron y revelaron de la misma forma que se detalló en el punto 6.2.

7.3.2. mtDNA-RFLP

A 15 μ l de ADN puro obtenido como se describió previamente se agregaron 2 μ L de RNAsa, 1,5 μ L de la enzima de restricción *Hinf* I, 2,5 μ L de la solución reguladora apropiada para la enzima y 4 μ L de agua destilada estéril. La mezcla se incubó *over night* a 37°C y los fragmentos se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % a voltaje constante (90 V). Luego, los geles se tiñeron y revelaron como se detalló en el punto 6.2. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador *Pst*I λ que posee una escala que va de 300 a 11000 pb (Lopez et al., 2001).

8. Índice de Biodiversidad

El índice de Biodiversidad de Shannon-Weaver H' (Shannon y Weaver, 1964) se calculó siguiendo la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

Donde p_i es la abundancia relativa ($\frac{n_i}{N}$), N es el número total de individuos y n_i es el número total de individuos de cada especie.

9. Métodos estadísticos

Se utilizaron análisis estadísticos inferenciales para modelar las cinéticas de fermentación y análisis descriptivos multivariados y análisis de varianza para comparación de diferentes variables. A continuación, se describe cada uno de ellos.

9.1. Cinéticas de fermentaciones

9.1.1. Microfermentaciones de 50 mL

Los procesos de fermentación se siguieron por pérdida de peso y las cinéticas de liberación de CO_2 obtenidas se modelaron con la función de Gompertz modificado (Arroyo-López et al., 2009) utilizando el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Los datos correspondientes a cada ensayo fueron ajustados mediante una estimación no lineal minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores observados de la variable dependiente respecto a los predichos por el modelo. La función que describe el modelo es la siguiente:

$$\Delta P = A * \exp\left(-\exp\left(\left(\frac{\mu * 2.718282}{A}\right) * (\lambda t) + 1\right)\right)$$

En esta ecuación, ΔP es la pérdida de peso del sistema debido a la liberación de CO_2 (variable dependiente, en gramos), t es el tiempo (variable independiente, en horas), A es la pérdida o liberación total de CO_2 (cuyo t tiende a infinito, en gramos), μ_{\max} es la velocidad máxima de fermentación tumultuosa (h^{-1}), y λ es la duración de la fase *lag* o de adaptación

hasta el comienzo de la fermentación tumultuosa (h). La figura 1.2 muestra una curva de cinética de fermentación típica con los parámetros descriptos.

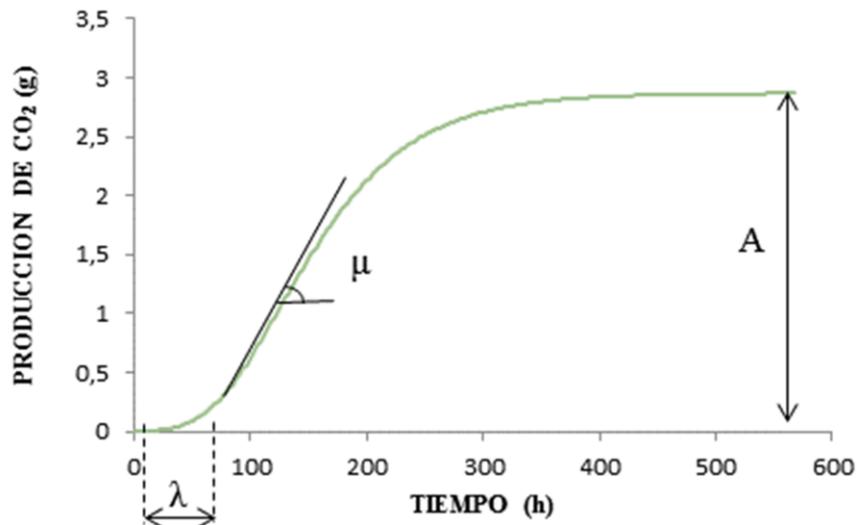


Figura 1.2: Curva de cinética de fermentación típica.

9.1.2. Fermentaciones de 1 L y semipiloto.

Los datos obtenidos de grados Brix en estas fermentaciones se modelaron utilizando modelos mixtos no lineales. Se evaluaron diferentes modelos según la naturaleza de los datos para cada caso en particular.

Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

-Ecuación exponencial de decaimiento (Arroyo-López *et al.*, 2009): $Y=D+S*e^{(-K*t)}$

Donde: Y es el porcentaje de glucosa, fructosa o grados Brix presente en el medio, t es el tiempo en horas, D es el valor específico cuyo t tiende a infinito, S es el valor estimado de cambio y K es la constante cinética o tasa de consumo de sustrato (h^{-1}) (Tronchoni *et al.*, 2009). En la Figura 1.3 (A) se muestran los parámetros descriptos, siendo el valor D la asíntota inferior, en este caso representa el valor en el que se estabilizó la fermentación en grados Brix. El valor S, representa para este análisis la caída o disminución del sustrato, a mayor caída hay mayor consumo de azúcares por parte de la levadura. Por último, el valor K (h^{-1}) representa la tasa de consumo del sustrato.

-Ecuación sigmoidea de decaimiento parametrizada por Gompertz, previamente usada por Lambert y Pearson, 2000: $Y=A+C*\exp(-\exp(K*(t-m)))$

Donde: Y es el porcentaje de sustrato todavía presente en el mosto, t es el tiempo en horas, A es la asíntota inferior cuyo t tiende a infinito, K es una constante cinética o tasa de consumo de sustrato (h^{-1}), C es la distancia entre la asíntota superior y la inferior, y M es el tiempo en el punto de inflexión (Tronchoni et al., 2009). En la Figura 1.3 (B) se representan estos parámetros. Los ajustes se realizaron utilizando el paquete nlme (descrito inicialmente por Pinheiro *et al.*, 2009) versión 3.1-117 del software estadístico libre *R studio*.

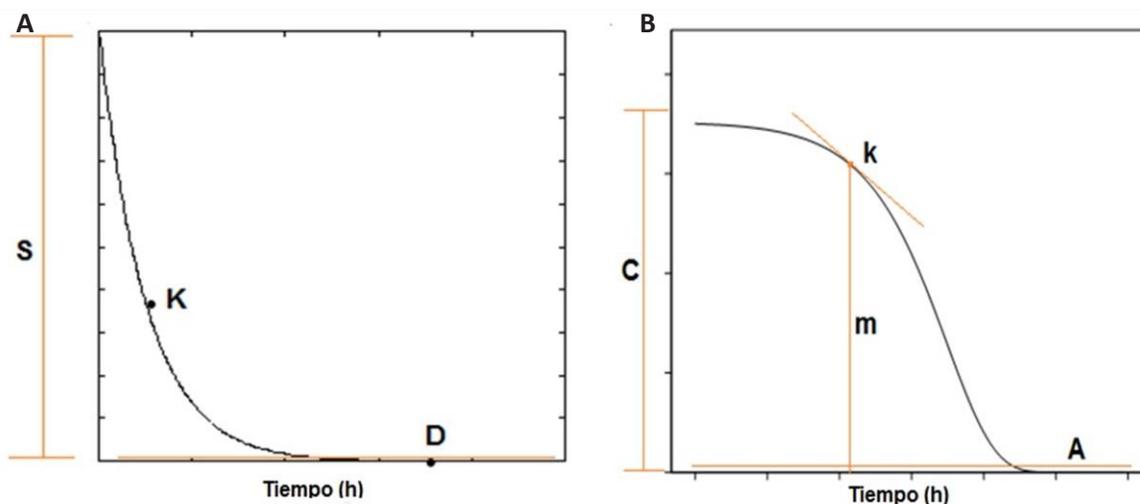


Figura 1.3: Parámetros obtenidos en las diferentes curvas de decaimiento de sustrato. **A:** Ecuación exponencial. **B:** Ecuación sigmoidea.

9.2. Análisis de datos fisicoquímicos

Se realizaron comparaciones entre medias para los datos fisicoquímicos utilizando el método de Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) y Test de Tukey de diferencia significativa honesta (HSD), utilizando un α : 0,05. La normalidad en la distribución de los datos se evaluó utilizando el Test de Lilliefors y la homocedasticidad de las varianzas con el Test de Cochran, Hartley y Barlett. Todos estos análisis se realizaron utilizando el software STATISTICA 7.0 Stat Soft Inc.

Para agrupar las cepas en función de los datos físicos y químicos obtenidos a partir de las fermentaciones se recurrió al Análisis de Componentes Principales ACP, a partir de una matriz de correlación (variables estandarizadas). Se utilizó como medida de asociación entre individuos la asociación por CLUSTERS-UPGMA (Unweighted Pair Group Method

with Arithmetic Mean), método de agrupación jerárquica. El software utilizado fue Rstudio (R core Team, 2013) utilizando los paquetes FactorMiner (Le et al., 2008), cluster (Maechler et al., 2018) y pvcust (Suzuki y Shimodaira, 2006).

10. Análisis sensorial de las sidras

El análisis sensorial de las sidras se realizó con dos tipos de público: un público no entrenado denominado público general y un público entrenado que denominamos panel de expertos. El público no entrenado estuvo compuesto de por 30 (en la parte I de este capítulo) y más de 50 comensales (en la parte II de este capítulo) que respondieron a encuestas de preferencia de los productos, el mismo se formó por personas de diferentes sexos entre un rango etario de 20-60 años. El panel de expertos estuvo formado por aproximadamente 9 personas entrenadas, de diferentes sexos y profesiones, entre ellos *sommeliers*, enólogos y productores de esta bebida referentes de la zona. Los mismos realizaron la caracterización sensorial a nivel visual, olfativo y gustativo utilizando una encuesta que se detalla en el Anexo I. Se analizaron las variables cuantitativas en una escala de 0 a 5. Entre las propiedades visuales se evaluaron características como el aguante (velocidad de liberación del gas desde el seno del líquido una vez servida la sidra en la copa), el espalme (velocidad en que desaparece la espuma superficial que deja lugar a las burbujas que se desprenden del seno de la copa) y el pegue (adherencia de la espuma a la copa). También se evaluó la intensidad de color siempre utilizando la misma escala de 0 a 5. En cuanto a las propiedades olfativas se evaluó la presencia de aromas florales, frutales, metálicos, vegetales y defectos varios. Por último, en cuanto a las propiedades gustativas se evaluó la acidez, el amargor, el cuerpo (untuosidad en boca) y los defectos gustativos.

Los datos registrados por los comensales fueron estandarizados por su medias y con los mismos se realizaron gráficos radiales para las variables cuantitativas, mientras que las variables cualitativas se utilizaron para definir propiedades individuales de los productos y se incluyeron a modo descriptivo.

Parte I

RESULTADOS PARTE I

1. Caracterización fisiológica de cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus*

1.1. Aptitud fermentativa en mosto de manzana

Las fermentaciones se realizaron a 20°C y las cinéticas se siguieron utilizando los datos de pérdida de peso debida a la liberación de CO₂. Se utilizó el modelo de Gompertz modificado (Lambert y Pearson, 2000) para ajustar los datos y a partir de este modelo se obtuvieron los parámetros cinéticos A (máxima producción de CO₂), λ (tiempo requerido para el inicio de la fermentación vigorosa) y μ_{\max} (velocidad máxima de fermentación) para cada cepa (Tabla 1.4). Al finalizar las fermentaciones se analizaron los principales parámetros fisicoquímicos en las sidras base (Tabla 1.4). Como regla general, todas las cepas pudieron terminar la fermentación alcohólica, mostrando cinéticas de fermentación similares y con concentraciones de azúcares residuales (glucosa + fructosa) menores a 0,5 g/L.

Se observaron diferencias significativas en algunos parámetros cinéticos y fisicoquímicos que parecerían relacionarse con el origen de las cepas (Tabla 1.4). Por un lado, *S. cerevisiae* presentó el mayor tiempo de latencia (λ) y produjo valores mayores de acidez volátil, mientras que la mayoría de las cepas aisladas de ambientes naturales - incluyendo tanto a las cepas de *S. eubayanus* como a las de *S. uvarum*- evidenciaron los valores más altos de A (parámetro relacionado directamente con la producción de etanol).

A fin de evidenciar de forma gráfica esta posible relación entre los perfiles de cada producto, directamente asociados con la cepa utilizada, y el origen de las cepas, todas las variables cinéticas y fisicoquímicas se utilizaron para realizar un Análisis de Componentes Principales (ACP, Figura 1.4.A). Los valores de glucosa y fructosa residuales no fueron incluidos en este análisis dado que fueron bajos para todas las sidras evaluadas. El gráfico realizado con las dos primeras componentes describió el 62,2% del total de la variabilidad observada. En el mismo se evidenciaron cuatro grupos bien definidos: el grupo I formado únicamente por las sidras fermentadas con cepas aisladas de ambientes naturales, incluyendo a las cepas de las especies *S. uvarum* y *S. eubayanus*; los grupos II y III formados por las sidras fermentadas con cepas aisladas de chicha (todas *S. uvarum*) y por último el grupo IV representado únicamente por la cepa de *S. cerevisiae*, utilizada con fines comparativos. Todos

los grupos mencionados se formaron con el respaldo del análisis de agrupamiento obtenido utilizando el algoritmo UPGMA (Figura 1.4.B).

Las sidras base incluidas en el grupo I se diferenciaron del resto principalmente por las propiedades cinéticas de las fermentaciones, que mostraron elevados valores de A y λ . Las sidras de los grupos II y III se caracterizaron por presentar elevadas concentraciones de glicerol, acidez volátil y pH. La principal diferencia entre las sidras del grupo II y III (cepa NPCC1317) fue la elevada acidez total de esta última. Por último, la sidra obtenida con la cepa NPCC1178 de *S. cerevisiae* (grupo IV) se destacó por su elevada acidez volátil.

1.2. Actividad enzimática y antagonista

Otra característica fisiológica analizada en esta Tesis por su relevancia tecnológica para la elaboración de sidras, fue la evaluación de algunas actividades enzimáticas como proteasa, pectinasa, β -glucosidasa (β Gl) y β -xylosidasa (β Xy), así como también la actividad antagonista de las levaduras.

No se observó actividad proteasa en ninguna cepa de la especie *S. eubayanus*, sin embargo, sí se observó en todas las cepas de *S. uvarum* aisladas de *A. araucana* y en 12 de 14 cepas aisladas de chicha. Contrariamente, la actividad pectinasa fue encontrada en la mayoría de las cepas de ambas especies (Tabla 1.5). Independientemente de la especie y el origen, todas las cepas exhibieron actividad β Gl cuando se utilizó como sustrato el compuesto p-nitrofenil-glucopiranosido (pNPG); sin embargo, esta actividad no fue detectada en las mismas muestras cuando se utilizó esculina como sustrato. Finalmente, la mayoría de las cepas fueron capaces de hidrolizar el sustrato sintético pNPX evidenciando actividad β -Xilosidasa (β Xy), con excepción de dos cepas de *S. uvarum* aisladas de chicha (NPCC1315 y NPCC 1322) (Tabla 1.5).

En cuanto a la actividad antagonista, sólo seis cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* P351, y de ellas, únicamente las cepas de *S. eubayanus* NPCC1297 y NPCC1302 evidenciaron además actividad antagonista frente a *Candida glabrata* NCYC 388 (Tabla 1.5).

Tabla 1.4. Características fisicoquímicas y parámetros cinéticos de las sidras base fermentadas con cepas criotolerantes de diferentes orígenes

Origen	Especie	Cepa	Parámetros cinéticos			Parámetros fisicoquímicos							
			A (g)	μ (gh ⁻¹)	λ (h)	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Acidez volátil	Acidez Total	pH		
A. araucana	S. eubayanus	1282	2,30±1x10 ^{-4bc}	0,006±1x10 ^{-5ab}	46,20±0,003 ^{bc}	<0,5	<0,5	2,97±0,01 ^{ab}	0,23±0,04 ^{abc}	5,13±0,09 ^{bc}	3,2±0,1 ^a		
		1283	2,26±0,01 ^{bc}	0,008±1x10 ^{-5bc}	46±02±2,41 ^{ab}	<0,5	<0,5	2,93±0,04 ^{ab}	0,26±0,01 ^{abc}	5,22±0,04 ^{bc}	3,3±0,1 ^{ab}		
		1284	2,28±0,05 ^{bc}	0,007±1x10 ^{-5abc}	45,31±2,60 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,55±1,02 ^{bc}	0,30±0,01 ^{abcd}	5,25±0,01 ^{bc}	3,2±0,1 ^a		
		1285	2,30±0,12 ^{bc}	0,007±1x10 ^{-5abc}	43,09±2,15 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,58±0,14 ^{cd}	0,19±0,01 ^{ab}	5,22±0,04 ^{bc}	3,3±0,1 ^{ab}		
		1286	2,16±0,05 ^a	0,006±1x10 ^{-5ab}	47,35±8,82 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,13±0,66 ^{cd}	0,26±0,01 ^{abc}	4,93±0,37 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}		
		1287	2,07±0,04 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	36,45±3,19 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,77±0,77 ^d	0,25±0,01 ^{abc}	5,19±0,01 ^{bc}	3,2±0,2 ^a		
		1291	2,16±0,01 ^a	0,008±1x10 ^{-5bc}	43,19±0,09 ^{ab}	<0,5	<0,5	2,34±0,13 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	4,45±0,13 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}		
		1292	2,41±0,03 ^c	0,007±1x10 ^{-5abc}	39,09±1,98 ^{ab}	<0,5	<0,5	2,02±0,06 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	5,26±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a		
		1294	2,34±0,07 ^c	0,007±0,001 ^{abc}	49,61±5,01 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,32±0,23 ^{abc}	0,29±0,01 ^{abc}	4,48±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a		
		1297	2,27±1x10 ^{-4bc}	0,009±1x10 ^{-5c}	47,94±0,001 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,14±0,21 ^{abc}	0,31±0,01 ^{abc}	4,61±0,09 ^{ab}	3,2±0,1 ^a		
		1301	1,99±0,07 ^a	0,007±0,001 ^{abc}	46,88±4,09 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,23±0,37 ^{abc}	0,22±0,02 ^{ab}	4,93±0,18 ^{ab}	3,2±0,1 ^a		
		1302	2,06±0,02 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	38,68±10,04 ^{ab}	<0,5	<0,5	1,73±0,35 ^a	0,28±0,01 ^{abc}	4,38±0,23 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}		
		1296	2,21±0,08 ^{bc}	0,008±1x10 ^{-5bc}	43,18±2,08 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,65±0,47 ^d	0,25±0,02 ^{abc}	4,86±0,18 ^{ab}	3,2±0,1 ^a		
			S. uvarum	1289	2,26±0,14 ^{bc}	0,007±1x10 ^{-5abc}	52,90±0,03 ^b	<0,5	<0,5	2,93±0,25 ^{ab}	0,29±0,01 ^{abc}	5,21±0,02 ^{bc}	3,2±0,1 ^a
				1290	2,21±0,01 ^{bc}	0,009±1x10 ^{-4c}	55,02±0,71 ^b	<0,5	<0,5	3,78±0,38 ^{bc}	0,29±0,01 ^{abc}	4,25±0,14 ^a	3,3±0,1 ^{ab}
				1288	2,16±0,02 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	35,06±10,21 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,43±0,67 ^{abc}	0,31±0,01 ^{abc}	5,00±0,09 ^{ab}	3,3±0,1 ^{ab}
1293	2,21±0,42 ^{bc}			0,007±1x10 ^{-4abc}	48,17±4,13 ^{ab}	<0,5	<0,5	1,98±0,24 ^a	0,26±0,01 ^{ab}	4,22±0,09 ^a	3,3±0,1 ^{ab}		
1298	2,26±0,03 ^{bc}			0,007±0,001 ^{abc}	47,94±0,001 ^{ab}	<0,5	<0,5	2,99±0,16 ^{ab}	0,28±0,01 ^{ab}	4,09±0,09 ^a	3,3±0,1 ^{ab}		
Chicha	S. uvarum			1323	1,84±0,01 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	47,99±5,45 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,79±0,21 ^{bc}	0,17±0,01 ^a	5,49±0,05 ^{bc}	3,4±0,2 ^b
		1324	1,97±0,02 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	38,27±2,54 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,32±0,13 ^{abc}	0,23±0,01 ^{ab}	5,38±0,11 ^{bc}	3,4±0,1 ^b		
		1329	2,04±0,03 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	38,76±1,66 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,57±0,16 ^{cd}	0,29±0,01 ^{abc}	5,49±0,05 ^{bc}	3,4±0,1 ^b		
		1328	1,96±1x10 ^{-4a}	0,007±1x10 ^{-4abc}	29,42±0,81 ^a	<0,5	<0,5	3,15±0,21 ^{abc}	0,23±0,01 ^{ab}	5,58±0,02 ^{bc}	3,4±0,1 ^b		
		1311	1,94±0,03 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	43,79±2,22 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,37±0,38 ^{cd}	0,26±0,01 ^{ab}	6,42±0,21 ^c	3,3±0,1 ^{ab}		
		1330	1,99±1x10 ^{-4a}	0,007±1x10 ^{-5abc}	29,43±3,18 ^a	<0,5	<0,5	4,39±0,39 ^{cd}	0,23±0,01 ^{ab}	5,36±0,13 ^{bc}	3,5±0,1 ^{bc}		
		1309	2,06±0,01 ^a	0,008±1x10 ^{-5bc}	32,55±0,11 ^{ab}	<0,5	<0,5	3,15±0,07 ^{abc}	0,26±0,01 ^{ab}	4,89±0,03 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}		
		1314	2,07±0,02 ^a	0,007±1x10 ^{-5abc}	27,70±4,20 ^a	<0,5	<0,5	3,53±0,06 ^{bc}	0,26±0,01 ^{ab}	6,4±0,03 ^c	3,3±0,1 ^{ab}		
		1317	2,19±0,05 ^a	0,005±1x10 ^{-5a}	22,80±0,44 ^a	<0,5	<0,5	4,15±0,15 ^{cd}	0,37±0,01 ^{cd}	6,41±0,08 ^c	3,2±0,1 ^a		
		1315	2,00±1x10 ^{-4a}	0,007±1x10 ^{-5abc}	28,26±2,73 ^a	<0,5	<0,5	4,48±0,22 ^{cd}	0,31±0,15 ^{abc}	5,63±0,05 ^{bc}	3,4±0,2 ^b		
		1322	1,95±0,02 ^a	0,009±1x10 ^{-5c}	37,97±0,71 ^{ab}	<0,5	<0,5	2,87±0,13 ^{ab}	0,36±0,09 ^{cd}	4,89±0,03 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}		
		1320	1,98±1x10 ^{-4a}	0,007±1x10 ^{-5abc}	29,91±7,13 ^a	<0,5	<0,5	3,90±0,14 ^{bc}	0,43±0,02 ^{de}	5,75±0,13 ^{bc}	3,4±0,1 ^{ab}		
		1321	1,86±0,13 ^a	0,009±0,001 ^c	35,36±3,96 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,01±0,21 ^{bc}	0,32±0,01 ^{bc}	5,00±0,07 ^{ab}	3,5±0,1 ^{bc}		
		1316	1,98±0,01 ^a	0,008±1x10 ^{-4bc}	37,33±0,98 ^{ab}	<0,5	<0,5	4,53±0,37 ^{cd}	0,30±0,01 ^{abc}	5,08±0,08 ^{ab}	3,5±0,2 ^{bc}		
Vino	S. cerevisiae	1178	1,82±0,01 ^a	0,009±0,001 ^c	71,97±0,58 ^c	<0,5	<0,5	3,54±0,16 ^{bc}	0,51±0,01 ^e	4,99±0,18 ^{ab}	3,4±0,1 ^{ab}		

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre los valores (ANOVA and Tukey test n = 2). En los casos donde no se colocaron superíndices no se observan diferencias significativas para ese parámetro. Todos los valores de los parámetros químicos están expresados en g/L.

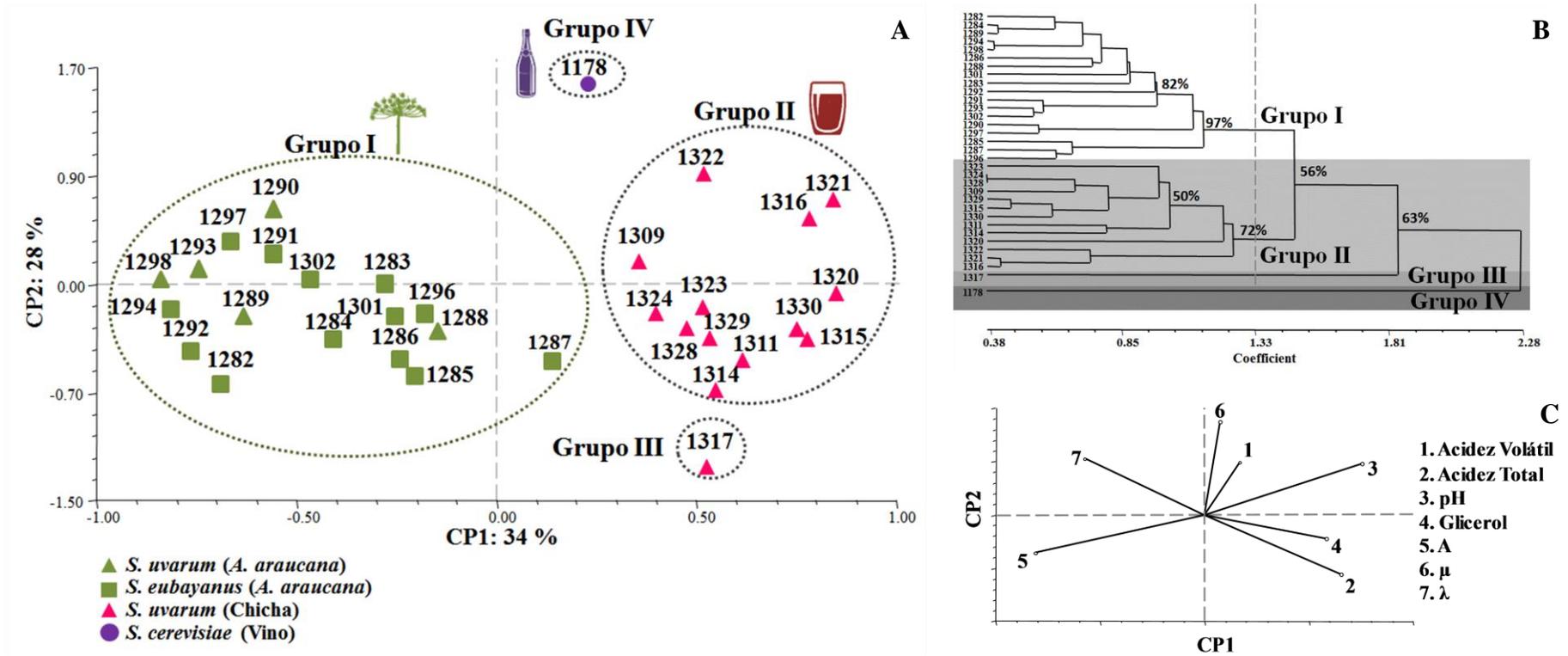


Figura 1.4. A: Análisis de componentes principales (ACP) y B: UPGMA grupo obtenido de las características fisicoquímicas y cinéticas de microfermentaciones. C: Proyección de los autovectores en el plano principal CP1 y CP2; el tamaño de cada autovector es directamente proporcional al porcentaje de la variabilidad explicada en las dos componentes.

Table 1.5: Actividad enzimática y antagonista de cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus*

Origen	Especie	Cepas (número de NPCC) ^a	Actividad enzimática (sustrato) ^a					Actividad antagonista	
			Proteasa (LD)	Pectinasa (PC)	β GI (pNPG)	β GI (ES)	β Xy (pNPX)	Cg	Sc
A. araucana	<i>S. eubayanus</i>	1282	-	+	+	+	+	-	-
		1283-1284, 1286-1287, 1296	-	+	+	-	+	-	-
		1285	-	+	+	-	+	-	+
		1292, 1294, 1291	-	+	+	+	+	-	+
		1297, 1302	-	+	+	-	+	+	+
		1301	-	-	+	+	+	-	-
	<i>S. uvarum</i>	1289	+	+	+	-	+	-	-
		1288, 1290	+	+	+	+	+	-	-
		1293, 1298	+	-	+	-	+	-	-
	Chicha	<i>S. uvarum</i>	1309	-	+	+	+	+	-
1316			+	+	+	-	+	-	-
1320-1321, 1330			+	+	+	+	+	-	-
1317, 1328-1329			+	-	+	+	+	-	-
1311, 1314, 1324			+	+	+	+	+	-	+
1323			+	+	+	-	+	-	+
1315			+	+	+	+	-	-	-
1322			-	+	+	+	-	-	-

a. NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

b. β GI: β -glucosidasa, β Xy: β -xilosidasa, LD: leche descremada, PC: pectina cítrica, pNPG: *p*-nitrofenil- β -glucósido, ES: esclulina, pNPX: *p*-nitrofenil- β -xilósido.

Actividad enzimática o antimicrobiana positiva (+) o negativa (-).

Cepas de control sensible: *Candida glabrata* NCYC388 (Cg) y *Saccharomyces cerevisiae* P351 (Sc).

1.3. Fermentaciones a escala de 1 L

De los resultados previos, que incluyen las propiedades fisicoquímicas de las microfermentaciones y la actividad enzimática y antagonista, se realizó una selección de una cepa de cada origen y ambiente con la mejor combinación de características de interés para la elaboración de sidras. Las cepas seleccionadas se utilizaron para realizar fermentaciones a mayor escala (1 L) a fin de evaluar el perfil aromático de las sidras producidas. En este caso se utilizaron dos mostos diferentes (Royal Gala y Granny Smith) a fin de evaluar si el sustrato influye en la producción de metabolitos por estas levaduras.

Se seleccionaron por un lado las cepas *S. eubayanus* NPCC1292 y *S. uvarum* NPCC1290 aisladas de *A. araucana*. Esta selección se basó principalmente en la combinación de actividades enzimáticas y antagonista de estas cepas, ya que la mayoría de las cepas de este origen presentaron cinéticas de fermentación similares y produjeron sidras base con características fisicoquímicas también parecidas entre sí basadas en el análisis de agrupamiento ACP (ver Figura 1.4. grupo I).

Por otro lado, se seleccionó la cepa de *Saccharomyces uvarum* NPCC1314 aislada de chicha, que también se destacó por su perfil enzimático, pero además presentó bajos valores

de λ en comparación a las demás cepas del mismo origen (Figura 1.4. grupo II). Finalmente se agregó, con fines comparativos, la misma cepa de *S. cerevisiae* (NPCC1178) utilizada previamente en las microfermentaciones.

1.3.1. Cinética de fermentaciones

Las fermentaciones en mosto Royal Gala (RG) finalizaron a los 22 días mientras que las llevadas a cabo en mosto Granny Smith (GS) a los 15 días. Los datos obtenidos de las mediciones diarias de °Brix se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial (Arroyo Lopez et al., 2008) con valores de R^2 de 99,2% y 99,8% para las fermentaciones llevadas a cabo en mosto RG y GS, respectivamente. En la Figura 1.5 se muestran las curvas modeladas (líneas continuas) y los datos observados (puntos). En el gráfico correspondiente a las fermentaciones llevadas a cabo en mosto RG, se observó que la cinética de consumo dada por la disminución de °Brix fue idéntica para las dos cepas de *S. uvarum* (las curvas se solapan), evidenciando mayor velocidad de reducción de °Brix (mayor velocidad de consumo de azúcares) que el resto. En este sustrato, *S. eubayanus* tuvo un comportamiento intermedio entre *S. uvarum* y *S. cerevisiae*.

Por otro lado, en mosto GS se destacó la cepa de *S. uvarum* NPCC1314 aislada de chicha (curva inferior), con la mayor velocidad de consumo de azúcares, además un comportamiento intermedio para las cepas *S. uvarum* NPCC1290 aislada de *A. araucana* y *S. cerevisiae* NPCC1178 y una cinética de consumo de azúcares más lenta para *S. eubayanus* (curva superior). También, se observó que en todos los casos no hubo un tiempo de latencia para el inicio de la fermentación.

Las diferencias antes mencionadas se correspondieron con diferencias significativas en el parámetro cinético K (tasa de consumo de azúcares), para ambos mostos (Tabla 1.6). En las fermentaciones realizadas con mosto RG en particular, ambas cepas de *S. uvarum* (NPCC1290 y NPCC1314) presentaron los valores más altos de este parámetro, mientras que *S. cerevisiae* mostró el valor más bajo (menor tasa de consumo de azúcares). Por el contrario, en mosto GS, *S. eubayanus* NPCC1292 fue la cepa con menor tasa de consumo (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Parámetros cinéticos de fermentaciones a escala de 1 L en dos mostos de manzana.

Parámetros cinéticos	Mosto Royal Gala				Mosto Granny Smith			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC1292	<i>S. uvarum</i> NPCC1290	<i>S. uvarum</i> NPCC1314	<i>S. cerevisiae</i> NPCC1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC1292	<i>S. uvarum</i> NPCC1290	<i>S. uvarum</i> NPCC1314
D (°Brix)	3,33±0,03 ^a	3,93±0,01 ^c	3,68±0,04 ^b	3,60±0,01 ^b	4,02±5x10 ⁻³	3,90±0,22	3,93±0,03	3,93±0,04
S	9,42±0,04 ^c	8,81±4x10 ^{-3a}	9,30±0,05 ^b	9,24±0,03 ^b	8,65±0,06	8,70±0,06	8,90±0,05	8,68±0,12
K (°Brix.h ⁻¹)	0,005±5x10 ^{-5a}	0,007±3x10 ^{-5b}	0,008±2x10 ^{-5c}	0,008±8x10 ^{-5c}	0,008±1x10 ^{-5b}	0,006±5x10 ^{-4a}	0,008±3x10 ^{-5b}	0,008±6x10 ^{-5b}

Todos los números de cepas pertenecen a la colección NPCC (North Patagonian Culture Collection). Los ajustes para todos los casos tratados presentaron $R \geq 0,995$. Letras diferentes en los superíndices en una misma columna indican diferencias significativas para cada mosto (ANOVA y Test de Tuckey, $n=2$). En los casos donde no se colocaron superíndices no se observan diferencias significativas para ese parámetro. **D**: valor mínimo de °Brix, **S**: diferencia entre °Brix finales e iniciales (caída de sustrato), **K**: tasa de

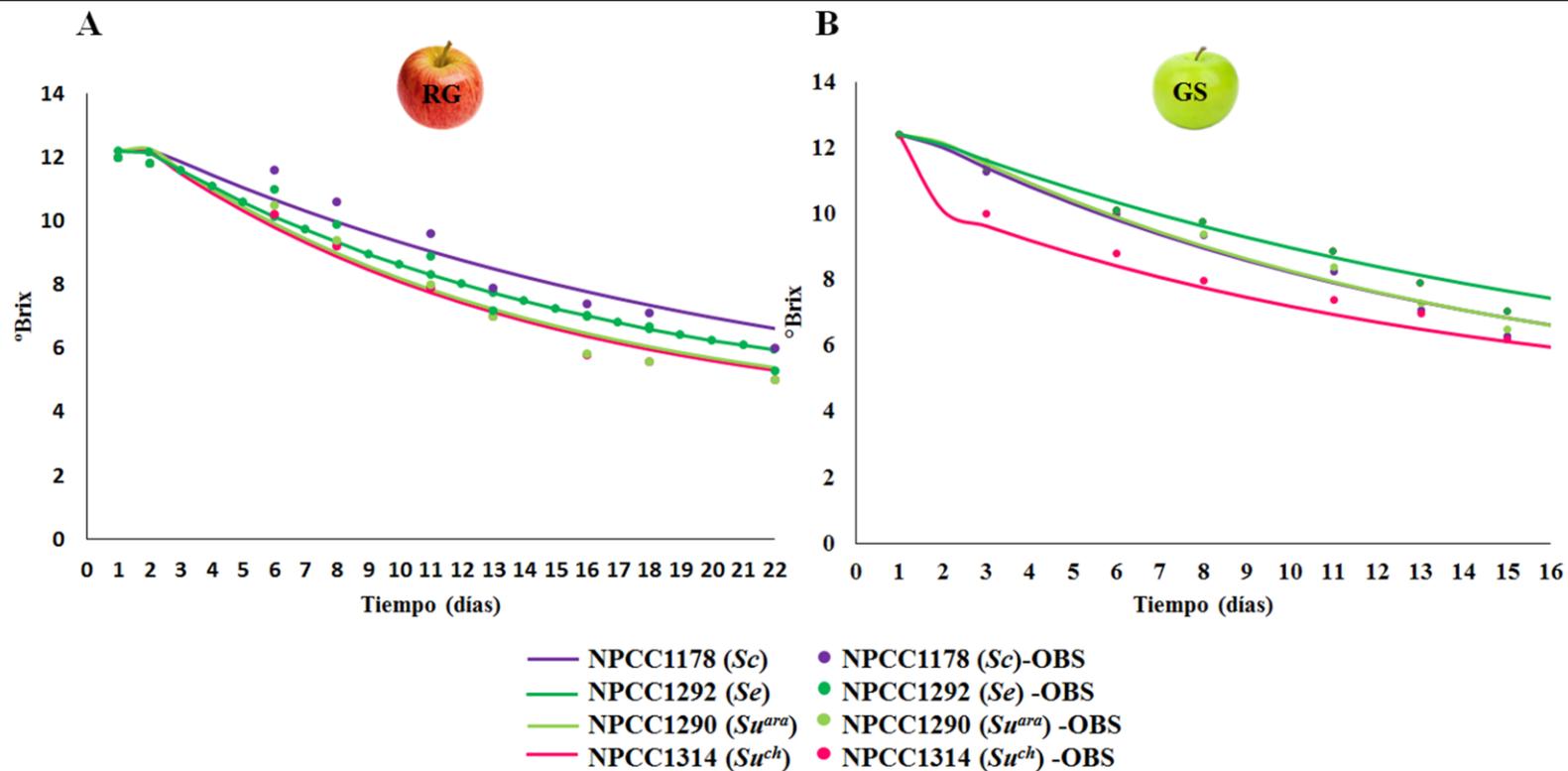


Figura 1.5: Curvas modeladas de fermentaciones (1L) realizadas en A: mosto Royal Gala (RG) y B: Granny Smith (GS) utilizando las cepas seleccionadas. Se utilizó en todos los casos el modelo de decaimiento exponencial (Arroyo-Lopez et al., 2008). Las líneas se corresponden a los datos modelados y los puntos a los datos observados. El ajuste para ambos gráficos fue mayor a $R^2 0,992$.

1.3.2. Propiedades fisicoquímicas y aromáticas de las sidras

Tal como se hizo para el caso de las microfermentaciones (punto 1.1), se evaluaron las características fisicoquímicas de las sidras base obtenidas con las diferentes cepas de la colección de levaduras. En este caso también se evaluó la concentración de una serie de compuestos químicos productos del metabolismo de las levaduras (alcoholes superiores, ésteres, entre otros) que se relacionan con el perfil aromático de las sidras.

A continuación, se analizarán los diferentes grupos de compuestos para los diferentes mostos utilizados, comenzando con los compuestos químicos generales, luego los ácidos orgánicos y finalmente los compuestos aromáticos. Al analizar las sidras base obtenidas con diferentes levaduras utilizando como sustrato mosto Royal Gala (RG), se observaron diferencias significativas en la concentración de glicerol y SO_2 . La cepa de *S. uvarum* NPCC1290 aislada de *A. araucana* produjo la mayor concentración de glicerol mientras que la cepa vínica de *S. cerevisiae* NPCC1178, en el otro extremo, fue quien produjo la menor concentración de este metabolito. En cuanto al SO_2 total y libre, la mayor concentración se detectó en las sidras fermentadas con la cepa *S. eubayanus* NPCC1292 (Tabla 1.7).

En las sidras base obtenidas a partir de mosto Granny Smith (GS), se observaron diferencias significativas en el contenido de fructosa y etanol (Tabla 1.7). Las sidras base fermentadas con la cepa de *S. eubayanus* NPCC1292 fueron las que presentaron mayor cantidad de fructosa residual (más de 7g/L) y consecuentemente la menor concentración de etanol, mientras que la cepa vínica de *S. cerevisiae* NPCC1178 fue la mayor productora de etanol (Tabla 1.7).

En relación a los ácidos orgánicos, las principales diferencias se observaron en el contenido final de ácido shikimico, que independientemente del mosto utilizado fue significativamente mayor en las sidras fermentadas con ambas cepas de *S. uvarum*. En este caso el efecto del sustrato fue evidente ya que se obtuvieron valores dos veces más elevados de este ácido en sidras base obtenidas con mosto de manzana Royal Gala (Tabla 1.7). También se observaron diferencias significativas en el contenido de ácido málico entre las sidras producidas con las diferentes levaduras, pero en este caso la diferencia se vio sólo en aquellas obtenidas a partir de manzanas GS (Tabla 1.7).

Independientemente del mosto evaluado, las levaduras criotolerantes (tanto *S. eubayanus* como *S. uvarum*) produjeron valores de alcoholes superiores totales significativamente mayores que *S. cerevisiae*. Estas diferencias se debieron principalmente a las elevadas concentraciones de alcohol isoamílico y 2-feniletanol que produjeron estas especies, que en el caso del 2-feniletanol fue de más del doble de la concentración producida por *S. cerevisiae* (Tabla 1.7). También se observaron diferencias significativas en el total de esterés entre los diferentes tratamientos, destacándose *S. uvarum* y sobre todo la cepa NPCC1314 aislada de chicha la que produjo los niveles más elevados. Esta diferencia se debió en parte a las altas concentraciones del éster mayoritario acetato de etilo, aunque también se observaron concentraciones elevadas de otros ésteres tales como el acetato de 2-feniletilo, acetato de isobutilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo. Los últimos tres esterés fueron particularmente abundantes en sidras RG (Tabla 1.7).

Finalmente, con respecto a los compuestos volátiles minoritarios, que incluyen a los terpenos y fenoles volátiles, se encontraron diferencias significativas solamente en las concentraciones de geraniol y 4-etilguaiacol, siendo mayor en las sidras fermentadas con *S. cerevisiae* y con *S. uvarum* aislada de chicha y únicamente en mosto RG (Tabla 1.7).

Debido al gran número de variables analizadas y a fin de obtener un panorama más claro de los productos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Se observó una buena reproducibilidad en los experimentos, lo que pudo observarse por la cercanía en la que se agruparon los duplicados biológicos en el ACP (Figura 1.6).

En este análisis, además se observó la existencia de un marcado efecto del mosto (sustrato) sobre las características de la sidra base obtenida. De esta manera se evidenció un grupo de sidras (grupo I) conformado por todas las fermentaciones realizadas en mosto GS y un grupo II conteniendo las sidras base fermentadas a partir de mosto RG (Figura 1.6).

En líneas generales, las fermentaciones llevadas a cabo con las levaduras criotolerantes presentaron un perfil mucho más homogéneo en mosto RG que en mosto GS, e inclusive en este mosto se ubican muy cercanas entre si las sidras base fermentadas con las cepas aisladas de ambientes naturales, independientemente de la especie, hecho que concuerda con los observado a escala más pequeña (50 mL).

Tabla 1.7: Características fisicoquímicas de las sidras base obtenidas a partir de dos variedades de manzana usando diferentes cepas de levaduras

Compuestos generales	MOSTO ROYAL GALA				MOSTO GRANNY SMITH			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. cerevisiae</i> NPCC1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
Glucosa (g/L)	0,02±0,01	0,23±0,02	0,08±1E ⁻³	0,02±0,01	0,02±0,01	0,45±0,07	0,16±0,08	0,02±0,01
Fructosa (g/L)	1,00±0,04	0,85±0,01	0,11±0,01	0,05±0,00	3,5±0,34 ^a	7,01±0,97 ^b	3,2±0,98 ^a	2,47±0,52 ^a
Etanol (%v/v)	7,83±0,07	7,66±0,17	7,91±0,03	7,98±0,01	7,44±0,01 ^b	6,62±0,30 ^{ab}	7,24±0,01 ^{ab}	6,32±0,44 ^a
Glicerol (g/L)	3,73±0,21 ^a	4,37±0,39 ^{ab}	4,76±0,05 ^c	4,15±0,45 ^{bc}	3,48±0,28	3,55±0,33	4,17±0,26	4,29±0,39
Acetaldehído (g/L)	17,15±2,05	9,85±0,77	12,1±6,08	12,05±0,35	16,30±2,26	15,15±4,45	12,50±0,71	8,80±0,56
SO ₂ libre	35,0±4,2	45,0±0,1	35,0±0,2	43,0±0,2	11,5±2,1	13,0±0,1	13,0±0,1	13,0±0,01
SO ₂ Total	73,5±4,9 ^a	101,5±2,1 ^b	80,0±4,2 ^a	80,0±4,2 ^a	38,0±0,1	33,5±2,1	30,5±2,1	32,0±0,1
pH	3,46±0,01	3,33±0,01	3,38±0,05	3,44±0,06	3,29±0,38	3,14±0,03	3,31±0,09	3,21±0,01
Ácidos orgánicos								
Ácido acético (g/L)	0,20±0,02	0,10±0,03	0,10±0,01	0,20±0,02	0,10±0,0	0,10±0,02	0,10±0,01	0,15±0,07
Ácido láctico (g/L)	0,10±0	0,10±0,01	0,30±0,01	0,20±0,01	ND	ND	ND	ND
Ácido málico (g/L)	6,75±0,07	6,5±0,1	6,95±0,21	6,85±0,07	7,60±0,42 ^a	9,50±0,14 ^b	9,25±0,07 ^b	8,85±0,35 ^b
Ácido shikimico	9,05±0,21 ^{ab}	5,7±0,42 ^a	13,05±0,07 ^b	13,30±2,40 ^b	3,00±0,01 ^a	3,00±0,01 ^a	4,60±0,56 ^b	6,35±0,21 ^c
Ácidos totales (g/L)	7,06±0,09	6,71±0,15	7,36±0,22	7,26±0,91	7,70±0,43	9,5±0,15	9,25±0,09	8,91±0,36
Alcoholes superiores								
1-butanol	2,17±0,22	2,14±0,04	2,31±0,13	2,29±0,03	1,52±0,68	1,23±0,13	1,22±0,07	1,11±0,06
1-hexanol	1,35±0,07	1,26±0,01	1,33±0,15	1,39±0,08	0,95±0,09	1,39±0,46	0,97±0,07	1,27±0,40
1-propanol	12,28±0,58	10,97±0,15	14,71±1,11	15,14±1,86	10,62±1,08	8,68±0,44	10,03±0,13	6,71±4,16
2-feniletanol	3,09±0,31 ^a	9,31±0,52 ^b	10,88±1,83 ^b	7,97±2,28 ^{ab}	4,07±0,11 ^a	12,77±0,27 ^b	15,91±0,85 ^b	11,28±0,26 ^b
Alcohol bencílico	0,17±0,01 ^b	0,071±0,01 ^a	0,13±0,01 ^{ab}	0,11±0,03 ^{ab}	0,03±6x10 ^{-3ab}	0,02±0,01 ^a	0,02±3x10 ^{-3ab}	0,03±1x10 ^{-4b}
Alcohol isoamílico	91,2±8,63 ^a	133,70±4,24 ^{ab}	165,35±17,46 ^b	119,05±15,91 ^{ab}	108,05±5,30 ^a	165,85±7,28 ^b	163,50±9,05 ^b	165,30±14,28 ^b
Alcohol isobutílico	24,70±1,13 ^a	20,3±1,41 ^a	30,95±1,34 ^b	23,75±1,63 ^a	16,00±0,01	19,81±1,84	18,3±0,14	22,45±6,86
Total – Alcohol isoamílico	43,76±1,96^a	44,05±1,52^a	60,32±2,26^b	50±3,27^{ab}	33,19±1,24	43,9±2,05	46,46±1,03	42,87±9,22
Alcoholes superiores totales	134,96±10,94^a	177,75±5,33^b	225,67±19,25^b	169,71±18,05^{ab}	141,25±3,33^a	209,75±8,74^b	209,96±10,33^b	208,17±17,05^b

Continuación de Tabla 1.7

<i>Esteres</i>								
Acetato de etilo	6,37±1,51 ^a	6,00±0,11 ^a	7,09±0,71 ^a	14,11±1,63 ^b	7,49±0,36 ^a	7,32±1,02 ^a	8,19±0,10 ^a	29,63±10,93 ^b
Acetato de 2-feniletilo	0,041±0,001 ^a	0,094±0,005 ^a	0,084±0,024 ^a	0,226±0,095 ^b	0,013±0,003 ^a	0,11±0,01 ^a	0,21±0,03 ^{ab}	0,40±0,12 ^b
Acetato de bencilo	1x10 ⁻³ ±1x10 ^{-5ab}	7x10 ⁻⁴ ±3x10 ^{-5a}	8x10 ⁻⁴ ±7x10 ^{-5a}	0,002±2x10 ^{-4b}	0,002±9x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁴ ±7x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁴ ±3x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁴ ±7x10 ⁻⁵
Acetato de hexilo	0,013±0,006	0,007±7x10 ⁻⁴	4,5E ⁻³ ±7x10 ⁻⁴	0,022±0,006	0,004±0,001	0,003±7x10 ⁻⁴	0,010±0,009	0,004±0,002
Acetato de isoamilo	0,095±0,007 ^b	0,025±0,001 ^a	0,025±0,001 ^a	0,11±0,014 ^b	0,060±0,001	0,05±0,007	0,05±0,01	0,06±0,02
Acetato de isobutilo	0,005±0,001 ^a	0,005±7x10 ^{-5a}	0,005±3x10 ^{-4a}	0,007±5x10 ^{-4b}	4 x 10 ⁻³ ±2x10 ⁻⁴	0,005±0,001	0,005±3x10 ⁻⁴	0,007±0,002
Butirato de dietilo	0,041±0,001	0,046±0,002	0,048±0,001	0,045±0,005	3x10 ⁻³ ±5x10 ^{-4a}	0,036±0,002 ^b	0,042±0,002 ^b	0,039±8x10 ^{-4b}
Decanoato de etilo	0,013±0,003 ^{cd}	0,002±1x10 ^{-4a}	0,007±0,004 ^{ab}	0,021±3x10 ^{-4d}	1x10 ⁻³ ±8x10 ^{-4b}	0,003±7x10 ^{-4a}	0,015±8x10 ^{-4b}	0,010±0,004 ^{ab}
Hexanoato de etilo	0,047±0,006 ^{ab}	0,032±0,001 ^a	0,045±0,003 ^{ab}	0,056±0,004 ^b	0,042±0,003	0,019±0,001	0,040±0,012	0,039±0,001
Lactato de etilo	1,41±0,08 ^a	1,78±0,08 ^{ab}	3,32±0,45 ^b	2,41±0,77 ^{ab}	1,11±0,28	1,72±0,65	1,49±0,03	1,88±0,02
Octanoato de etilo	0,048±0,014	0,014±0,001	0,030±0,012	0,073±0,006	0,025±0,003 ^c	0,002±2x10 ^{5a}	0,015±6x10 ^{-4b}	0,012±0,002 ^b
Succinato de dietilo	0,015±0,003	0,02±3x10 ⁻⁴	0,036±0,011	0,044±0,009	0,018±2x10 ⁻⁴	0,031±0,001	0,047±0,007	0,021±0,024
Total – Acetato de etilo	1,73±0,028^a	2,03±0,09^a	3,61±0,38^b	3,02±0,89^b	1,32±0,28	1,98±0,62	1,92±7E⁻³	2,48±0,09
Esteres totales	8,11±1,54^a	8,03±0,02^a	10,71±1,09^a	17,13±0,74^b	8,82±0,07^a	9,30±1,65^a	10,11±0,09^a	32,11±6,02^b
<i>Terpenos</i>								
alfa-Terpineol	7x10 ⁻⁴ ±3x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁴ ±5x10 ⁻⁵	7x10 ⁻⁴ ±9x10 ⁻⁵	7x10 ⁻⁴ ±1x10 ⁻⁴	7x10 ⁻⁴ ±4x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁴ ±1x10 ⁻⁴	0,003±0,002	6x10 ⁻⁴ ±4x10 ⁻⁵
Limoneno	3x10 ⁻⁵ ±3x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵ ±2x10 ⁻⁶	4x10 ⁻⁵ ±9x10 ⁻⁶	ND	4x10 ⁻⁵ ±2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁵	ND	2x10 ⁻⁵ ±2x10 ⁻⁵
Linalool	0,011±0,001	0,007±0,001	0,008±0,001	0,010±0,001	0,006±7x10 ⁻⁵	0,004±0,003	0,008±0,001	0,004±0,003
Nerol	ND	ND	ND	ND	0,001±3x10 ^{-4b}	ND ^a	0,001±7x10 ^{-5b}	0,001±8x10 ^{-5b}
Geraniol	0,010±0,001 ^c	0,006±3x10 ^{-4b}	0,003±7x10 ^{-4a}	0,010±0,001 ^c	0,010±0,001	0,005±0,001	0,009±7x10 ⁻⁴	0,003±0,004
Terpenos totales	0,022±0,002^b	0,013±0,001^a	0,012±0,001^a	0,021±0,002^b	0,018±0,001^b	0,010±0,001^a	0,021±0,001^b	0,009±1x10^{-4a}
<i>Fenoles volátiles</i>								
4- Etilfenol	0,006±4x10 ⁻⁴	0,004±0,001	0,005±4x10 ⁻⁴	0,006±8x10 ⁻⁴	0,005±0,002	0,001±2x10 ⁻⁴	0,001±1x10 ⁻⁴	0,002±2x10 ⁻⁴
4- Etilguaiacol	0,005±1x10 ^{-4b}	0,003±3x10 ^{-4a}	0,004±4x10 ^{-4ab}	0,005±3x10 ^{-4b}	0,001±7x10 ^{-4b}	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Fenoles volátiles totales	0,011±0,002	0,007±0,001	0,009±0,001	0,011±0,001	0,006±0,002	0,001±2x10⁻⁴	0,001±1x10⁻⁴	0,002±2x10⁻⁴

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre los valores obtenidos para el mismo mosto (ANOVA y test de Tukey n = 2). En los casos donde no se colocaron superíndices no se observan diferencias significativas para ese parámetro. Todos los valores están expresados en mg/L con excepción de los indicados particularmente entre paréntesis.

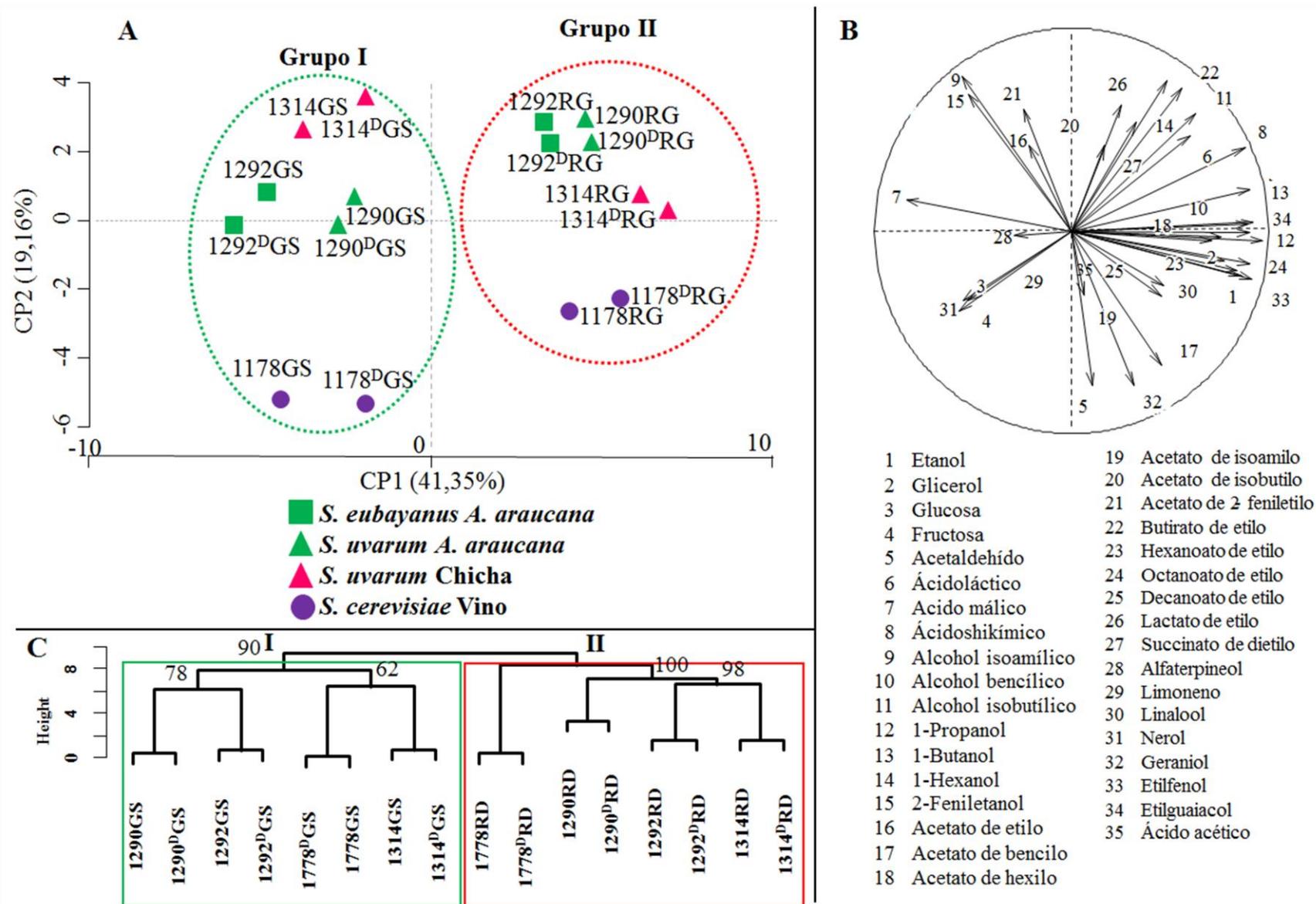


Figura 1.6. A: ACP realizado a partir de los compuestos químicos detectados en las fermentaciones realizadas a partir de las dos variedades de mostos utilizando diferentes levaduras. B: Proyección de los autovectores en el plano principal CP1 y CP2; el tamaño de cada autovector es directamente proporcional al porcentaje de la variabilidad explicada en las dos componentes, en el listado de abajo se detallan las variables utilizadas. C: UPGMA de asociación entre levaduras, los números representan el porcentaje de soporte del clado (botstrapping). Superíndice D indica duplicado biológico. RD: Red Delicious; GS: Granny Smith

Además, en mosto RG las sidras base elaboradas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 presentaron un perfil levemente diferenciado, destacándose por las elevadas concentraciones de algunos ácidos orgánicos como ácido láctico y shikimico. Las sidras base producida con la cepa de *S. cerevisiae* se diferenciaron en el ACP principalmente por las altas concentraciones de acetaldehído y geraniol producidas en este mosto (Figura 1.6).

En mosto GS las fermentaciones llevadas a cabo por las levaduras criotolerantes presentaron elevadas concentraciones de 2-feniletanol, alcohol isoamílico, acetato de 2-feniletilo y ácido málico. Mientras que las sidras base producidas con la cepa NPCC1178 se diferenciaron por las altas concentraciones de nerol y geraniol producidas en este mosto.

Los dos grupos que se formaron en el ACP fueron respaldados por el análisis de UPGMA (Figura 1.6.c).

1.4. Fermentaciones a escala semipiloto

A partir de los perfiles aromáticos, fisicoquímicos y cinéticos obtenidos de las fermentaciones previamente realizadas, se procedió a la selección de una única cepa para ser probada en la producción de sidra a escala semipiloto en mosto no estéril. De las dos cepas de la especie *S. uvarum* se seleccionó la cepa NPCC1314 proveniente de chicha por su mayor velocidad de consumo de azúcares, con una producción menor de etanol (característica de interés en sidras) y mayor de algunos esteres como el acetato de 2-feniletilo en relación a la cepa aislada de *A. araucana* (ver Tabla 1.7). Además, las sidras fermentadas con esta cepa presentaron una menor concentración de azúcares residuales (glucosa y fructosa) y mayor concentración de ácido shikimico principalmente en mosto GS. La cepa seleccionada además había presentado actividad antagonista frente a la cepa sensible de la especie *S. cerevisiae* (ver Tabla 1.5). Por otro lado, se descartó la cepa *S. eubayanus* NPCC1292 porque presentó menor velocidad de consumo de azúcares, dejando además concentraciones elevadas de fructosa residual. En esta oportunidad se utilizó con fines comparativos la cepa comercial *S. cerevisiae* (BO213), utilizada frecuentemente en la elaboración de sidras en la región.

En primera instancia se decidió realizar el ensayo con mosto de la variedad Granny Smith, principalmente porque en nuestro ensayo previo utilizando esta variedad se logró una mayor complejidad aromática. Además, este tipo de manzanas es utilizado en las sidreras de

la zona para la elaboración de productos varietales exclusivos. La temperatura de fermentación se mantuvo en esta primera oportunidad en 20°C.

1.4.1. Cinética de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo en bidones de 10 L conteniendo 8 L de mosto cosecha 2015 (metodología punto 8.1.2). Las fermentaciones de ambas cepas transcurrieron sin problemas, logrando las cepas consumir la totalidad de los azúcares en menos de 288 h (12 días). Se evaluó la cinética de fermentación a partir de los datos obtenidos de la medición diaria de °Brix, ajustándose los mismos a un modelo de decaimiento exponencial (Figura 1.7.A). No obstante, los parámetros cinéticos obtenidos para las dos cepas fueron diferentes, evidenciándose diferencias significativas en los parámetros D y S (Figura 1.7.B). El parámetro más relevante, S, que indica la caída del consumo de sustrato, fue significativamente mayor en la fermentación conducida con la cepa NPCC1314 de *S. uvarum* ($p < 0,001$).

1.4.2. Implantación de las cepas inoculadas

El porcentaje de implantación, que refiere a la capacidad de una levadura de dominar una fermentación con mosto no estéril en el que también se encuentran presentes otras levaduras, se evaluaron 20 colonias tomadas al azar del estadio final de fermentación.

En primera instancia se evaluó la capacidad de las colonias de crecer a 37°C y posteriormente la identidad de las colonias se confirmó mediante análisis de mtDNA-RFLP. En las fermentaciones inoculadas con la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213, las 20 colonias obtenidas de cada duplicado fueron capaces de crecer a 37°C. Sin embargo, ninguna colonia mostró el perfil de mtDNA-RFLP de la cepa inoculada, sino que todas presentaron un perfil diferente, denominado en este trabajo como perfil A1 (Figura 1.8) lo que indica que estas fermentaciones no fueron conducidas con la levadura inoculada y por ende las propiedades cinéticas, fisicoquímicas y aromáticas de las mismas no se deben a las propiedades de la levadura utilizada.

En las fermentaciones inoculadas con la cepa de *S. uvarum* NPCC1314, se observó una implantación promedio de $63 \pm 3\%$, es decir que 12 de 20 colonias aisladas de un duplicado

(60%) y 13 de 20 colonias aisladas del otro duplicado (66,6%) fueron incapaces de crecer a 37°C y mostraron el perfil de mtDNA-RFLP de la cepa *S. uvarum* NPCC1314 (Figura 1.8).

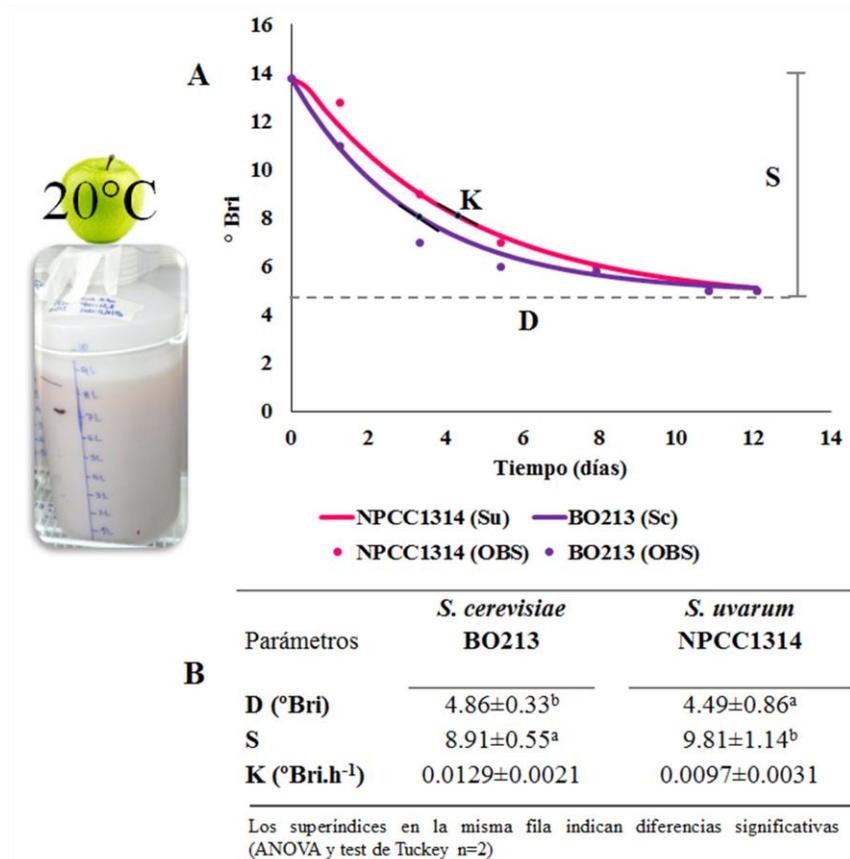


Figura 1.7. Cinética de las fermentaciones en escala semipiloto en mosto GS a 20 °C. A: Curvas modeladas; las líneas en el gráfico representan los datos modelados utilizando la ecuación de decaimiento exponencial (Arroyo-Lopez et al., 2008) y los puntos los datos observados. B: Parámetros obtenidos para las dos levaduras evaluadas y ANOVA (test de Tukey n = 2).

El resto de las colonias fueron capaces de crecer a 37°C, por lo que corresponderían a la especie *S. cerevisiae*. El perfil de mtDNA-RFLP de estas otras colonias fue el mismo para todas (perfil A2, Figura 1.8) y tampoco correspondió al de la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213.

1.4.3. Propiedades fisicoquímicas y perfil aromático de las sidras base

Primeramente, se realizó una caracterización de compuestos generales incluyendo azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos con las sidras base. Estos mismos compuestos se evaluaron en el mosto de manzana Granny Smith que se utilizó para las fermentaciones con

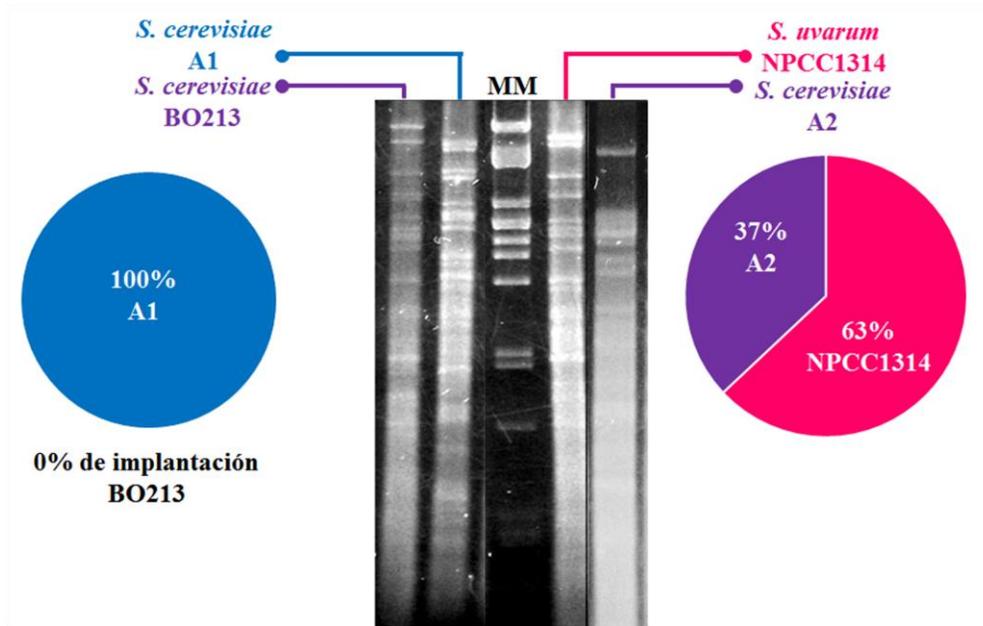


Figura 1.8: Perfiles mitocondriales encontrados en las fermentaciones a escala piloto realizadas a 20 °C. MM: marcador molecular λ *Pst* I. Los gráficos de torta representan el porcentaje en el que se encontraron las cepas en el estadio final de fermentación de un total de 20 colonias.

el objetivo de poder interpretar si los compuestos medidos en las sidras se corresponden a compuestos producidos o consumidos por las levaduras involucradas en la fermentación.

Al comparar los compuestos evaluados en el mosto y las sidras base se observó que todos los azúcares fueron consumidos (como se desprendió de los parámetros cinéticos explicados en el punto 1.4.1) y que se produjeron concentraciones muy similares de etanol. Sin embargo, la producción de glicerol fue significativamente mayor en las sidras base fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314. No se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados (Tabla 1.8).

A fin de obtener un producto similar al que se podría encontrar comercialmente es necesario gasificar (toma de espuma) y corregir (agregar ácido, azúcares y SO₂) la sidra base. El gasificado puede realizarse de dos maneras, la primera es incorporando CO₂ directamente

y la segunda es mediante la realización de una segunda fermentación en botella, procedimiento conocido como método *Champenoise* típicamente utilizado en vinos espumantes (metodología punto 1.2.1). En esta primera parte de la Tesis realizamos la toma de espuma mediante segunda fermentación en botella, para lo cual se volvieron a inocular las sidras base con las mismas cepas utilizadas durante la primera fermentación: *S. uvarum* NPCC1314 y *S. cerevisiae* BO213.

Tabla 1.8. Compuestos generales del mosto utilizado en las fermentaciones a escala semipiloto y de las sidras base fermentadas con dos cepas de levaduras a 20 °C

Tratamiento	Glucosa	Fructosa	Etanol (%v/v)	Glicerol	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido málico
Mosto GS 2015	34,2853	86,1623	ND	ND	ND	ND	7,5388
<i>S. cerevisiae</i> BO213 *	ND	2,76±0,11	7,79±0,15	3,99±0,02	0,07±0,01	0,18±0,01	7,29±0,12
<i>S. uvarum</i> NPCC1314 *	ND	2,01±0,25	7,98±0,09	4,72±0,29	0,10±0,02	0,22±0,02	7,01±0,21

* Sidras base obtenidas con cada una de las levaduras indicadas.

GS: Granny Smith.

Valores resaltados en negrita indican diferencias significativas (ANOVA and Tukey test $n = 2$) entre las sidras base mientras que en los no resaltados no se observaron diferencias significativas.

Todos los valores están expresados en g/L con excepción del etanol que se expresa en % v/v.

Las segundas fermentaciones en botella demoraron 20 días (en posición horizontal) hasta alcanzar 6 atmósferas de la presión debidas a la producción de CO₂. Luego de este período se extrajeron las levaduras y se corrigieron las sidras obtenidas con una cantidad conocida de azúcares de acuerdo a la metodología descrita previamente. Estos productos se utilizaron para la evaluación de las características fisicoquímicas, en la que se midieron los mismos compuestos evaluados en las sidras base producto de la primera fermentación, y otros compuestos de interés como alcoholes superiores, esterres, fenoles volátiles, terpenos, entre otros, que caracterizan el perfil aromático de las sidras (Tabla 1.9).

En cuanto a los compuestos generales evaluados para las sidras se observaron diferencias significativas en las concentraciones de etanol y en el pH, siendo significativamente mayores ambos en las sidras inoculadas con *S. cerevisiae* BO213. Las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC131 presentaron concentraciones significativamente mayores de acetaldehído (aproximadamente el doble) y de glicerol que las fermentadas con *S. cerevisiae*. Interesantemente el contenido de etanol en la primera fermentación fue igual para ambas fermentaciones, indicando que en la segunda fermentación se produjo una

concentración significativamente mayor de este compuesto en las sidras inoculadas con la cepa *S. cerevisiae* BO213.

En cuanto a los ácidos orgánicos se observó una mayor concentración de ácido málico y ácidos orgánicos totales en las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314, mientras que las inoculadas con *S. cerevisiae* BO213 presentaron mayores concentraciones de ácido láctico (Tabla 1.9).

Con respecto a los alcoholes superiores las principales diferencias se vieron reflejadas cuando se realiza la resta entre los alcoholes superiores totales y el alcohol isoamílico (alcohol superior mayoritario), que indicaría la concentración de alcoholes superiores minoritarios. En este parámetro se encontraron valores significativamente mayores en las sidras fermentadas con *S. uvarum* NP1314 y esto se debió principalmente a la gran concentración de alcohol isobutílico producida por la levadura criotolerante. Esta levadura produjo también cantidades significativamente mayores (5 veces más) de 2-feniletanol en relación a las sidras inoculadas con *S. cerevisiae* (Tabla 1.9).

De igual forma, que se realizó para los alcoholes superiores, al realizar la diferencia entre los ésteres totales y el acetato de etilo (éster mayoritario) se observó una producción significativamente mayor en las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314. Esta diferencia se debió principalmente a la gran concentración de acetato de 2-feniletilo (más de 50 veces) producidas por esta levadura. Por su parte, las sidras inoculadas con la cepa *S. cerevisiae* BO213 presentaron mayores concentraciones de otros ésteres minoritarios como acetato de isoamilo, butirato de etilo y lactato de etilo -este último más del doble- (Tabla 1.9).

En cuanto a los volátiles minoritarios como los terpenos y fenoles volátiles, el linalool fue significativamente más alto en las sidras inoculadas con *S. cerevisiae* BO213, mientras que el 4-etilfenol y 4-etilguaiacol fueron mayores en las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314 (Tabla 1.9).

1.4.4. Análisis sensorial de las sidras

El análisis sensorial de las sidras obtenidas el público presentó una preferencia por las sidras (Figura 1.9.A) fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314 (64% del total de comensales eligió a esta sidra como su preferida frente a la inoculadas con *S. cerevisiae* BO213).

Tabla 1.9: Características fisicoquímicas de sidras fermentadas a 20 °C utilizando la cepa vínica *Sc* BO213 y la cepa de chicha *S. uvarum* NPCC1314.

	<i>Sc/Sc</i> (BO213)	<i>Su/Su</i> (NPCC1314)
Compuestos generales		
Etanol (% v/v)	9,039 ± 0,081	8,3885 ± 0,009
Glicerol (g/L)	4,112 ± 0,038	4,721 ± 0,111
Acetaldehído (g/L)	6,081 ± 2,121	11,065 ± 2,395
SO ₂ Libre	16,725 ± 3,945	24,094 ± 4,781
SO ₂ Total	51,465 ± 1,782	55,115 ± 3,335
pH	4,01 ± 0,03	3,61 ± 0,02
Metanol	22,241 ± 2,132	19,381 ± 0,81
Ácidos orgánicos		
Ácido acético (g/L)	0,117 ± 0,001	0,117 ± 0,003
Ácido láctico (g/L)	3,785 ± 0,043	0,272 ± 0,003
Ácido málico (g/L)	0,261 ± 0,014	5,391 ± 0,201
Total ácidos orgánicos	4,173 ± 0,045	5,508 ± 0,204
Alcoholes superiores		
1-Propanol	14,361 ± 0,069	14,831 ± 0,373
1-Hexanol	1,914 ± 0,235	2,356 ± 0,124
1-Butanol	1,055 ± 0,175	1,082 ± 0,028
2-Feniletanol	0,014 ± 0,001	0,5847 ± 0,026
Alcohol bencílico	ND	ND
Alcohol isoamílico	224,094 ± 11,005	222,677 ± 11,303
Alcohol isobutílico	34,585 ± 0,695	47,685 ± 0,045
Total-alcohol isoamílico	51,928 ± 1,170	66,538 ± 0,596
Total alcoholes superiores	276,023 ± 12,18	289,216 ± 11,899
Esteres		
Acetato de etilo	21,021 ± 2,561	24,871 ± 1,65
Acetato 2-feniletilo	3,045 ± 0,184	78,494 ± 6,287
Acetato de bencilo	0,038 ± 0,008	0,027 ± 0,001
Acetato de hexilo	0,027 ± 0,004	0,026 ± 0,002
Acetato de isoamilo	1,676 ± 0,069	0,424 ± 0,004
Acetato de isobutilo	0,018 ± 0,001	0,014 ± 0,001
Butirato de etilo	0,159 ± 0,029	0,007 ± 0,003
Decanoato de etilo	0,322 ± 0,073	0,247 ± 0,038
Hexanoato de etilo	ND	ND
Lactato de etilo	51,191 ± 10,468	20,346 ± 0,819
Octanoato de etilo	0,245 ± 0,019	0,328 ± 0,046
Succinato de dietilo	0,304 ± 0,046	0,37 ± 0,046
Total – acetato de etilo	57,027 ± 10,842	100,285 ± 7,247
Total esterres	78,047 ± 13,402	125,1551 ± 7,8971
Terpenos		
Limoneno	0,02322 ± 0,00162	0,02622 ± 0,01253
Linalol	0,27527 ± 0,04998	0,00141 ± 0,00020
Nerol	0,08047 ± 0,00349	0,01454 ± 0,00011
Geraniol	0,33107 ± 0,03823	0,31583 ± 0,00615
Total terpenos	0,71004 ± 0,09322	0,35798 ± 0,01879
Fenoles Volátiles		
4-etilfenol	0,00217 ± 0,00088	0,00750 ± 0,00018
4-etilguaiacol	0,00094 ± 0,00052	0,00391 ± 0,00049
Total fenoles volátiles	0,00311 ± 0,00139	0,01141 ± 0,00067

Valores resaltados en negrita en la misma fila indican diferencias significativas entre las dos levaduras evaluadas para la variable correspondiente (ANOVA and Tukey test $n = 2$) mientras que en los valores no resaltados no se encontraron diferencias significativas. Todos los valores están expresados en mg/L con excepción de los indicados particularmente entre paréntesis.

Además, al diferenciar entre géneros, se observó que el 100 % de los hombres eligieron esta sidra, mientras que las mujeres eligieron ambos productos por igual (Figura 1.9.B).

En cuanto al análisis sensorial realizado por el panel de expertos se observó que la sidra fermentada con *S. uvarum* NPCC1314 se destacó en características de tipo visuales, presentando mayor espalme, pegue e intensidad de color. Además, en cuanto a las propiedades olfativas las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314 se diferenciaron principalmente por los aromas frutales y en cuanto a variables gustativas presentó mayor acidez, amargor y cuerpo, estando estos parámetros dentro de un rango equilibrado y deseado según opinan los expertos (Figura 1.9.C).

1.5. Fermentaciones a escala semipiloto realizadas a 13°C

En segunda instancia se decidió realizar el mismo ensayo a escala semipiloto con mosto de la variedad Granny Smith, pero bajando esta vez la temperatura de fermentación a 13°C, con el objetivo de mejorar la capacidad de implantación de la levadura criotolerante (que había sido de casi 63% a 20°C). Paralelamente este estudio permitió evaluar el efecto de la temperatura de fermentación en el perfil fisicoquímico y organoléptico de las sidras.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en idénticas condiciones (bidones de 10 L conteniendo 8 L de mosto), esta vez utilizando mosto Granny Smith cosecha 2016 (Tabla 1.1). Las dos fermentaciones transcurrieron sin problemas; sin embargo y como era de esperarse, el proceso fue significativamente más largo requiriendo un total de 600 h (25 días) para su finalización. La cinética de fermentación obtenida a partir de los °Brix, se ajustó en esta oportunidad a un modelo de decaimiento sigmoideo (Lambert y Pearson, 2000). Como se puede observar en la Figura 1.10.A, y a diferencia de lo que sucedió a 20°C, las dos cepas presentaron un tiempo de latencia marcado antes de iniciar la fermentación vigorosa. En cuanto a los parámetros cinéticos, se observaron diferencias significativas en el parámetro M que indica el tiempo (en horas) que tardan las levaduras en consumir el 50% de los azúcares del mosto (t_{50}), siendo significativamente menor en las fermentaciones conducidas con la cepa de *S. uvarum* NPCC 1314 (Figura 1.10.B). Estos datos, sumados a los obtenidos a 20°C

evidenciaron una ventaja cinética significativa de la cepa *S. uvarum* NPCC1314 sobre la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213.

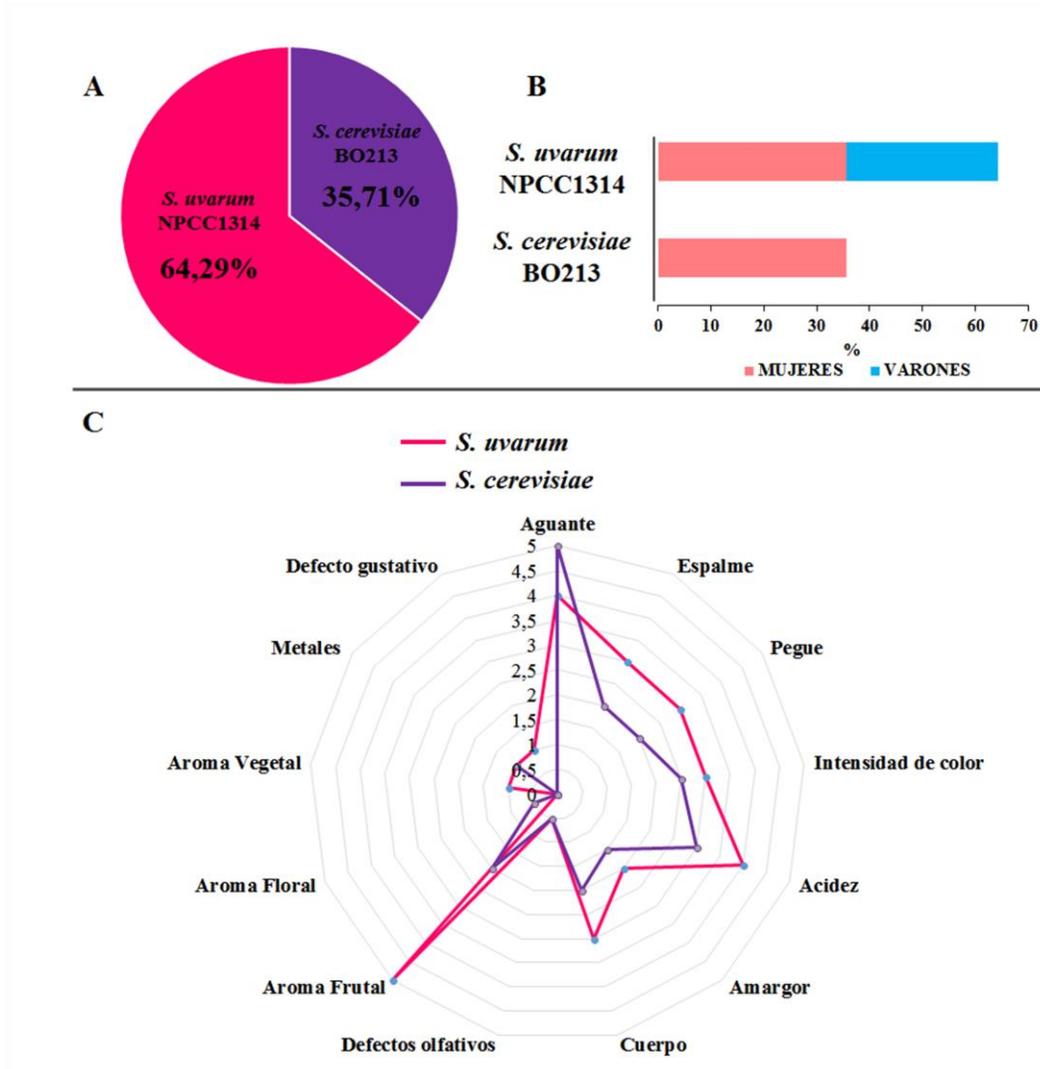


Figura 1.9. Análisis sensorial de las sidras fermentadas a 20°C. **A:** Porcentaje de preferencia de producto por público en general. **B:** Preferencia de producto con distinción entre sexos. **C:** Análisis descriptivo realizado por un panel entrenado.

En cuanto a la implantación de las cepas inoculadas, nuevamente no se observó implantación de la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213. Todas las colonias aisladas de los estadios finales de fermentación (20 de cada fermentación) fueron capaces de crecer a 37°C pero mostraron un perfil de mtDNA-RFLP denominado perfil A3, diferente al de la cepa

comercial inoculada, por ende en estas fermentaciones las propiedades de las mismas tampoco corresponden a las propiedades de la levadura inoculada.

Como era de esperarse, en las fermentaciones inoculadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314, la implantación mejoró sustancialmente respecto de lo que sucedió a 20°C. Todas las colonias fueron incapaces de crecer a 37°C y mostraron el perfil de mtDNA-RFLP de la cepa inoculada, observándose por lo tanto un 100 % de implantación (Figura 1.11).

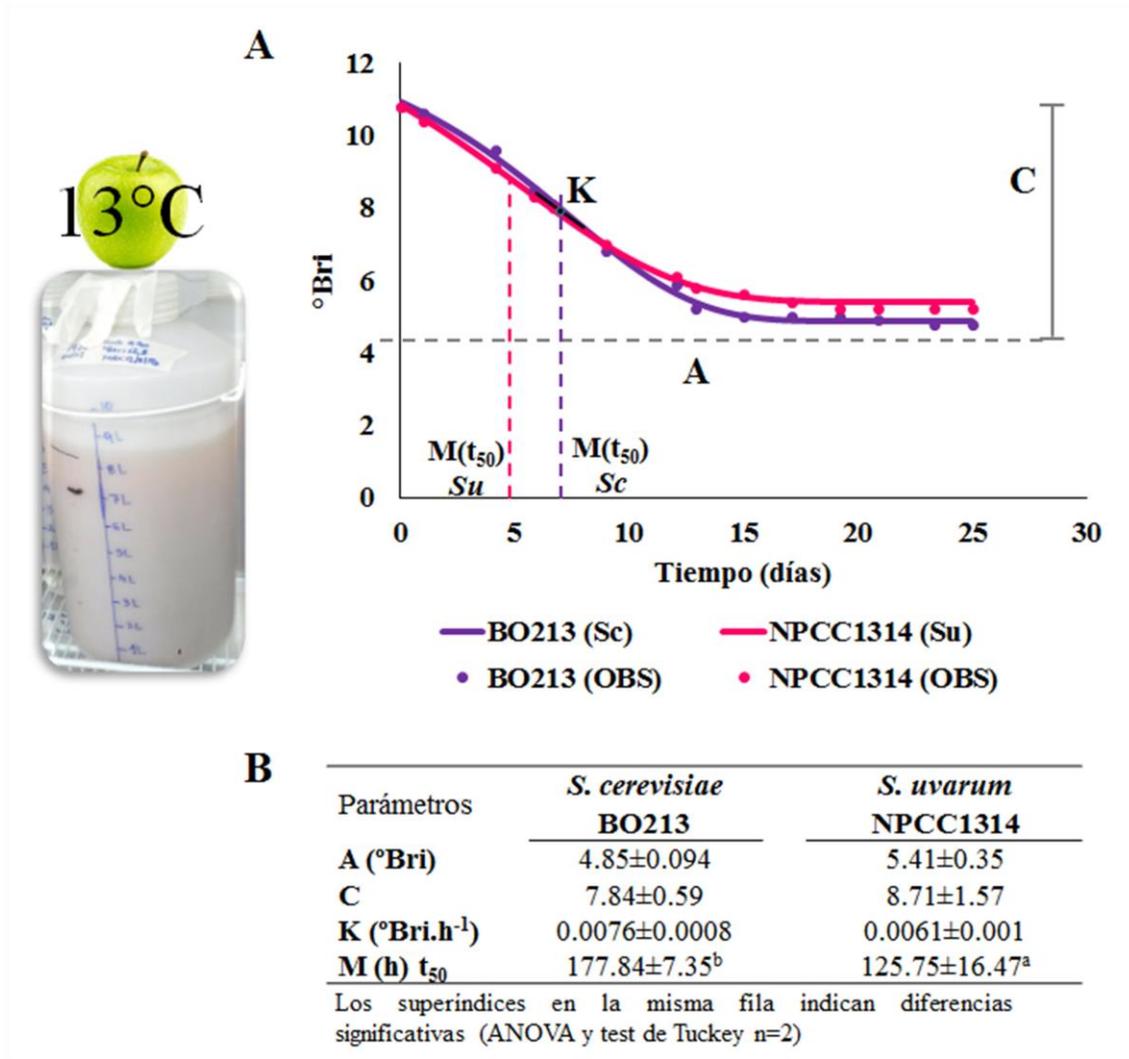


Figura 1.10. Cinética de las fermentaciones en escala semipiloto en mosto GS a 13 °C. **A:** Curvas modeladas; las líneas en el gráfico representan los datos modelados utilizando la ecuación de decaimiento sigmoideo (Lambert y Pearson 200) y los puntos los datos observados. **B:** Parámetros obtenidos para las dos levaduras evaluadas y ANOVA (test de Tukey n = 2).

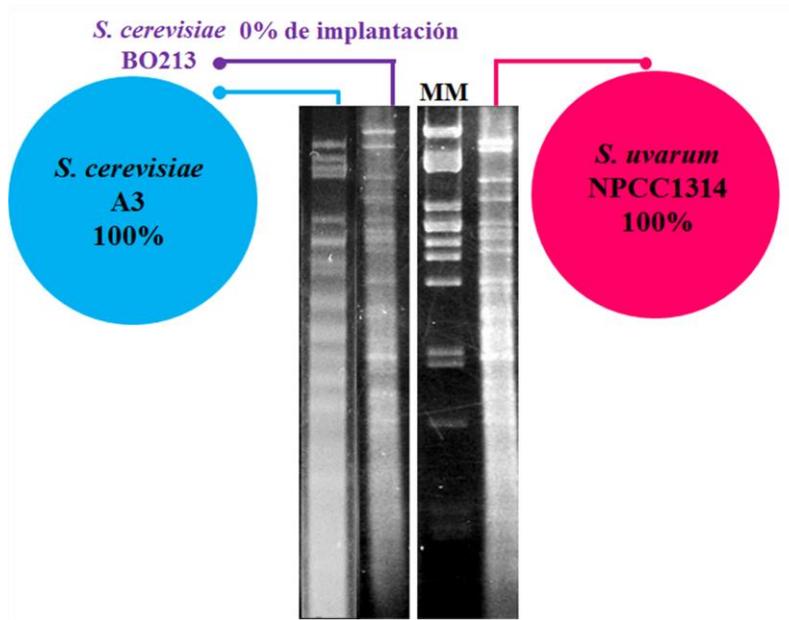


Figura 1.11: Perfiles mitocondriales encontrados en las fermentaciones a escala piloto realizadas a 13°C. MM: marcador molecular λ *Pst* I. Los gráficos de torta representan el porcentaje en el que se encontraron las cepas en el estadio final de fermentación

Se evaluaron los principales parámetros fisicoquímicos de las sidras base obtenidas de esta primera fermentación de igual manera que se realizó con las sidras base obtenidas a 20°C. Las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 presentó valores significativamente menores de fructosa residual y mayores de glicerol que las fermentadas con *S. cerevisiae* BO213. También se observó una concentración significativamente mayor de ácido láctico en las sidras base fermentadas con la cepa criotolerante, aunque no se evidenció diferencia en la concentración de ácido málico entre sidras base e incluso con el mosto de origen (Tabla 1.10).

Tabla 1.10. Compuestos generales del mosto utilizado en las fermentaciones a escala semipiloto y de las sidras base fermentadas con las dos cepas de levadura a 13°C

Tratamiento	Glucosa	Fructosa	Etanol (%v/v)	Glicerol	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido málico
Mosto GS 2015	39,24	88,44	ND	ND	ND	0,06	7,51
<i>S. cerevisiae</i> BO213 *	ND	4,11±0,47	8,13±0,04	4,13±0,21	0,04±0,02	0,16±0,01	7,29±0,33
<i>S. uvarum</i> NPCC1314 *	ND	1,27±0,45	8,04±0,05	5,31±0,55	0,01±0,01	0,24±0,04	7,54±0,11

* Sidras base obtenidas con cada una de las levaduras indicadas. GS: Granny Smith. Valores resaltados en negrita indican diferencias significativas (ANOVA and Tukey test n = 2) entre las sidras base mientras que en los valores no resaltados no se encontraron diferencias significativas. Todos los valores están expresados en g/L con excepción del etanol que se expresa en % v/v.

Posteriormente se realizó la segunda fermentación en botella, en las mismas condiciones que en la etapa anterior y en los productos finales se evaluó la lista completa de parámetros fisicoquímicos a fin de poder comparar los resultados con los obtenidos a 20°C.

Las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314 se destacaron por presentar una concentración significativamente mayor de glicerol y acetaldehído que las fermentadas con *S. cerevisiae* BO213. Es interesante mencionar que las concentraciones de glicerol se mantuvieron iguales a las obtenidas inmediatamente después de finalizada la primera fermentación, indicando que en la segunda fermentación no hubo producción de este compuesto.

Las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* presentaron además un pH significativamente menor que las fermentadas con *S. cerevisiae* BO213. Esto se relaciona a su vez con la presencia de cantidades significativamente mayores de ácido málico (y por consiguiente de ácidos totales dado que el ácido málico es el ácido orgánico predominante en mosto de manzana) en las sidras fermentadas con la cepa criotolerante. Por su parte, las bebidas obtenidas con la cepa *S. cerevisiae* BO213 presentaron mayores concentraciones de los ácidos orgánicos minoritarios láctico y acético (Tabla 1.11). Al comparar los valores registrados de estos dos ácidos orgánicos luego de la segunda fermentación con los obtenidos en las sidras base, se pudo observar que en la fermentación en botella realizada con la cepa *S. cerevisiae* BO213 hubo consumo del ácido málico y producción de ácido láctico de la misma forma que se observó en las fermentaciones llevadas a cabo a 20°C por esta misma levadura. Por el contrario, en las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 no se observó este efecto (Tablas 1.10 y 1.11).

Respecto del resto de los alcoholes superiores, las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 presentó también concentraciones significativamente mayores de 2-feniletanol y alcohol isoamílico. Los elevados niveles de estos alcoholes redundaron asimismo en valores significativamente más elevados de alcoholes superiores totales (Tabla 1.11).

Con respecto a los ésteres también se observaron concentraciones significativamente más elevadas de acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de dietilo y esterés totales en las sidras fermentadas con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 en relación a las sidras fermentadas con la cepa *S. cerevisiae* BO213.

Por último, entre los compuestos minoritarios las sidras fermentadas con *S. cerevisiae* BO213 presentaron mayores concentraciones de limoneno (Tabla 1.11).

A fin de poder visualizar de forma gráfica el perfil aromático de las diferentes sidras obtenidas a escala piloto, e incluso evaluar el posible efecto de la temperatura sobre las mismas, se realizó un ACP con todas las variables fisicoquímicas evaluadas en todos los productos. El plano conformado por las dos primeras componentes principales explicó el 79,9% de la variabilidad total observada (Figura 1.12.A).

En primera instancia se pudo observar que se logró una buena reproducibilidad de los datos, agrupándose los duplicados biológicos muy cercanos entre sí. Por otro lado, las sidras se separaron claramente en los cuatro cuadrantes del plano, en los cuadrantes inferiores se ubicaron las sidras fermentadas con la cepa *S. cerevisiae* BO213, mientras que en los superiores se ubicaron las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314. Por otro lado, también se pudo observar que en los dos cuadrantes derechos se ubicaron las sidras fermentadas a 20°C, mientras que en los izquierdos se localizaron las sidras fermentadas a 13°C (Figura 1.12.A). Esto indicaría que las variables explicadas por la CP1 se relacionan con el efecto de la temperatura, mientras que las variables explicadas por la CP2 explican las diferencias metabólicas entre las dos especies analizadas, independientemente de la temperatura utilizada para fermentar (Figura 1.12.B). El análisis de los productos utilizando el estadístico UPGMA, generó un primer gran agrupamiento por la temperatura de fermentación, es decir se agruparon todas las sidras fermentadas a 13°C por un lado y las fermentadas a 20°C por el otro. En un nivel menor de agrupamiento, esto sería realizar el corte a nivel de $k=4$, se separarían las sidras por levadura y temperatura (Figura 1.12.C).

Se observó entonces que las sidras fermentadas con la especie *S. uvarum* se agruparon por sus elevadas concentraciones de ácido málico, acetato de etilo y alcohol isobutílico (causa por la que se encuentran en los cuadrantes superiores), mientras que las sidras fermentadas con *S. cerevisiae* se diferenciaron por las altas concentraciones de ácido láctico y el elevado pH (causa por la que se ubican en los cuadrantes inferiores) independientemente de la temperatura de fermentación.

Por otro lado, las sidras fermentadas a 20°C se caracterizaron por presentar las concentraciones más elevadas de limoneno, decanoato de etilo y geraniol y presentar también algunos compuestos que no se detectaron a 13°C como el 1-propanol, 1-butanol, acetato de isobutilo, acetato de bencilo, lactato de etilo, linalool y nerol. Además, las sidras fermentadas

a 13°C presentaron algunos compuestos que estuvieron ausentes en las fermentadas a 20 °C como el alcohol bencílico y el hexanoato de etilo, mientras que tuvieron también concentraciones más elevadas de acetaldehído, 2-feniletanol y metanol. Las sidras fermentadas a 13°C con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 mostraron las mayores concentraciones de algunos de 2-feniletanol, acetaldehído, glicerol y varios esterés como el hexanoato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo. Por otra parte, las sidras fermentadas con esta misma cepa a 20°C se diferenciaron por presentar las más altas concentraciones de 1-hexanol, alcohol isobutílico, acetato de 2-feniletilo, 4-etilfenol y SO₂ libre (Figura 1.12).

Por último, el análisis sensorial de las sidras fermentadas a 13°C se realizó también con el público en general y el panel de expertos. En esta ocasión el público en general, independientemente del sexo, eligió a la bebida obtenida con la cepa comercial (Figuras 1.13.A y 1.13.B). Por otro lado, en cuanto al análisis realizado por el panel de expertos, si bien las características visuales fueron levemente mejores en las sidras realizadas con *S. uvarum* NPCC1314, se observaron algunos defectos de tipo gustativos y aromáticos como elevados niveles de acidez, amargor y retrogusto (Figura 1.13.C). Dentro de los defectos aromáticos encontrados para esta bebida los expertos mencionaron olores de tipo reducido y avinagrados.

Tabla 1.11: Características fisicoquímicas de sidras fermentadas a 13°C utilizando la cepa vínica *Sc* BO213 y la cepa de chicha *S. uvarum* NPCC1314

	<i>S. cerevisiae</i> BO213	<i>S. uvarum</i> NPCC1314
Compuestos generales		
Etanol (%v/v)	8,558 ± 0,352	8,346 ± 0,054
Glicerol (g/L)	4,154 ± 0,041	5,922 ± 0,052
Acetaldehído (g/L)	17,260 ± 1,710	32,650 ± 5,410
SO ₂ libre	10,250 ± 2,870	14,270 ± 5,780
SO ₂ total	50,870 ± 4,780	48,780 ± 6,280
pH	3,980 ± 0,050	3,470 ± 0,030
Metanol	40,060 ± 1,730	42,615 ± 5,635
Ácidos orgánicos		
Ácido acético (g/L)	0,123 ± 0,001	0,062 ± 0,009
Ácido láctico (g/L)	2,707 ± 0,002	0,368 ± 0,004
Ácido málico (g/L)	1,267 ± 0,110	5,787 ± 0,042
Total ácidos orgánicos	4,097 ± 0,113	6,217 ± 0,055
Alcoholes superiores		
1-propanol	ND	ND
1-butanol	ND	ND
1-hexanol	1,455 ± 0,025	1,735 ± 0,085
2-feniletanol	16,630 ± 1,460	51,385 ± 0,865
Alcohol bencílico	0,029 ± 0,001	0,039 ± 0,002
Alcohol isoamílico	171,785 ± 3,185	202,040 ± 10,700
Alcohol isobutílico	27,500 ± 1,390	35,335 ± 2,665
Total- alcohol isoamílico	45,614 ± 2,876	88,494 ± 3,617
Total alcoholes superiores	217,399 ± 6,061	290,534 ± 14,317
Esteres		
Acetato de etilo	10,335 ± 2,295	28,875 ± 1,085
Acetato de 2-feniletilo	0,030 ± 0,007	0,040 ± 0,008
Acetato de bencilo	ND	ND
Acetato de hexilo	0,021 ± 0,000	0,105 ± 0,021
Acetato de isoamilo	0,248 ± 0,028	0,485 ± 0,025
Acetato de isobutilo	ND	ND
Butirato de etilo	0,039 ± 0,012	0,107 ± 0,018
Decanoato de etilo	0,002 ± 0,001	0,040 ± 0,002
Hexanoato de etilo	0,142 ± 0,009	0,542 ± 0,049
Lactato de etilo	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Octanoato de etilo	0,101 ± 0,021	0,499 ± 0,041
Succinato de dietilo	0,053 ± 0,008	0,208 ± 0,055
Total- acetato de etilo	0,632 ± 0,086	2,024 ± 0,217
Esteres totales	10,967 ± 2,381	30,899 ± 1,302
Terpenos		
Limoneno	8,2x10⁻⁴ ± 3,5x10⁻⁵	3,8x10⁻⁴ ± 5x10⁻⁵
Linalool	ND	ND
Nerol	ND	ND
Geraniol	0,000537 ± 0,000067	0,00185 ± 0,00065
Terpenos totales	0,001361 ± 0,000102	0,00223 ± 0,00070
Fenoles volátiles		
4-etilfenol	0,001165 ± 0,000235	0,00165 ± 0,00025
4-etilguaicol	0,000550 ± 0,000090	0,00072 ± 0,00004
Total fenoles volátiles	0,001715 ± 0,000325	0,00237 ± 0,00029

Valores resaltados en negrita indican diferencias significativas entre las sidras fermentadas con las dos levaduras (ANOVA and Tukey test n = 2) mientras que en los valores no resaltados no se encontraron diferencias significativas. Todos los valores están expresados en mg/L con excepción de los indicados particularmente entre paréntesis.

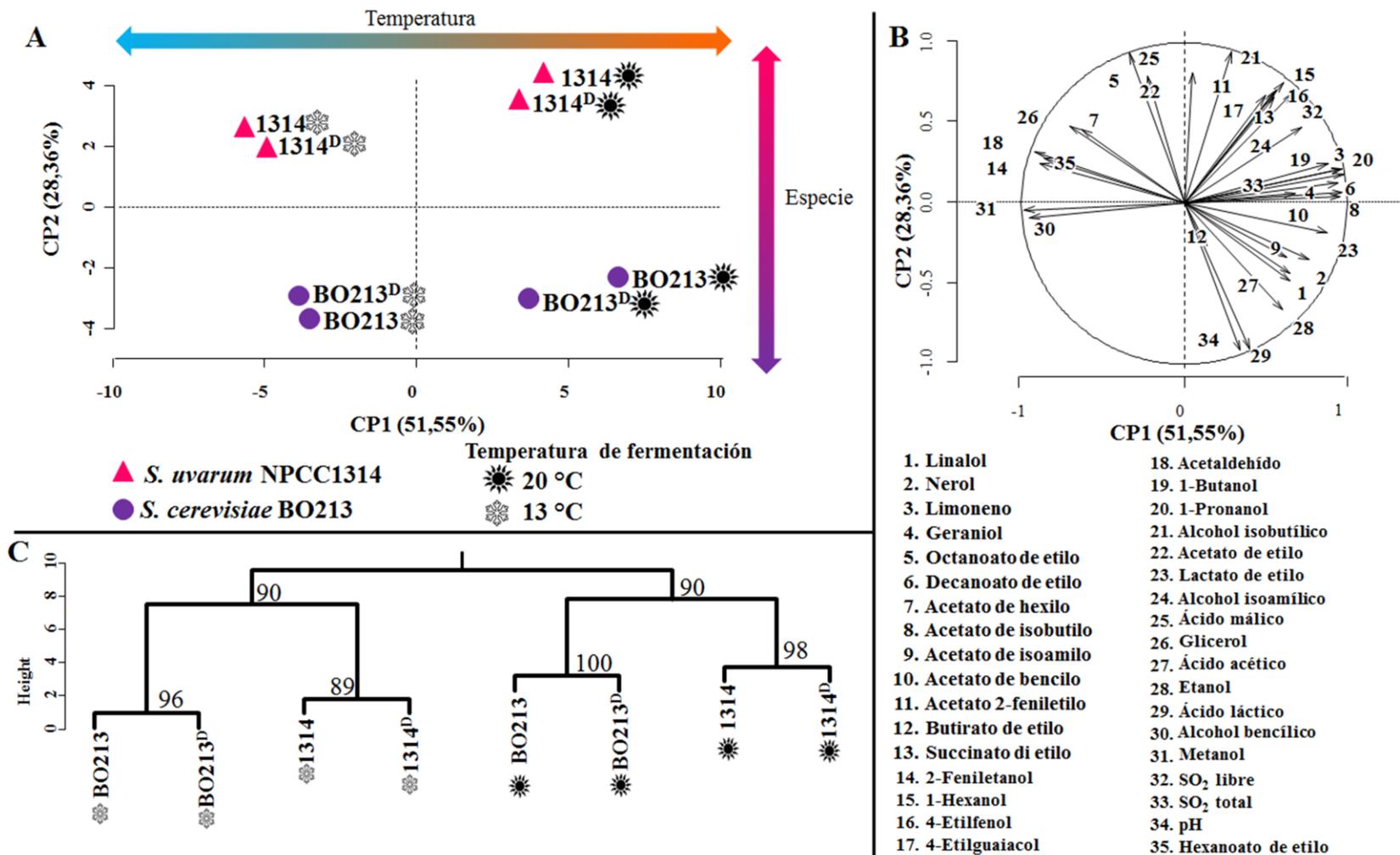


Figura 1.12. **A:** ACP realizado a partir de los compuestos fisicoquímicos detectados en las fermentaciones realizadas a dos diferentes temperaturas (13°C y 20°C) con dos especies de levaduras. **B:** Proyección de los autovectores en el plano principal CP1 y CP2; el tamaño de cada autovector es directamente proporcional al porcentaje de la variabilidad explicada en las dos componentes, en el listado de abajo se detallan las variables utilizadas. **C:** UPGMA de asociación entre levaduras, los números representan el porcentaje de soporte del clado (botstrapping). Superíndice D indica duplicado biológico.

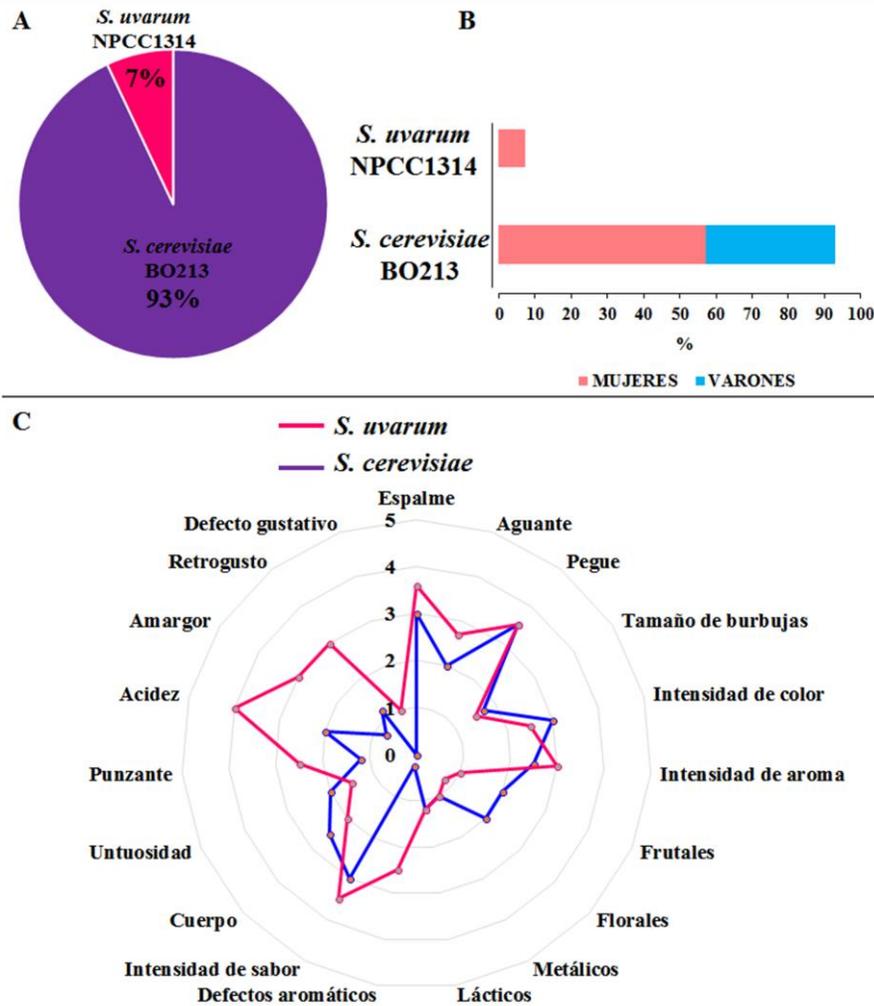


Figura 1.13. Análisis sensorial de las sidras fermentadas a 13°C. **A:** Porcentaje de preferencia de producto por público en general. **B:** Preferencia de producto con distinción entre sexos. **C:** Análisis descriptivo realizado por un panel entrenado.

DISCUSION

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo estrechamente asociado a la historia del hombre ya que participa de los procesos de elaboración de pan, vino y sidra entre otros alimentos. Esto, sumado a su capacidad de sobrevivir y crecer en sustratos con elevadas concentraciones de azúcares y etanol y a su naturaleza cosmopolita, ha convertido a esta especie en objeto de numerosas investigaciones que la posicionaron incluso como modelo biológico de estudio en eucariotas (Moreno-Arribas y Polo, 2005). Otras especies

menos conocidas dentro del género *Saccharomyces* también han sido asociadas a la elaboración de alimentos fermentados. Algunas cepas de estas especies pueden poseer características industriales similares o incluso superiores a *S. cerevisiae* o, al menos, mostrar una mejor capacidad que *S. cerevisiae* que le permiten adaptarse a procesos con características particulares. Tal es el caso de la especie *S. uvarum*, generalmente asociada con procesos fermentativos conducidos a bajas temperaturas y/o ricos en fructosa (Almeida et al., 2014; Coton et al., 2006; Naumov et al., 2002; Sipiczki, 2008; Suarez-Valles et al., 2005; Suárez Valles et al., 2007) debido a su naturaleza criotolerante y fructofílica. De ahí la importancia que cobra esta especie de levadura en la elaboración de sidras. A pesar de sus interesantes características, solo unos pocos trabajos han profundizado en el estudio de las particularidades metabólicas y el potencial biotecnológico de esta especie si se compara con los estudios realizados en *S. cerevisiae* (Gamero et al., 2011; Magalhães et al., 2017a, 2017b; Origone et al., 2018).

La principal razón de este fenómeno puede ser la relativamente reciente aceptación de *Saccharomyces uvarum* como especie individual, separada de *S. eubayanus* y del grupo de híbridos conocidos como *S. bayanus* (Libkind et al., 2011; Nguyen et al., 2000; Rainieri et al., 1999). *Saccharomyces eubayanus*, es la especie hermana de *S. uvarum*, más cercana hasta el momento, fue descrita el año 2011 a partir de muestras de bosques patagónicos y solo ha sido aislada en ambientes naturales (Libkind et al., 2011). Aunque posteriormente se aislaron cepas de esta especie en otros lugares del mundo, el reducido número de cepas disponibles en comparación con *S. cerevisiae* y su ausencia en fermentaciones son la razón de la relativamente escasa información sobre su fisiología y potencial biotecnológico (Eizaguirre et al., 2018; Hebly et al., 2015; Magalhães et al., 2017a; Naumov, 2017; Origone et al., 2017).

En la primera etapa de esta Tesis se evaluó la potencialidad para fermentar mostos de manzana de un grupo de cepas pertenecientes a las especies criotolerantes *S. uvarum* y *S. eubayanus*, aisladas de diferentes sustratos (chicha y *A. araucana*), utilizando mosto de manzana estéril, a fin de relacionar directamente las características de las sidras obtenidas con el metabolismo particular de cada cepa inoculada. Desde un punto de vista geográfico las áreas de origen de estas cepas son relativamente cercanas y muestran características climáticas similares. No obstante, el sustrato de origen de donde fueron aisladas, y por consiguiente el nicho ecológico específico de las mismas, fue diferente. Estos orígenes

diferentes se asociaron claramente con las propiedades fisiológicas de las cepas, tal como se reveló en esta Tesis. Las sidras obtenidas a partir de las microfermentaciones (50mL) con cepas aisladas de ambientes naturales (tanto *S. uvarum* como *S. eubayanus*) mostraron características similares y se diferenciaron de las obtenidas con cepas aisladas de ambientes fermentativos (tanto *S. uvarum* como *S. cerevisiae*) lo que indica un marcado efecto del origen de aislamiento y no de la constitución genética de las cepas.

Se han propuesto diferentes explicaciones sobre la capacidad fructofílica de las especies del género *Saccharomyces*. El transporte de glucosa y fructosa se realiza a través del mecanismo de difusión facilitada mediado por las proteínas Hxt (Leandro et al., 2009). Sin embargo, tanto en *S. uvarum* como en *S. eubayanus* (y en muchos de los híbridos que contienen porciones de genoma de estas especies como los conocidos como *S. pastorianus* y *S. bayanus*) existe un transportador adicional, específico para fructosa, que funciona como un simporte con protones denominado Fsy1 (Anjos et al., 2013). Mientras que los alelos del gen *FSY1* detectados en *S. eubayanus* y *S. pastorianus* son muy similares, el alelo presente en la cepa de *S. uvarum* CBS7001 resulta relativamente diferente lo cual coincide con la distancia filogenética que existe entre estas especies hermanas (Kellis et al., 2003). Algunas cepas vínicas de *S. cerevisiae* también presentan el gen *FSY1*, aunque la secuencia de este alelo es diferente a la encontrada en *S. eubayanus* y *S. uvarum* y se cree que se originó por transferencia horizontal a partir de levaduras no-*Saccharomyces* (Galeote et al., 2010; Novo et al., 2009). La afinidad del transportador Fsy1 por la fructosa es al menos un orden de magnitud mayor que la de los transportadores Hxt lo que puede conferir una ventaja adaptativa sustancial en ambientes con baja concentración de fructosa (Anjos et al., 2013).

En este contexto, la diferencia que existe entre el mosto de uvas que contiene proporciones equimolares de glucosa y fructosa, y el mosto de manzana que presenta en general una proporción más elevada de fructosa, convierten a este último en un sustrato ideal para el desarrollo de levaduras fructofílicas como las estudiadas en esta Tesis. Se ha reportado que los mostos de manzana pueden presentar porcentajes de 74% p/v de fructosa, 11% p/v de glucosa, e incluso también contienen sacarosa en porcentajes similares a los de glucosa (Williams et al. 2009). Estos porcentajes son variables dependiendo de la variedad de manzana, el momento de cosecha, etc. (Markowski et al., 2009), llegando incluso en ocasiones a valores casi equimolares de ambos azúcares (Vidrih y Hribar, 1999).

En cuanto al contenido de azúcares residuales de las sidras de esta Tesis -que corresponde mayormente a fructosa- todas las levaduras completaron el consumo de los mismos, no encontrándose diferencias entre cepas. Varias publicaciones hacen énfasis en la capacidad fructofílica de *S. uvarum* (Gamero et al., 2013) por lo que podría esperarse una diferencia en los valores residuales de este azúcares; sin embargo, en las condiciones de microfermentación (50 mL) no se observaron diferencias significativas en este parámetro. Por el contrario, en fermentaciones de 1 L realizadas con las cepas preseleccionadas *S. eubayanus* NPCC1292, *S. uvarum* NPCC1290 y *S. uvarum* NPCC1314, la concentración de fructosa residual más elevada fue observada en las sidras fermentadas con *S. eubayanus* (aunque sólo en mosto GS). Magalhães et al., (2017a) también observaron esta dificultad de *S. eubayanus*, y de híbridos entre *S. eubayanus* y *S. cerevisiae* de finalizar el consumo los azúcares residuales en mosto *Sauvignon blanc*. No obstante, la concentración de azúcares en este mosto de uvas (y por consiguiente de etanol en el vino resultante) es significativamente mayor al encontrado en los mostos de manzana, lo cual podría justificar lo sucedido en el caso de estos autores. En el caso de las sidras elaboradas en esta Tesis los azúcares residuales probablemente podrían haberse consumido completamente con más tiempo de fermentación, tal como sucedió en las microfermentaciones.

De acuerdo a reportes bibliográficos en vino, *S. uvarum* produce concentraciones menores de etanol que *S. cerevisiae* (Castellari et al., 1994; Magyar y Tóth, 2011; Naumov et al., 2002). Recientemente se observó este comportamiento también en cepas de su especie hermana *S. eubayanus* (Magalhães et al., 2017a). En este trabajo se encontraron diferencias significativas en la concentración de etanol en las fermentaciones realizadas con cultivos puros, es decir con mosto estéril inoculado (fermentaciones de 50 mL y 1L). En el caso de las microfermentaciones, las cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* de ambientes naturales parecen haber producido los niveles más bajos de etanol (como puede evidenciarse en el valor del parámetro cinético A), mientras que *S. cerevisiae* los valores más elevados. El etanol es un compuesto importante que contribuye al *flavor* de las bebidas y es un producto de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, cuya función principal es la producción de energía sobre todo en condiciones de anaerobiosis.

El glicerol es otro de los metabolitos mayoritarios producidos a partir de la vía glucolítica. Este compuesto es principalmente producido en las fases tempranas de la

fermentación, como respuesta a estrés osmótico (Nevoigt, 2008) y permite además mantener el balance redox en las células alteradas debido al exceso de NADH citoplasmático producido por el proceso glucolítico acelerado típico de las fermentaciones (Albers et al., 1998; Valadi et al., 2004). El glicerol también ha sido asociado con la adaptación de las levaduras al crecimiento a bajas temperaturas ya que funciona como un estabilizante de la membrana plasmática alterando (Sutherl y et al., 1997). Este alcohol contribuye de manera positiva a la calidad de las bebidas fermentadas ya que provee un leve sabor dulce, aumenta la untuosidad y reduce la astringencia de las bebidas (Ishikawa y Noble, 1995; Remize et al., 1990; Swiegers y Pretorius, 2005). La producción de elevadas concentraciones de glicerol ha sido propuesta como una característica típica de *S. uvarum* (Antonelli et al., 1999; Castellari et al., 1994; Gamero et al., 2013; López-Malo et al., 2013; Rainieri et al., 1999). No obstante, algunos autores proponen que esta propiedad es muy variable en las distintas cepas de *S. uvarum* (Magyar y Tóth, 2011). En este sentido, Masneuf-Pomarède et al., (2010) encontraron grandes variaciones en la producción de glicerol al comparar diferentes cepas de esta especie al realizar fermentaciones utilizando mosto sintético; incluso no evidenciaron diferencias significativas en comparación con *S. cerevisiae*. Nuestros resultados también evidencian una elevada variación en la producción de este compuesto para las cepas analizadas en mosto de manzana, independientemente de su origen, aunque en general todas produjeron valores significativamente mayores que *S. cerevisiae*.

En relación al balance entre etanol y glicerol en los productos fermentados (1 L), las cepas preseleccionadas de *S. eubayanus* (NPCC1292) y *S. uvarum* (NPCC1290, NCC1314) produjeron mayores concentraciones de glicerol que *S. cerevisiae* (NPCC1178). Una potencial explicación para la producción elevada de glicerol sin la reducción de etanol, es la disminución de la síntesis de ácido acético, (metabolito intermediario en la producción de etanol). Esto pudo evidenciarse experimentalmente en los niveles reducidos de acidez volátil en todas las fermentaciones realizadas con las cepas no-*S. cerevisiae* (tanto de 50 mL como de 1 L).

El ácido pirúvico producido durante la glucólisis, también es sustrato para la síntesis de cetoácidos superiores, compuestos claves en la producción de la mayoría de los alcoholes, ácidos y ésteres. Entre los ésteres, uno de los compuestos más significativos que afecta el *flavor* en las bebidas fermentadas es el acetato de etilo. Como el etanol es el alcohol

dominante en sidra, el acetato de etilo, producido de acetyl-CoA y etanol, es el éster más abundante. El acetato de etilo, junto con el ácido acético, aportan a la sensación de acidez y astringencia de estas bebidas y son compuestos no deseados a elevadas concentraciones (Whiting, 1976). A pesar de que en este trabajo la concentración de ácido acético fue baja, particularmente en fermentaciones conducidas con *S. uvarum* y *S. eubayanus*, la producción de acetato de etilo fue siempre la más elevada (dos y tres veces más en mostos RG y GS, respectivamente) en sidras elaboradas con la cepa NPCC1314 de *S. uvarum* aislada de ambiente fermentativo. Esta cepa fue, a su vez, la mayor productora de otros ésteres como acetato de 2-feniletilo y de isobutilo, octanoato y decanoato de etilo. Todos estos ésteres han sido relacionados con notas frutales y florales, deseadas en bebidas fermentadas: el acetato de isobutilo se asocia con el *flavour* frutal, octanoato de etilo con notas de manzana, decanoato de etilo con pera y acetato de 2-feniletilo con *flavour* floral (Huang et al., 2001; Lambrechts y Pretorius, 2000).

La naturaleza y la concentración de los ácidos orgánicos presentes en la sidra son también un factor importante que influye en las características organolépticas. El principal ácido orgánico en sidras de manzana es el ácido málico, aunque las variedades de sidra de manzana comúnmente contienen otros ácidos, como el shikímico, quínico, clorogénico y p-cumárico (Beech, 1972). Todos estos ácidos son extremadamente importantes en el balance del *flavour* de las sidras. Como era de esperarse, el ácido málico fue el ácido más abundante en las sidras analizadas en esta Tesis utilizando cultivos puros de las levaduras en estudio. El contenido de ácido málico fue significativamente más elevado en las sidras fermentadas tanto con *S. uvarum* como con *S. eubayanus* utilizando mosto de manzana GS; este fenómeno puede relacionarse con la capacidad descrita de *S. uvarum*, probablemente presente en *S. eubayanus* también, de sintetizar ácido málico en lugar de degradarlo (Castellari et al., 1994; Giudici et al., 1999), sin embargo en esta etapa (fermentaciones de 1 L) no se midió la concentración inicial de ácido málico, por ende también puede deberse a un consumo menor de este ácido en relación a *S. cerevisiae*. No obstante, las diferencias más importantes en el contenido de ácidos orgánicos entre las sidras fermentadas con las diferentes cepas se evidenciaron en el contenido de ácido shikímico. Los niveles de ácido shikímico más elevados fueron detectados en las fermentaciones conducidas con *S. uvarum*, independientemente del origen (de ambiente natural o fermentativo). El ácido shikímico,

formado por fosfoenol-piruvato y eritrosa-4-fosfato, está involucrado en la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptófano, y la fenilalanina es el precursor para la síntesis de acetato de 2-feniletanol y su ester acetato de 2-feniletilo (Dietrich y Pour-Nikfardjam, 2009). Tanto el alcohol superior 2-feniletanol como el acetato de 2-feniletilo se encontraron, coincidentemente, en concentraciones significativamente elevadas en las sidras elaboradas con las cepas criotolerantes. Datos previamente reportados indican que la producción de estos compuestos es un rasgo típico de *S. uvarum* (Antonelli et al., 1999; Gamero et al., 2013; Masneuf-Pomarède et al., 2010; Stribny et al., 2015). Por los tanto, nuestros resultados podrían indicar que estas vías metabólicas podrían constituir una diferencia importante entre las tres especies estudiadas en este capítulo.

Junto con el 2-fenietanol, el alcohol isoamílico – y, consecuentemente, la cantidad total de alcoholes superiores – se encontraron en proporciones significativamente más elevadas en sidras fermentadas con las levaduras criotolerantes (tanto *S. eubayanus* como *S. uvarum*) respecto de las producidas con *S. cerevisiae* a escala de 1 L. Los alcoholes superiores son, cuantitativamente, los principales componentes en sidra (Herrero et al., 2006). Son productos secundarios tanto del metabolismo anabólico (vía de Genevois y Lafon) como catabólico (vía de Ehrlich) (Mangas et al., 1996), y junto a la vía de síntesis de glicerol permiten mantener el balance redox involucrando los cofactores NAD⁺/NADH. Algunos alcoholes superiores, particularmente el alcohol isoamílico, contribuyen de manera desagradable al *flavour* a concentraciones elevadas (Rous y Snow, 1983), superiores a los 300mg/L, pero por debajo de esas concentraciones contribuyen positivamente al *flavour* de las bebidas (Lambrechts y Pretorius, 2000). Por otra parte, el 2-fenietanol es responsable del aroma a pétalos de rosas y miel y es considerado uno de los alcoholes superiores de contribución más importante al *flavour* de las bebidas fermentadas. Una de las propiedades enológicas específicas de *S. uvarum* es la producción elevada de alcoholes superiores totales y, específicamente, de 2-feniletanol (Coloretti et al., 2006; Demuyter et al., 2004; Gangl et al., 2009; Masneuf-Pomarède et al., 2010). Esta Tesis, representa uno de los escasos reportes sobre la misma capacidad por parte de *S. eubayanus* junto con el trabajo de Magalhães et al., (2017a, 2017b) quienes observan una alta producción de este compuesto en fermentaciones en mostos de vino y manzana por híbridos artificiales entre *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* y por su parental criotolerante. La habilidad de producir niveles elevados de 2-feniletanol, también ha sido

relacionada a una mejor capacidad de utilizar el nitrógeno asimilable presente en mostos, una característica que podría estar relacionada a la especie de levadura (Mendes-Ferreira et al., 2009; Torrea et al., 2003) y que ha sido profundizada en el segundo capítulo de este trabajo.

Además, en esta etapa, se evaluó la capacidad de las levaduras analizadas de producir un conjunto de actividades enzimáticas relacionadas con el mejoramiento del aroma o la estabilización de las sidras, incluyendo pectinasa, proteasa y glicosidasa (Fleet, 2008; Gunata et al., 1988; Hsu et al., 1989; Martín y Morata de Ambrosini, 2014; Paillar, 1990; Pando Bedriñana et al., 2012; Ugliano, 2009). Es sabido que *S. cerevisiae* no es una buena productora de enzimas extracelulares, no obstante, sólo unos pocos (relacionados a *S. uvarum*) o ningún (relacionados a *S. eubayanus*) reporte bibliográfico ha demostrado la evaluación de estas actividades en las especies criotolerantes aquí estudiadas. Nuestro ensayo de *screening* enzimático cualitativo evidenció las cuatro actividades probadas en estas especies criotolerantes, con la única excepción de la ausencia de actividad proteasa en *S. eubayanus*. Por otro lado, es interesante resaltar la importancia de utilizar al menos dos tipos de sustratos para el estudio de β GI (beta-glucosidasa) para minimizar el riesgo de obtener resultados falso-negativos, causados por la selectividad sustrato específico de la enzima, tal como fue reportado por Hernandez et al., (2003). La actividad antagonista de una levadura que será utilizada como cultivo iniciador es, también, considerada como un atributo de relevancia tecnológica (Rainieri y Pretorius, 2000). Cepas con esta característica serán capaces de inhibir el crecimiento de levaduras nativas de *S. cerevisiae* presentes durante las fermentaciones naturales, mejorando su capacidad de implantación en el mosto. En este capítulo, se observó por primera vez actividad antagonista por parte de *S. eubayanus*, siendo particularmente efectiva contra *S. cerevisiae*, constituyendo una característica relevante adicional a ser considerada en la producción de sidra y también de algunas cepas de *S. uvarum*.

El estudio de levaduras no convencionales en mosto no estéril es dificultoso ya que en estas nuevas condiciones se establecen un sinnúmero de relaciones entre las especies y cepas de levaduras naturalmente presentes en el mosto y la cepa inoculada. También participan de estas interacciones las bacterias lácticas presentes en la superficie de la fruta y por consiguiente en el mosto obtenido. Si bien las sidras comerciales en su mayoría son gasificadas artificialmente y contienen agregados de azúcares muy elevados (más de 60 g/L)

se decidió utilizar el método *champenoise* para obtener los productos gasificados a partir de las fermentaciones de escala semipiloto. Este método que consiste en una segunda fermentación en botella permite obtener productos de mayor calidad. Asimismo, se decidió utilizar concentraciones de azúcares más bajas (*extra brut* -12 g/L) para poder diferenciar mejor las características propias de las levaduras que se enmascaran cuando se utilizan concentraciones de azúcares más elevadas.

La cepa de levadura comercial BO213 (*S. cerevisiae*) fue elegida para ser comparada con la cepa de *S. uvarum* principalmente porque es el starter comercial más utilizado por los productores regionales para el tipo de bebida. De hecho, a nivel mundial existe un único starter comercial de la especie *S. uvarum* denominada Velluto y comercializada por la firma Lallemand. En la Argentina no resulta sencillo adquirir cultivos iniciadores comerciales desarrollados exclusivamente para sidras e incluso a nivel mundial son muy escasos (Gusmer Enterprises, Inc®). Es por ello que actualmente los productores de la zona utilizan starters comerciales de la especie *S. cerevisiae* desarrollados para vinos. La cepa comercial BO213 (ACTIFLOR-Laffort) es una cepa reportada como fructofílica, con alta resistencia al etanol y adaptada a las bajas temperaturas, por lo que resulta de interés para la fermentación de mosto de manzana.

Las concentraciones de sulfito adicionado al mosto también fueron definidas previamente, debido a que hasta el momento no se contaba con datos de la resistencia de las cepas de *S. uvarum* a este compuesto antimicrobiano utilizado en la industria (variable que se profundizará en el capítulo II de esta tesis), y dado el hecho de que en la producción de chichas no se agrega este compuesto, decidimos suplementar los mostos con una dosis baja de metabisulfito de potasio (100 mg/L) que corresponde a la mitad de la concentración que se utiliza en las sidreras.

Otra variable que resultó interesante definir y comparar fue la temperatura. Debido a su naturaleza criotolerante, las cepas de *S. uvarum* presentan una ventaja sustancial frente a *S. cerevisiae* en procesos llevados a cabo a baja temperatura. No obstante, resulta importante para un proceso que pretende desarrollarse a escala industrial, utilizar temperaturas que sean factibles de reproducir en la sidrera. Por ello se evaluaron dos temperaturas diferentes en años consecutivos. En una primera instancia se realizaron las fermentaciones a 20 °C, obteniéndose valores de implantación de la cepa seleccionada *S. uvarum* NPCC 1314 de 63%,

luego de la primera fermentación. A esta misma temperatura la implantación de la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213 fue de 0%.

La temperatura de fermentación de 20°C corresponde a una temperatura en la que *S. uvarum* se desarrolla de manera óptima (Gonzalez et al., 2006; Origone et al., 2017), mientras que *S. cerevisiae* prefiere temperaturas superiores (Alonso-del-Real et al., 2017; González et al., 2007). No obstante, en este estudio las levaduras aisladas de final de fermentación inoculada con la cepa *S. uvarum* NPCC1314 (27% del total) correspondieron a la especie *S. cerevisiae*, lo que indicaría que quizás otras cepas de *S. cerevisiae* se encuentren mejor adaptadas a fermentar mostos de manzana a baja temperatura que la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213. Existen otros reportes que demuestran que de que a temperaturas de fermentación bajas (entre 12°C y 20°C) coexisten ambas especies en vinos (Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2000; Sipiczki et al., 2001) y sidras (Coton et al., 2006; Suárez Valles et al., 2007). Alonso-del-real et al., (2017) también observaron que cuando diferentes especies de *Saccharomyces* no-*cerevisiae* (*S. eubayanus*, *S. uvarum* y *S. kudriavzevii*) compiten en fermentaciones con la cepa vínica de *S. cerevisiae* T73 a 12°C, sólo la especie *S. uvarum* es capaz de dominar la fermentación, lo cual concuerda con los buenos resultados obtenidos de implantación de *S. uvarum* en esta Tesis a 20 °C. Seguidamente se repitió el mismo proceso modificando únicamente la temperatura de fermentación (13 °C), a fin de evaluar si este cambio permitía obtener valores mayores de implantación de la levadura *S. uvarum* NPCC 1314. Como era de esperarse, la implantación por la cepa *S. uvarum* NPCC1314 mejoró radicalmente, obteniéndose porcentajes de implantación de 100%. Nuevamente no se observó implantación de la cepa *S. cerevisiae* BO213, de hecho, las fermentaciones fueron conducidas por una cepa de la especie *S. cerevisiae* diferente de la cepa *S. cerevisiae* BO213, claramente mejor adaptada a estas condiciones de fermentación.

Otra posible causa de la baja implantación de la cepa vínica comercial de *S. cerevisiae* BO213 podría ser la composición química del mosto. El mosto de manzana tiene propiedades muy distintas a la mayoría de los mostos de vino y se diferencian principalmente en las altas concentraciones de fructosa. Como se mencionó previamente, la proporción glucosa/fructosa es muy variable en las diferentes manzanas y quizás en mosto Granny Smith con proporciones de 0,4 (70% fructosa), la cepa vínica *S. cerevisiae* BO213 no encuentre condiciones de crecimiento favorables. Las concentraciones de ácido málico también fueron

significativamente diferentes entre mostos de manzana y uva. En el caso particular del mosto Granny Smith utilizado en esta Tesis el contenido de ácido málico correspondió a aproximadamente 7 g/L, lo cual resulta el doble que lo observado en mosto de uvas (Origone, 2017). Todas estas características de los mostos de manzana pudieron favorecer la implantación de cepas de *S. cerevisiae* diferentes a la inoculada, quizás mejor adaptadas a fermentaciones en este tipo de mosto.

Los datos obtenidos a ambas temperaturas indican que la cepa comercial *S. cerevisiae* BO213 no es apropiada para realizar fermentaciones en mosto de manzana al menos de esta variedad y a las temperaturas evaluadas. El hecho de que varios productores utilicen esta cepa en sus procesos puede relacionarse al uso de otras variedades de manzana y temperaturas de fermentación más elevadas. No obstante, cabe mencionar que en ningún caso los elaboradores de sidra regionales realizan estudios de implantación en sus productos, por lo que podría estar ocurriendo lo mismo en sus procesos sin tener conocimiento de ello.

Por lo detallado previamente, todas las propiedades fisicoquímicas evaluadas en las sidras inoculadas con la cepa comercial BO213 a escala semipiloto no se pueden atribuir a la levadura, debido a que no hubo implantación, simplemente se puede comparar el perfil de las sidras fermentadas con la cepa NPCC1314 (*S. uvarum*) con sidras fermentadas con la especie *S. cerevisiae*. En este sentido se observaron varias diferencias interesantes que se podrían atribuir a los diferentes factores involucrados: las levaduras que dominaron la fermentación, las temperaturas de fermentación y los microorganismos que coexistieron en estas fermentaciones.

Con respecto a los ácidos orgánicos evaluados en este trabajo, se observó un marcado perfil por especie y no un efecto de la temperatura. Las mayores diferencias se observaron luego de la segunda fermentación (en botella). Las sidras inoculadas con la cepa *S. cerevisiae* BO213 evidenciaron un consumo completo del ácido málico con una elevada producción de ácido láctico, lo cual indicaría el desarrollo del proceso metabólico conocido como fermentación maloláctica (FML) llevada a cabo por bacterias del ácido láctico (BAL). Durante la FML, las BAL transforman el ácido málico en ácido láctico mediante la enzima maloláctica (Lonvaud-Funel, 2001). Esta transformación reduce considerablemente el pH de la bebida, dado que el ácido láctico presenta un único grupo funcional ácido carboxílico, mientras el ácido málico presenta dos grupos funcionales correspondientes a ácidos

carboxílicos. Existen múltiples reportes de la manifestación de FML en sidras secas de España, Francia y Estados Unidos (Dueñas et al., 1994; Suarez-Valles et al., 2005). La mayoría de las FML espontáneas ocurren luego de terminada la fermentación alcohólica, cuando las concentraciones de azúcares son bajas y las de etanol altas, en un ambiente anaeróbico donde ya las levaduras dejan de ser competitivas (Sánchez et al., 2010). Este es el caso de las sidras inoculadas en esta Tesis con la cepa *S. cerevisiae* BO213, ya que si se comparan las concentraciones de los dos ácidos orgánicos se evidencia que la FML ocurrió durante la segunda fermentación en botella. Aunque todas las sidras evaluadas siguieron el mismo proceso (método *champenoise*); las sidras fermentadas con *S. uvarum*, independientemente de la temperatura de fermentación utilizada, no presentaron FML (inhibición de la FML) mientras que las fermentadas con *S. cerevisiae* (perfil A1 y A3) si lo hicieron.

Se han descrito varios mecanismos de interacción específica entre diferentes cepas de *S. cerevisiae* y diferentes especies de BAL, que podrían ocurrir durante los procesos fermentativos. Estos mecanismos fueron evaluados mayormente para procesos de vinificación y pueden llevar al desarrollo exitoso de ambos microorganismos o a la supresión de uno de ellos (se detallan varios ejemplos en la revisión llevada a cabo por Costantini et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de interacciones entre *S. uvarum* y BAL, ni tampoco en procesos de elaboración de sidras por lo que los resultados expuestos constituyen un interesante punto de partida para el desarrollo de nuevas investigaciones sobre este tipo de interacciones.

La inhibición de la FML en las sidras fermentadas con *S. uvarum* NPCC1314 pudo deberse a diferentes factores:

(i) las bajas concentraciones de etanol que se dieron en la segunda fermentación en botella en las sidras fermentadas con *S. uvarum*. Existen reportes que analizan el enlentecimiento o directamente la parada de la FML debidas a las bajas concentraciones de etanol en las bebidas, ambiente no propicio para el desarrollo de las BAL (Berbegal et al., 2017; Costantini et al., 2017).

(ii) la producción de algunos metabolitos secundarios que podrían inhibir el desarrollo de las BAL. Existen reportes en cepas de *S. cerevisiae* criotolerantes productoras de altas concentraciones de algunos ácidos orgánicos (compuestos no medidos en este trabajo) como

ácido succínico, ácido decanoico y ácido octanoico. Todos estos compuestos son precursores para la síntesis de los ésteres succinato de dietilo, decanoato de etilo y octanoato de etilo (Caridi y Corte, 1997). Estos ésteres sí fueron cuantificados en estas sidras y se evidenció una mayor concentración de los mismos en las sidras fermentadas con *S. uvarum*, por lo que podría correlacionarse estos resultados con potencialmente elevadas concentraciones de los ácidos orgánicos precursores en estas sidras.

(iii) el 2-feniletanol, alcohol superior detectado en elevadas concentraciones en las sidras elaboradas con *S. uvarum*, también ha sido relacionado directamente con la inhibición de algunas BAL (Caridi y Corte, 1997).

(iv) la mayor acidez, como la observada en las sidras fermentadas con *S. uvarum* (pH de 3.5 vs 4 en las fermentadas con *S. cerevisiae*), es otro factor que se ha relacionado con la inhibición del crecimiento de algunas bacterias lácticas (Henick-Kling et al., 1986), no obstante en el caso de las sidras elaboradas en esta Tesis puede ser más una causa justamente de la inhibición de la FML que una característica propia de la sidra base.

(v) finalmente, la elevada concentración de SO₂ en el mosto o sidra base representa una de las principales causas de inhibición del desarrollo de BAL (Antonelli et al., 1999).

El SO₂ presente en el mosto o el caldo base proviene mayoritariamente, como se mencionó en la introducción general, del agregado de metabisulfito de Sodio o Potasio al mosto a fin de eliminar gran parte de los microorganismos naturalmente presentes (acción antimicrobiana) y como antioxidante. Una porción de SO₂ puede también ser producida por las mismas levaduras durante la fermentación. El SO₂ libre detectado en las sidras fermentadas con *S. uvarum* fue siempre mayor que en las sidras fermentadas con *S. cerevisiae*, lo cual podría explicar en parte el crecimiento de las BAL en estas sidras. No obstante, solamente en las fermentaciones a 20 °C estas diferencias fueron significativas. Si bien no existen reportes en *S. uvarum* que indiquen una producción superior de SO₂ en relación a *S. cerevisiae*, sí se ha observado esta característica en *S. pastorianus* y *S. bayanus* (Yoshida et al., 2008). El bajo pH puede haber potenciado la actividad antimicrobiana de este compuesto inhibiendo el desarrollo de las BAL (Divol et al., 2012); no obstante, debido a que en esta Tesis no se realizaron recuentos de BAL todos estos argumentos son solamente hipótesis que deberán ser contrastadas con futuros estudios.

Otras diferencias interesantes que se observaron en las fermentaciones a escala semipiloto estuvieron relacionadas con la composición fisicoquímica de las sidras en relación al efecto de la temperatura de fermentación. Existen múltiples reportes que sostienen que las bajas temperaturas favorecen la producción y retención de compuestos volátiles que contribuyen al *flavour* de las bebidas, principalmente en vino (Beltran et al., 2007, 2006; Torija et al., 2003) y es por ello que se consideró particularmente interesante contrastar el perfil aromático de las sidras fermentadas a las dos temperaturas. En las fermentaciones realizadas a 20°C se observaron muchos compuestos en mayor concentración (en algunos casos 100 veces más), e inclusive algunos compuestos directamente no fueron detectados a 13°C. Entre estos últimos se pueden mencionar ésteres como el acetato de bencilo, acetato de isobutilo, lactato de etilo, decanoato de etilo y la mayoría de los terpenos.

Por otro lado, en las fermentaciones realizadas a 13 °C se observó un gran aumento en la producción de 2-feniletanol (hasta 100 veces mayor que a 20°C), acetaldehído (el doble), metanol y hexanoato de etilo, siendo este último el único éster que aumentó en relación a las fermentaciones realizadas a 20°C en concordancia con lo observado en otros trabajos (Gamero et al., 2013; Torija et al., 2003).

El 2-feniletanol fue siempre mayor (5 veces más) en las fermentaciones realizadas con *S. uvarum*, independientemente de la temperatura, aunque a 13°C se observaron concentraciones 100 veces más elevadas que a 20 °C. Contrariamente, el éster derivado del 2-feniletanol, acetato de 2-feniletilo se encontró en concentraciones significativamente más elevadas a 20°C. Esta relación entre el alcohol superior y su respectivo éster en las sidras fermentadas a las dos temperaturas evidencia una mayor actividad acetil-transferasa (AAT) a temperaturas más elevadas. Un efecto similar se observó para la mayoría de los alcoholes superiores y sus esterés evaluados en las sidras realizadas en esta Tesis, independientemente de la cepa de levadura utilizada. Estos resultados concuerdan con lo observado en el trabajo de Gamero et al., (2013) en fermentaciones realizadas a 12°C y 28°C con diferentes especies de genero *Saccharomyces* (con excepción de *S. uvarum* quien mantuvo un perfil similar de ésteres a ambas temperaturas) Sin embargo se encuentran reportes donde se indica lo contrario, ósea que reportan un aumento de la concentración de la mayoría de los esterés de acetato en fermentaciones realizadas a bajas temperaturas, aunque en general estos trabajo utilizan únicamente cepas de *S. cerevisiae* (Lambrechts y Pretorius, 2000; Llauradó et al.,

2005; Novo et al., 2003; Torija et al., 2003). Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la temperatura afecta la actividad de las enzimas acetil-transferasas en particular y menos aún en condiciones de fermentación de mosto de manzana.

Al analizar los ensayos realizados con mosto estéril se profundizó sobre la elevada producción de glicerol producida por *S. uvarum*, principal causa por la que se seleccionó la cepa NPCC1314. En las fermentaciones a escala semipiloto se observó este mismo efecto en las sidras fermentadas con *S. uvarum*, con respecto a las fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae*, independientemente de la temperatura de fermentación evaluada, lo que sugiere que la mayor producción de glicerol es una característica metabólica propia de la especie de levadura. Sin embargo, el hecho de fermentar a 13°C permitió obtener concentraciones significativamente mayores de este compuesto al comparar las sidras elaboradas por la misma cepa de *S. uvarum*, evidenciándose así también el rol de este compuesto en la adaptación a las bajas temperaturas (Izawa et al., 2004). Además, el hecho de haber obtenido un porcentaje de implantación de *S. uvarum* superior a 13°C, pudo haber influido en la mayor producción de glicerol, siendo la fermentación conducida en un 100% por la cepa seleccionada por su mayor producción de glicerol.

Finalmente, el diseño de cualquier producto alimenticio es importante considerar lo que agrada, lo que desagrada y las preferencias de los grupos de consumidores a quienes se destinan. Las pruebas de preferencia o aceptación de diferentes productos alimentarios son realizadas generalmente por consumidores ya que tienden a percibir el producto de un modo más general e integrado y además, no están familiarizados con los diferentes términos utilizados durante la evaluación sensorial (Lawless y Claassen, 1993). Para realizar estudios de preferencia, Moskowitz (1994) ha recomendado equipos entre 30 y 50 consumidores para obtener resultados sólidos y de calidad. Los análisis de preferencia realizados en esta etapa de la tesis fueron de 30 comensales de diferentes edades (20 a 60 años) y de ambos sexos. Todos ellos detectaron diferencias organolépticas entre los productos analizados para las dos comparaciones realizadas a 20°C y a 13°C, evidenciando el gran impacto sensorial causado por el efecto de las levaduras involucradas en los procesos de fermentación.

En la evaluación sensorial de las sidras fermentadas a 20°C el público prefirió el producto obtenido con *S. uvarum*. El panel de expertos, por otra parte, describió a esta bebida con un alto aroma floral, frutal y mayor cuerpo en relación a la sidra fermentada con *S.*

cerevisiae. Todos estos descriptores están íntimamente relacionados a los principales compuestos evaluados en esta bebida en donde se observó mayor producción de compuestos como el 2-feniletanol (relacionado con aromas a rosa, lila, floral), acetato de 2-feniletilo (flores, rosa, frutal), alcohol isobutílico (cuerpo, en concentraciones menores a 100 mg/L) (Swiegers y Pretorius, 2005). Otra característica en la que se destacó la sidra fermentada con *S. uvarum* a 20°C fue su acidez equilibrada y levemente mayor a la detectada en las sidras fermentadas con *S. cerevisiae*. Este fenómeno podría relacionarse con la FML que se llevó a cabo de manera espontánea únicamente en las sidras fermentadas con *S. cerevisiae*. Varios trabajos han demostrado que cuando ocurre FML se reduce la acidez y astringencia (Picinelli et al., 2000), característica que es generalmente buscada en algunos vinos (Maicas et al., 2000; Martineau y Henick-Kling, 1995; Pimentel et al., 1994; Salou et al., 1994) y también en algunas sidras (Scott y O'Reilly, 1996). Sin embargo, Dueñas et al., (1994) sostienen que la disminución del ácido málico, causada por una FML, no es deseada a nivel sensorial en las sidras, debido a que el ácido málico es el principal ácido de la manzana y le aporta tipicidad al producto. En este caso, la acidez percibida por el panel de expertos en las sidras fermentadas con *S. uvarum* fue rescatada como un aporte positivo. Las sidras fermentadas con *S. cerevisiae* a 20°C, presentaron además de una mayor concentración de ácido láctico, una elevada cantidad del éster lactato de etilo. Ese compuesto, cuando se encuentra presente en bajas concentraciones en las bebidas fermentadas se asocia con aromas frutales aportando a la complejidad aromática a la bebida; sin embargo, a concentraciones elevadas aporta aromas desagradables como a leche agria (Swiegers y Pretorius, 2005). Las concentraciones observadas en esta Tesis estuvieron por debajo de este umbral (250 g/L) y el panel sensorial no percibió ningún defecto en estas sidras.

Todo lo contrario, sucedió en las fermentaciones realizadas a 13°C, si bien a nivel fisicoquímico el perfil de las sidras fermentadas con *S. uvarum* fue mucho más complejo que las fermentadas con *S. cerevisiae* a la misma temperatura, presentando valores equilibrados (dentro del rango de percepción positivo a nivel organoléptico) de la mayoría de los compuestos medidos, no fue aceptada por el público general y el panel de expertos detectó defectos a nivel gustativo y aromáticos principalmente. Estos resultados podrían deberse a varias razones: (i) las altas concentraciones de 2-feniletanol (5 veces mayor que a 20°C) evaluadas en estas sidras, si bien este compuesto incrementa la percepción de notas florales

(Styger et al., 2011) y estuvo dentro de los rangos de percepción agradables, existen otros trabajos realizados en vinos con la especie *S. eubayanus* donde se observó la mayor producción de este compuesto y las bebidas tampoco fueron elegidas por el público (Origone, 2017). (ii) Las elevadas concentraciones de acetaldehído (el doble) que si bien, en bajas concentraciones se asocia con aromas a manzana verde, pero a concentraciones elevadas produce un aroma punzante e irritante a jerez o que recuerda al pasto verde (Liu y Piline, 2000).

Los resultados obtenidos en esta etapa se evidenciaron la factibilidad del uso de las levaduras regionales criotolerantes de la especie *S. uvarum* como herramienta para la diferenciación de las sidras regionales con perfiles organolépticos interesantes. El hecho de haber mejorado la implantación al fermentar a 13°C refuerza la idea de que esta especie se encuentra mejor adaptada que *S. cerevisiae* a temperaturas bajas; no obstante, los resultados del análisis sensorial sugieren que el perfil organoléptico de la cepa seleccionada de *S. uvarum* NPCC1314, cuando se implanta completamente, no resulta del agrado del consumidor, mientras que sí resulta preferido cuando la implantación es menor. Esto plantea la idea de buscar cepas alternativas de *S. uvarum* que produzcan sidras con un perfil organoléptico mejorado a baja temperatura. En esta etapa también se evidenció la diferencia fisiológica existente entre cepas de *S. uvarum* aisladas de ambientes naturales y cepas de la misma especie aisladas de ambientes fermentativos como son las chichas de manzana, destacándose las características fermentativas de las cepas de chichas que permitieron seleccionar a la cepa NPCC1314 para la elaboración de sidras a escala semipiloto. Surge entonces también la necesidad de buscar nuevas cepas de *S. uvarum* a partir de sustratos más industrializados como son las sidras, producto importante en la región Norpatagónica. Estas nuevas cepas podrían presentar características aún mejores que las presentadas por las cepas de chichas y serán objeto de estudio de la siguiente parte de esta Capítulo.

Parte II

RESULTADOS PARTE II

1. Biodiversidad y propiedades cinéticas y fisicoquímicas en Sidras de la Patagonia

Las fermentaciones se llevaron a cabo en dos mostos de manzana no estériles variedad Granny Smith (GS) y Red Delicious (RD), ambas cosechadas en el año 2014. Los mostos presentaron propiedades físico-químicas diferenciales que se detallan en la Tabla 1.1 (Materiales). Las fermentaciones se realizaron en frascos de 1L conteniendo 800 mL de mosto a 13°C y a 25°C y por duplicado. A partir de estas fermentaciones se realizaron los siguientes análisis.

1.1. Cinética de fermentación

Los parámetros cinéticos de una fermentación son de interés enológico debido a que nos brindan información importante acerca de cómo ocurrió el proceso: la duración de la fermentación, la velocidad de la misma y si hubo o no una parada de fermentación. A su vez, la evolución de una fermentación está íntimamente relacionada con la biota de levaduras presente en el jugo de manzana y con la temperatura a la que se desarrolla el proceso. Por este motivo, se evaluó el comportamiento cinético por medición diaria de los °Brix de todas las fermentaciones realizadas. Las mismas se dieron por finalizadas cuando no se observó cambio en la concentración de azúcares residuales siendo en todos los casos menores a 1,5 g/L.

Se utilizaron dos modelos matemáticos diferentes para ajustar los datos observados durante la fermentación, el modelo de decaimiento Sigmoideo (Lambert y Pearson, 2000) y el modelo de decaimiento exponencial (Arroyo-López et al., 2009). Los datos observados en las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo mientras que los datos observados en las fermentaciones realizadas a 25°C se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial. En todos los casos el ajuste fue adecuado ya que siempre la proporción de la variancia respecto de los datos experimentales explicada por el modelo (R^2) resultó ser mayor a 0,99. Estos resultados evidencian que el modelo al cual se ajustaron los datos experimentales observados en las fermentaciones estuvo asociado a la temperatura de fermentación y no de la variedad de manzana utilizada (Tabla 1.12).

Tabla 1.12. Parámetros cinéticos en fermentaciones con mosto de manzana

Temperatura					
13°C *			25°C **		
Parámetros	Red Delicious	Granny Smith	Parámetros	Red Delicious	Granny Smith
A (°Brix)	4,95±0,48	5,12±0,32	D (°Brix)	4,51±0,68	4,69±0,94
C	8,84±2,05	8,92±1,34	S	9,54±2,12	9,34±1,23
K (°Brix.h⁻¹)	0,0112±0,0002 ^b	0,0045±0,0003 ^a	K (°Brix.h⁻¹)	0,01±0,0001 ^b	0,009±0,0001 ^a
M (h)	244,58±17,54 ^a	477,67±12,87 ^b		-	-
R2	0,995	0,998		0,987	0,994

Los superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2) evaluados por temperatura, en aquellos valores donde no se colocó superíndice indica que no hay diferencias significativas.

*Función de decaimiento sigmoideo o Gompertz modificado, usado previamente por Lambert y Pearson (2000)

** Función de decaimiento exponencial, usados previamente por Arroyo-López et al., (2009)

Las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C presentaron una cinética diferencial, llegando a sequedad a los 22 y 30 días en los mostos RD y GS respectivamente. Por otra parte, se observó que la fermentación realizada en mosto Red Delicious evidenció la mayor tasa de consumo de azúcares (parámetro K) y el menor tiempo requerido para consumir el 50% de los mismos (parámetro M) (Tabla 1.1). En contraste, las fermentaciones llevadas a cabo a 25°C presentaron una cinética muy similar independientemente del mosto, finalizando la fermentación a los 22 días en ambos casos. No obstante, se observaron diferencias significativas en la tasa de consumo de azúcares (K), siendo más elevada en las fermentaciones realizadas en Red Delicious que en el mosto Granny Smith (Tabla 1.12).

En la Figura 1.14 se representan en líneas continuas las curvas estimadas por el modelo y con puntos los datos experimentales observados, además las líneas punteadas representan el tiempo en el que se dio por finalizada la fermentación. En la misma puede observarse con claridad la diferencia en la forma de los dos tipos de curvas (sigmoidea y exponencial) y la marcada diferencia entre las cinéticas de las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C en GS y RD.

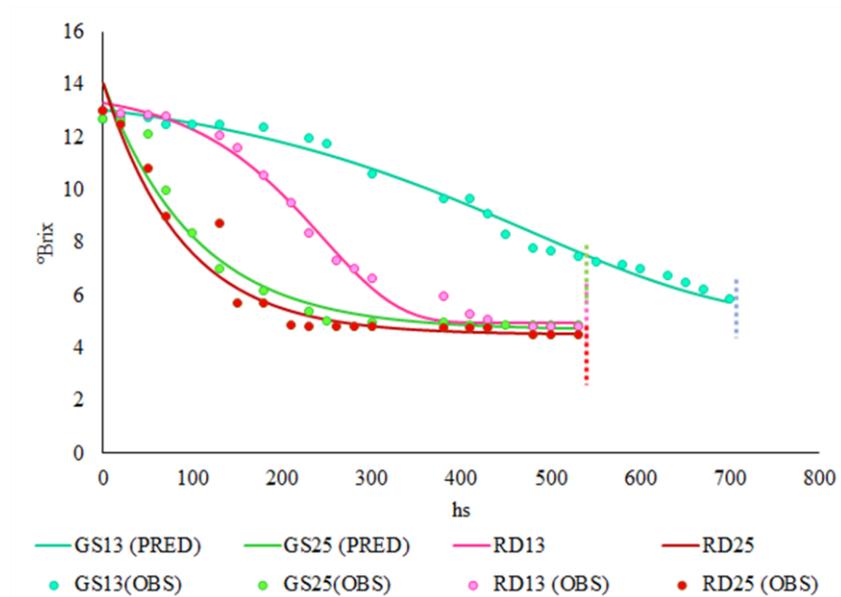


Figura 1.14. Cinética de Fermentación en mosto Red Delicious (RD) y Granny Smith (GS) a dos temperaturas de fermentación (13°C y 25°C). En líneas continuas se representan los datos predichos por el modelo (PRED) y los puntos representan las mediciones de °Brix (OBS).

1.2. Propiedades fisicoquímicas de las sidras base

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de las sidras obtenidas reveló, tal como se mencionó previamente, que todos los productos finales alcanzaron la sequedad evidenciando concentraciones de azúcares residuales (glucosa + fructosa) menores a 1,5 g/L. Además, se observó un consumo preferente de glucosa que de fructosa, observándose aproximadamente el doble de fructosa como azúcar residual en todas las sidras base (Tabla 1.13).

En cuanto a la concentración de azúcares residuales y a la de glicerol no se observaron diferencias significativas, independientemente del tipo de mosto de manzana y la temperatura de fermentación, detectándose valores medios de $0,43 \pm 0,12$ g/L, $1,06 \pm 0,29$ g/L y $3,77 \pm 0,75$ g/L de glucosa, fructosa y glicerol respectivamente (Tabla 1.13).

Respecto a las concentraciones de etanol, los mayores valores se observaron en las sidras base producidas en mosto Granny Smith a 25°C y los menores valores en el mismo tipo mosto solo que fermentado a 13°C. Este resultado evidencia la influencia de la temperatura de fermentación sobre la variedad de mosto en relación a la producción de etanol,

este efecto no fue observado en el mosto Red Delicious en el cual se las concentraciones de etanol fueron similares a 13°C como a 25°C.

Por último, e independientemente del tipo de mosto, las fermentaciones realizadas a 13°C evidenciaron los menores valores de acidez volátil, parámetro enológico que es un reflejo de la concentración de ácido acético. Los valores de pH, que están directamente relacionados a los valores de acidez volátil se condicen con los resultados descriptos previamente, siendo significativamente mayores en las fermentaciones realizadas a 25°C que a 13°C (Tabla 1.13).

Tabla 1.13. Propiedades fisicoquímicas de fermentaciones en mosto de manzana

Propiedades fisicoquímicas	Fermentaciones a 13°C		Fermentaciones a 25°C	
	Red Delicious	Granny Smith	Red Delicious	Granny Smith
Glucosa (g/L)	0,43±0,14	0,42±0,17	0,48±0,02	0,39±0,09
Fructosa (g/L)	1,09±0,09	1,24±0,27	0,91±0,26	1,02±0,37
Glicerol (g/L)	4,04±0,35	3,35±0,36	4,12±0,021	3,59±0,75
Etanol (%v/v)	6,72±0,11 ^{ab}	5,49±0,29 ^a	6,57±0,37 ^{ab}	7,41±0,38 ^c
pH	3,3±0,1 ^a	3,3±0,0 ^a	3,5±0,1 ^b	3,4±0,0 ^{ab}
Acidez Volátil (g/L)	0,19±0,01 ^a	0,21±0,04 ^a	1,1±0,29 ^c	0,41±0,02 ^b

Los superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2) evaluados por temperatura, en aquellos valores donde no se colocó superíndice indica que no hay diferencias significativas.

1.3. Aislamiento de levaduras autóctonas en Sidras

Se aislaron entre 20 y 40 colonias representativas en los tiempos iniciales, medio y finales, para las fermentaciones llevadas a cabo en mosto Granny Smith (GS) y Red Delicious (RD) a 13°C y 25°C.

1.3.1. Diversidad de especies aisladas en Sidras

Entre 20-40 colonias fueron aisladas de las sidras (en los diferentes mostos, temperaturas y estadios de fermentación) para realizar la identificación a nivel de especie por secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S, las secuencias obtenidas fueron analizadas en el *Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-BLASTn, NCBI)*. A nivel de especie se identificaron solo aquellas secuencias que presentaron un porcentaje de identidad mayor o igual al 99% con una única especie en la base de NCBI, mientras que a

nivel de género las secuencias que presentaron un porcentaje de identidad menor o igual al 98% con la cepa tipo más cercana disponible en la base de datos. No obstante, algunos aislamientos pertenecientes a la división Basidiomicetos no pudieron ser identificados a nivel de especie debido al bajo polimorfismo del dominio D1/D2- ADNr 26S, tal como se observó para *Vishniacozyma* que presentó un porcentaje de identidad del 99% con dos especies diferentes: *V. victoriae* y *V. tepherensis* (Tabla 1.14). Situación similar se observó entre las especies hermanas *S. uvarum* y *S. eubayanus*, presentaron un porcentaje de identidad del 100%. Con el objetivo de diferenciar estas dos especies criotolerantes se realizó amplificación y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP) de seis genes nucleares *BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2*.

La diversidad de especies encontradas para los estadios iniciales medios y finales de cada fermentación se detallan en la Tabla 1.14. Además, en esta se incluyó el índice de Biodiversidad H' de Shannon y Weaver, (1964), calculado para cada mosto en los diferentes estadios y temperatura de fermentación, con el objetivo de evaluar si hubo una pérdida de la biodiversidad al avanzar la fermentación y si las temperaturas de fermentación influyeron en esta. La mayor biodiversidad fue detectada en los estadios iniciales de fermentación, independientemente del mosto, siendo mayor en mosto GS que en RD (1,41 vs 1,16) (Tabla 1.14). Este estadio estuvo representado solo por especies no-sacaromicéticas, encontrándose a *Hanseniaspora guilliermondii* y *Pichia kluyveri* (78%) como especies mayoritarias en el mosto RD y a *Vishniacozyma sp.* y *Yamadazyma mexicana* (69%) en el mosto GS (Tabla 1.14). Excepto *Pichia kudriavzevii*, que fue detectada en el estadio inicial y final de las fermentaciones en mosto RD a 25°C, ninguna de las especies no-sacaromicéticas del estadio inicial fue detectada en estadios avanzados de la fermentación (Tabla 1.14).

En los estadios medios y finales la biodiversidad decreció independientemente del tipo de mosto y de la temperatura de fermentación. La mayor reducción de los índices de biodiversidad se observó en las fermentaciones llevadas a cabo a 25°C, específicamente en los estadios medios, identificándose solo dos especies a 25°C (versus seis especies diferentes en las fermentaciones a 13°C) (Tabla 1.14). Estos estadios (medios y finales) estuvieron gobernados principalmente por levaduras fermentativas del género *Saccharomyces*, en mostos GS fermentados a ambas temperaturas, así como en mostos RD fermentados a 25°C se observó predominancia de la especie *S. cerevisiae*. No obstante, en los mostos RD

fermentados a 13°C se identificó a la especie *S. uvarum* como predominante con un porcentaje de 61% de implantación (Tabla 1.14). Resulta interesante mencionar que la especie *S. cerevisiae* también fue aislada en este mosto, sin embargo, la misma se encontró en muy baja proporción.

1.3.2. Caracterización intraespecífica de *S. uvarum*

Debido a que este trabajo está focalizado en la especie *S. uvarum*, fue de nuestro interés ahondar nuestros estudios en los aislados de las fermentaciones llevadas a cabo en mosto Red Delicious a 13°C dado que fue en la única condición en la que pudimos detectar a esta especie. En primer lugar, realizamos la caracterización molecular a nivel de cepa con el objeto de caracterizar la diversidad intraespecífica. Posteriormente, y con el objetivo de interpretar la historia evolutiva y la dinámica poblacional de esta especie, realizamos estudios filogenéticos y filogeográficos comparativos entre estas cepas y otras de diferentes orígenes de la Patagonia, así como también de Europa (Capítulo II).

Los 55 aislados identificados como *S. uvarum* por análisis de secuenciación fueron subsecuentemente caracterizados a nivel de cepa por dos métodos- análisis de restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) (Querol et al. 1992) y análisis del genoma nuclear (PCR-RAPD) utilizando los cebadores *P24* y *P28*. En cuanto al análisis de ADNmt se detectaron tres diferentes perfiles de restricción mitocondriales- A, B y C. La mayoría de los aislados mostraron el perfil A (96,4%) mientras que el resto de los perfiles estuvo representado por solo un aislado (Tabla 1.15).

Respecto al análisis de PCR-RAPD para los dos cebadores se evidenciaron tres diferentes perfiles para el cebador *P24* (enumerados de 1 a 3) y solamente un perfil para el cebador *P28*, mostrando éste un bajo nivel resolutivo para este caso. Es interesante destacar que para las cepas que mostraron el mismo perfil mitocondrial A, se observaron dos diferentes perfiles para el primer *P24*. Combinado los perfiles ADNmt y los obtenidos por PCR-RAPD pudimos identificar cuatro diferentes cepas de *S. uvarum*, la cepa perteneciente al perfil A-1-1 fue la más predominante, identificándose en un 81,82% del muestreo, seguida de la cepa con el perfil A-2-1 con un 14,55% del muestreo. Ambas cepas fueron las únicas

Tabla 1.14: Especies de levaduras detectadas en fermentaciones realizadas con mosto Granny Smith y Red Delicious a 13°C y 25°C

Mosto de manzana	Especies	Estadio de fermentación y temperatura					% Identidad ^a	Cepa tipo ^b
		Inicio	13°C		25°C			
			Medio	Final	Medio	Final		
Red Delicious	<i>Candida boidinii</i>	-	1 (2,5%)	-	-	-	(100%)	<i>Candida boidinii</i> CBS2428 ^T
	<i>Candida californica</i>	-	2 (5%)	7 (17%)	-	-	(100%)	<i>Candida californica</i> CBS989 ^T
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	9 (50%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> CBS465 ^T
	<i>Pichia kluyveri</i>	5 (28%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kluyveri</i> CBS188 ^T
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	3 (17%)	-	-	-	1 (2%)	(100%)	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS5147 ^T
	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	-	-	1 (2%)	(100%)	<i>Pichia occidentalis</i> NRRL Y 552 ^T
	<i>Rhodotorula sp.</i> ^c	1 (5%)	-	-	-	-	(97%)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS316 ^T
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	2 (5%)	4 (10%)	33 (75%)	44 (96%)	(99%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS1171 ^T
	<i>Saccharomyces sp.</i> ^{d,e}	-	30 (75%)	25 (61%)	-	-	(100%)	<i>S. uvarum</i> CBS377 ^T , <i>S. eubayanus</i> CBS12357 ^T
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	4 (10%)	4 (10%)	11 (25%)	-	(99%)	<i>Torulaspora delbrueckii</i> CBS1146 ^T
	<i>Torulaspora sp.</i> ^c	-	1 (2,5%)	1 (2%)	-	-	(94%)	<i>Torulaspora delbrueckii</i> CBS1146 ^T
	Total aislados	18 (100%)	40 (100%)	41 (100%)	44 (100%)	46 (100%)		
	Índice de biodiversidad H'	1,16	0,87	1,09	0,56	0,21		
Granny Smith	<i>Filobasidium sp.</i> ^e	1 (5%)	-	-	-	-	(98%)	<i>Filobasidium magnum</i> CBS140 ^T , <i>F. floriforme</i> CBS6242 ^T , <i>F. elgans</i> CBS7640 ^T
	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	2 (9%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Hanseniaspora osmophila</i> CBS313 ^T
	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	9 (23%)	-	-	-	(99%)	<i>Papiliotrema flavescens</i> CBS942 ^T
	<i>Pichia kluyveri</i>	4 (19%)	-	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kluyveri</i> CBS188 ^T
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	1 (2,5%)	-	-	-	(100%)	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS5147 ^T
	<i>Pichia membranifaciens</i>	-	-	-	7 (16%)	18 (43%)	(99%)	<i>Pichia membranifaciens</i> CBS107 ^T
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	26 (67%)	40 (100%)	38(84%)	24 (57%)	(99%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS1171 ^T
	<i>Saccharomycodes sp.</i> ^{c,e}	-	2 (5%)	-	-	-	(97%)	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> CBS821 ^T
	<i>Vishniacozyma sp.</i> ^e	8 (38%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Vishniacozyma victoriae</i> CBS8685 ^T , <i>V. tephrensis</i> CBS8935 ^T
	<i>Yamadazyma mexicana</i>	6 (29%)	-	-	-	-	(99%)	<i>Yamadazyma mexicana</i> CBS7066 ^T
	<i>Zygorulaspora sp.</i> ^c	-	1 (2,5%)	-	-	-	(95%)	<i>Zygorulaspora Florentina</i> CBS746 ^T
	Total aislados	21 (100%)	39 (100%)	40 (100%)	46 (100%)	42 (100%)		
	Índice de biodiversidad H'	1,41	0,95	0	0,43	0,68		

a- Porcentaje de identidad obtenida entre la secuencia de nucleotídica de los aislamientos de sidras y de la cepa tipo más cercana disponible en la base de datos del NCBI

b- Especies tipo más cercanas disponibles en la base de datos del NCBI

c- Aislados que presentaron un porcentaje de identidad menor del 98% con la cepa tipo más cercana indicada en la Tabla

d- La identidad de los aislados nombrados como *Saccharomyces sp* fueron posteriormente identificados como *S. uvarum* por PCR-RFLP y secuenciación de 6 genes nucleares

e- Secuencia del dominio D1/D2 región 26S rDNA que mostraron el mismo porcentaje de identidad con más de una especie tipo disponible en la base de datos del NCBI

H': Índice de biodiversidad de Shannon y Weaver (1964)

capaces de finalizar la fermentación, pudiéndose aislar en el estadio medio y final de fermentación (Tabla 1.15). Una cepa representativa de cada perfil fue ingresada al banco genético de levaduras *North Patagonian Culture Collections* (NPCC) para posteriores estudios (Tabla 1.15).

Tabla 1.15. Caracterización a nivel de cepa de *Saccharomyces uvarum*.

Aislados de <i>S. uvarum</i>	N°	Cepa Representativa	NPCC	mtDNA- RFLP	RAPD-PCR		% del muestreo	Estadio
					P24	P28		
M1-M23, F1-F22	45	M1	1417	A	1	1	81,82	M y F
M24-M28, F23-F25	8	M25	1418	A	2	1	14,55	M y F
M29	1	M29	1419	B	1	1	1,8	M
M30	1	M30	1420	C	3	1	1,8	M
Total de aislados	55				Total de cepas 4			

M (estadio medio); F (estadio final)

Debido a que utilizando la técnica PCR-RAPD pudimos diferenciar una nueva cepa con el mismo perfil mitocondrial (*S. uvarum*: NPCC1417 y NPCC1418) decidimos aplicar la técnica a todas las cepas caracterizadas únicamente por el perfil mitocondrial utilizadas previamente en la etapa 1 de este trabajo, incluyendo en el análisis las cepas de *S. uvarum* aisladas de ambientes naturales y de Chicha. Un total de 21 aislados de ambientes naturales y 47 de Chicha de manzana fueron evaluados. Efectivamente, la combinación de los perfiles obtenidos con los cebadores *p24* y *p28* nos permitió diferenciar cepas que presentaron el mismo perfil mitocondrial como el caso de las cepas NPCC 1289, 1427 y 1428 (perfil U1, aisladas de *A. araucana*) (Rodríguez et al., 2014) que exhibieron tres perfiles de PCR-RAPD combinados diferentes (Tabla 1.16). De esta forma, se re-identificaron tres nuevas cepas que previamente habían sido consideradas como una sola. Resultados similares se obtuvieron para las cepas de los perfiles mitocondriales U4 (Rodríguez et al., 2014) y II (Rodríguez et al., 2017) (Tabla 1.16). En resumen, un total de 31 perfiles diferentes fueron finalmente detectados en los aislados de Sidra, Chicha y *A. araucana* (Tabla 1.16).

1.4. Microfermentaciones (35mL) de nuevas cepas de *S. uvarum*

Con las 12 cepas nuevas caracterizadas previamente a nivel molecular, se realizaron microfermentaciones en 35 mL de mosto Granny Smith estéril cosecha 2016 (ver propiedades en Tabla 1) a 25°C. Estas microfermentaciones se realizaron con el objetivo de

Tabla 1.16: Origen y caracterización molecular intraespecífica de diferentes aislados de *S. uvarum*, utilizando dos técnicas RFLP-ADNmt y PCR-RAPD para los cebadores *p24* y *p28*

Área de muestreo	Fuente	N°	mtDNA-RFLP	RAPD-PCR		Cepa representativa		
				<i>p24</i>	<i>p28</i>			
A.	Cipolletti, Argentina	Sidra	45	A	1	1	NPCC 1417	
				8	A	2	1	NPCC 1419
				1	B	1	1	NPCC 1418
				1	C	3	1	NPCC 1420
B.	Huechulafquen, Argentina	<i>A. araucana</i>	1	U1	3	3	NPCC 1427	
				1	U1	1	3	NPCC 1289
				1	U1	1	1	NPCC1428
				3	U2	3	2	NPCC1293
				2	U6	3	2	NPCC1414
				3	U7	3	2	NPCC1413
C.	Tromen, Argentina	<i>A. araucana</i>	3	U3	3	2	NPCC1298	
				1	U4	1	1	NPCC1416
				1	U4	1	4	NPCC1415
				2	U4	3	3	NPCC1290
				3	U5	1	2	NPCC1288
D.	Villarrica, Chile	Chicha	16	U-I	3	1	NPCC1309	
				4	U-II	3	1	NPCC1412
				1	U-II	3	3	NPCC1311
				1	U-III	3	1	NPCC1323
				2	U-IV	3	3	NPCC1324
				1	U-V	3	1	NPCC1328
				1	U-VI	3	1	NPCC1329
				1	U-VII	3	3	NPCC1330
E.	Pucón, Chile	Chicha	4	U-I	3	1	NPCC1309	
				1	U-VIII	3	1	NPCC1314
				1	U-IX	3	1	NPCC1317
F.	Tirúa, Chile	Chicha	1	U-I	3	1	NPCC1309	
				3	U-X	3	1	NPCC1315
				2	U-XI	3	3	NPCC1316
				3	U-XIII	3	1	NPCC1319
				1	U-XIV	3	3	NPCC1320
				1	U-XV	3	3	NPCC1321
3	U-XVI	3	3	NPCC1322				

Sombreado en gris se resaltaron las nuevas cepas caracterizadas con la combinación de mtDNA-RFLP y RAPD-PCR. N° número de aislados que contienen el mismo perfil.

comparar con aquellas realizadas en primera instancia con las cepas caracterizadas en el año 2012 (ver Resultados parte I punto 1). En este ensayo se incluyeron como controles de cepas dos levaduras previamente utilizadas NPCC1314 (Chicha) y NPCC1290 (*A. araucana*), las mismas se eligieron como representantes de cada uno de los grupos formados en el análisis de componentes principales realizado en el primer ensayo y además se agregó la cepa de

referencia de *S. uvarum* CBS7001 aislada de ambiente natural a modo comparativo entre nuestras poblaciones y las europeas.

Todas las cepas pudieron concluir adecuadamente la fermentación dejando valores de azúcares residuales inferiores a 2 g/L. Se evaluaron tanto las propiedades cinéticas como las fisicoquímicas de las sidras obtenidas y con todas las variables se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Tal como se observa en la Figura 1.15.A y B, las primeras dos componentes explican el 71,3% de la variabilidad total observada. Acorde a este análisis, se formaron tres grupos, el I agrupa todas las sidras fermentadas con cepas de *S. uvarum* aisladas de ambientes naturales, las cuales se caracterizaron por presentar elevadas concentraciones de ácido acético. El grupo II está formado por las sidras fermentadas con cepas aisladas de Chicha y sidra de la Patagonia (con excepción de la cepa NPCC1420) y la cepa europea CBS7001, éstas se caracterizaron por presentar alta concentraciones de alcohol, ácido málico y ácidos totales y también una mayor velocidad fermentativa. Por último, el grupo III se constituyó únicamente por la cepa aislada de sidra NPCC1420 y se distanció de grupo II por presentar un mayor pH. Por último, con el análisis de agrupamiento UPGMA se confirmaron los grupos formados en el ACP (Figura 1.15.C).

Para todas las variables analizadas, tanto fisicoquímicas como cinéticas se observaron diferencias significativas y las principales confirman lo observado y descrito en el ACP (Tabla 1.17).

1.5. Actividad enzimática y antagonista

Las 12 cepas nuevas fueron sometidas al screening enzimático y de actividad antagonista llevado a cabo en la etapa 1 de este trabajo (ver resultados etapa 1 ítem 1.2).

Respecto a las glicosidasas, todas las cepas fueron capaces de hidrolizar los sustratos sintéticos *p*-nitrofenil- β -xilosido (pNPX) y *p*NP- β -glucopiranosido (pNPG) evidenciando actividades β -xilosidasa (β Xy) y β -glucosidasa (β Gl). Sin embargo, cuando se utilizó esculina como sustrato para β Gl el resultado no fue el mismo, solo siete cepas fueron capaces de hidrolizar dicho sustrato. La actividad proteasa y pectinasa fue detectada en la mayoría de las cepas, solo una cepa de Chicha (NPCC1319) fue incapaz de hidrolizar la caseína y dos cepas aisladas de *A. araucana* (NPCC1413 y 1414) no fueron capaces de producir pectinasa (Tabla 1.18).

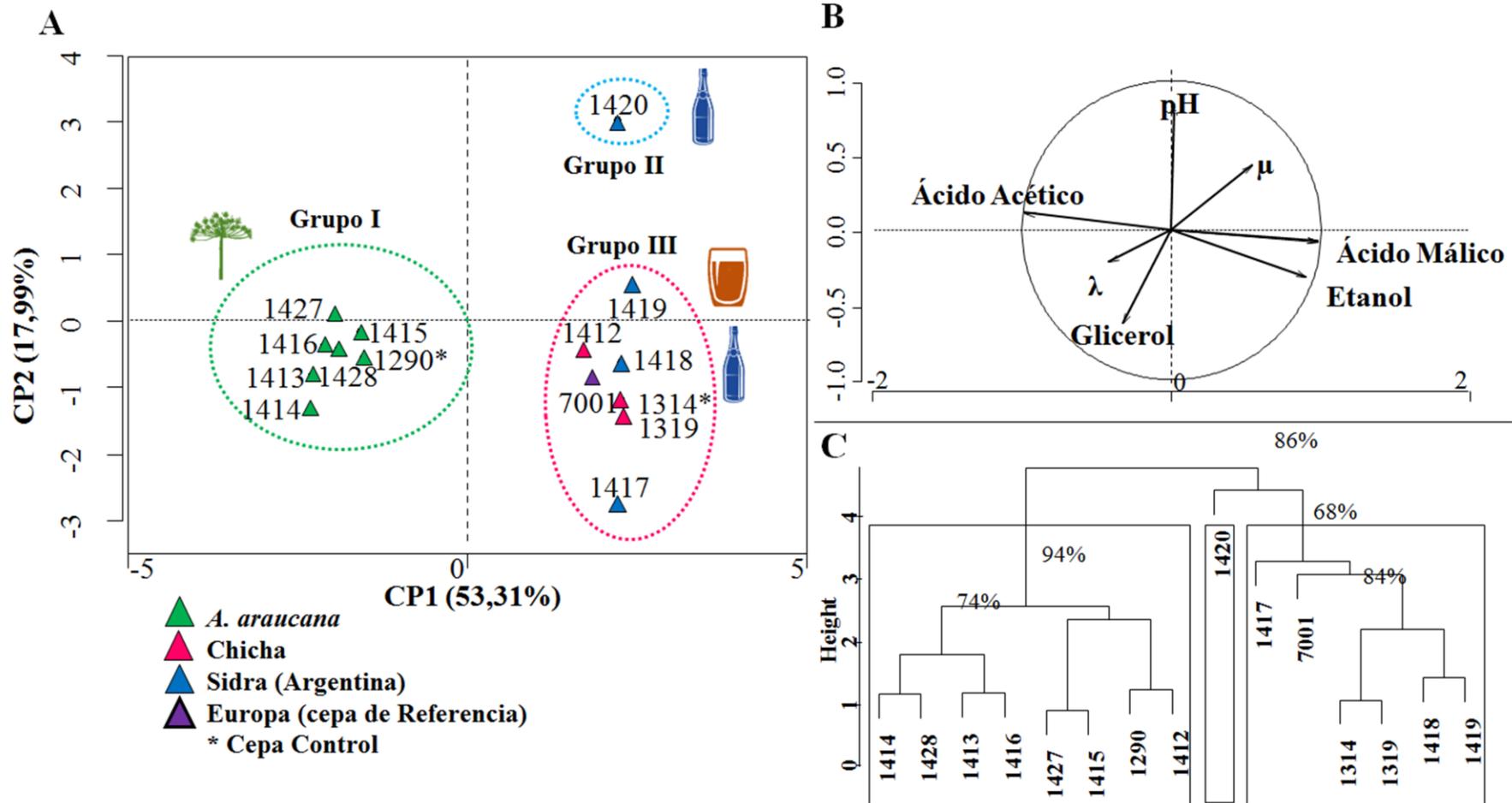


Figura 1.15. A: Análisis de componentes principales ACP y **B:** Proyección de los autovectores en el plano principal CP1 y CP2; el tamaño de cada autovector es directamente proporcional al porcentaje de la variabilidad explicada en las dos componentes. **C:** UPGMA cluster obtenido de las características fisicoquímicas y cinéticas de microfermentaciones con un corte en K=3.

Tabla 1.17: Parámetros cinéticos y fisicoquímicos obtenidos de fermentaciones en mosto de manzana Granny Smith a 25°C con diferentes cepas de *S. uvarum*

Origen	Cepa	Parámetros Fisicoquímicos					Parámetros cinéticos		
		Etanol (%v/v)	Glicerol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido Málico (g/L)	pH	μ (h ⁻¹)	λ (h)	A(g)
Insecto	CBS 7001	8,8954±0,013 ^{ef}	4,445±0,064 ^{cde}	0,0508±0,001 ^b	7,441±0,298 ^b	3,35±0,05 ^{ab}	0,0111±9,5e-5 ^a	1,185±0,049 ^a	2,441±0,401
Sidra	NPCC 1417	8,8146±0,003 ^{def}	4,425±0,001 ^{cde}	0,0421±0,001 ^a	7,525±0,024 ^b	3,23±0,05 ^a	0,0140±9,1e-5 ^{ab}	6,175±0,239 ^d	1,816±0,164
	NPCC 1418	8,7621±0,037 ^{cde}	4,364±0,044 ^{bc}	0,0440±0,004 ^{ab}	7,335±0,106 ^b	3,26±0,05 ^a	0,0168±0,001 ^b	2,193±0,261 ^a	2,069±0,685
	NPCC 1419	8,6969±0,068 ^{cd}	4,307±0,019 ^{ab}	0,0499±0,001 ^b	7,446±0,068 ^b	3,3±0,08 ^{ab}	0,0168±0,002 ^{ab}	2,407±1,115 ^{ab}	1,934±0,238
	NPCC 1420	8,6136±0,082 ^{bc}	4,247±0,041 ^a	0,0492±0,001 ^b	7,369±0,062 ^b	3,4±0,0 ^b	0,0178±0,003 ^{ab}	3,162±1,309 ^{ab}	2,034±0,148
Chicha	NPCC 1412	8,9849±0,034 ^e	4,475±0,019 ^e	0,0479±0,002 ^{ab}	7,507±0,085 ^b	3,35±0,01 ^{ab}	0,0154±0,001 ^{ab}	3,231±1,319 ^{abc}	1,789±0,058
	NPCC 1314	8,9593±0,009 ^e	4,449±0,006 ^{cde}	0,0490±0,001 ^b	7,347±0,121 ^b	3,3±0,0 ^{ab}	0,0152±0,002 ^{ab}	1,081±0,177 ^a	2,115±0,313
	NPCC 1319	8,8862±0,021 ^{ef}	4,416±0,104 ^{cde}	0,0471±0,002 ^{ab}	7,382±0,146 ^b	3,26±0,04 ^a	0,0150±0,002 ^{ab}	1,210±0,179 ^a	2,121±0,278
A. araucana	NPCC 1290	8,4849±0,024 ^{ab}	4,475±0,010 ^e	0,0766±0,001 ^c	6,807±0,082 ^a	3,3±0,0 ^{ab}	0,0155±0,002 ^{ab}	3,231±0,486 ^a	2,201±0,248
	NPCC 1413	8,4323±0,064 ^a	4,424±0,009 ^{cde}	0,0762±0,004 ^c	6,792±0,065 ^a	3,3±0,01 ^{ab}	0,0147±9,6e-5 ^{ab}	6,276±0,414 ^d	1,816±0,164
	NPCC 1414	8,4811±0,018 ^{ab}	4,374±0,048 ^{bcd}	0,0777±0,003 ^c	6,713±0,083 ^a	3,26±0,04 ^a	0,0105±0,001 ^a	5,588±0,762 ^{cd}	2,579±0,193
	NPCC 1415	8,3665±0,021 ^a	4,398±0,021 ^{bcd}	0,0759±0,001 ^c	6,862±0,103 ^a	3,3±0,0 ^{ab}	0,0118±0,001 ^a	1,171±0,238 ^a	2,046±0,435
	NPCC 1416	8,3751±0,023 ^a	4,409±0,001 ^{cde}	0,0746±0,001 ^c	6,754±0,139 ^a	3,3±0,0 ^{ab}	0,0132±0,001 ^a	4,644±1,714 ^{bc}	2,351±0,254
	NPCC 1427	8,3705±0,048 ^a	4,406±0,019 ^{bcd}	0,0778±0,001 ^c	6,707±0,014 ^a	3,3±0,0 ^{ab}	0,0131±0,001 ^a	1,110±0,131 ^a	1,938±0,237
	NPCC 1428	8,3853±0,037 ^a	4,393±0,013 ^{bcd}	0,0762±0,001 ^c	6,843±0,102 ^a	3,3±0,0 ^{ab}	0,0104±5,8e-4 ^a	6,094±0,563 ^d	2,163±0,184

Los superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2), en aquellos valores donde no se colocó superíndice indica que no hay diferencias significativas.

Por último, la actividad antagonista estuvo asociada principalmente a las cepas de sidra, todas estas fueron capaces de inhibir el crecimiento de la cepa sensible de referencia *Candida glabrata*. Además, la cepa NPCC1420 de sidra y la cepa NPCC1319 de Chicha fueron las únicas que presentaron actividad antagonista contra la cepa sensible de referencia *S. cerevisiae* (Tabla 1.18).

Table 1.18: Actividad enzimática y antagonista de cepas de *S. uvarum*

Origen	Cepas (número de NPCC) ^a	Actividad enzimática (sustrato) ^b					Actividad antagonista	
		Proteasa (LD)	Pectinasa (PC)	βGI (pNPG)	βGI (ES)	βXy (pNPX)	Cg	Sc
A. araucana	1427-1428	+	+	+	-	+	-	-
	1416-1415	+	+	+	+	+	-	-
	1414-1413	+	-	+	-	+	-	-
Chicha	1319	-	+	+	+	+	-	+
	1412	+	+	+	-	+	-	-
Sidra	1417-1418-1419	+	+	+	+	+	+	-
	1420	+	+	+	+	+	+	+

a. NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

b. βGI: β-glucosidasa, βXy: β-xilosidasa, LD: leche descremada, PC: pectina cítrica, pNPG: *p*-nitrofenil-β-glucósido, ES: esculina, pNPX: *p*-nitrofenil-β-xilósido.

Actividad enzimática o antimicrobiana positiva (+) o negativa (-).

Cepas de control sensible: *Candida glabrata* NCYC388 (Cg) y *Saccharomyces cerevisiae* P351 (Sc).

1.6. Fermentaciones a escala Semipiloto

1.6.1. Selección de cepa

Una cepa de las 12 caracterizadas molecular y fisiológicamente- *S. uvarum* NPCC1420- fue seleccionada con el objetivo de fermentar a escala semipiloto (10 L). La selección de la misma se realizó en función de las propiedades fisicoquímicas y cinéticas, esta cepa evidenció un perfil diferencial (grupo III) al resto de las cepas fermentativas (grupo II) tal como se observó en el análisis de componentes principales (Figura 1.15) y, además, mostró actividad antagonista contra las dos especies sensibles de referencia evaluadas *C. glabrata* y *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, y con fines comparativos, se incorporó en este ensayo la cepa de *S. uvarum* NPCC1314 aislada de chicha y que fue utilizada anteriormente para fermentar a una escala similar.

1.6.2. Cinética de fermentación

Las fermentaciones se realizaron en recipientes de 10 L conteniendo 8 L de mosto. En esta etapa se evaluaron tres mostos diferentes; dos mostos de manzana variedad Granny Smith (GS) y Pink Lady (PL) y un mosto de pera bivariedad (Packams y Abate Fetel). Todas las fermentaciones se realizaron a 13°C ya que a esta temperatura se logró el 100% de implantación de la cepa de *S. uvarum* NPCC1314 en la parte 1 de este trabajo (punto 1.4).

La cinética se siguió por medición diaria de °Brix y se dio por finalizada cuando las concentraciones de azúcares fueron menores a los 2 g/L o superado los 30 días de fermentación. Los datos obtenidos de todas las fermentaciones se ajustaron al modelo de decaimiento de Gompertz (Lambert y Pearson, 2000) con excepción de las conducidas por la cepa NPCC1420 en mosto Pink Lady las cuales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial propuesto por Arroyo-López et al., (2009).

En la Figura 1.16 se representan las curvas modeladas, las líneas continuas corresponden a las fermentaciones realizadas en mosto de pera y las punteadas a las realizadas en manzana. Tal como se observa en las primeras mencionadas, si bien las dos cepas lograron la sequedad del mosto a los 15 días, mostraron diferencias significativas en cuanto a las cinéticas de fermentación. La mayor concavidad de la curva corresponde a las fermentaciones conducidas con la cepa NPCC1420 evidenciando un comportamiento cinético superior a la cepa de NPCC1314. La cepa de sidra requirió un 25% menos de tiempo para consumir el 50% del sustrato (parámetro M) y, además, presentó una tasa de consumo de sustrato mayor a la cepa NPCC1314 (Tabla 1.17). Similares resultados fueron observados en las cinéticas de fermentación obtenidas en Granny Smith, aunque los tiempos de finalización fueron diferentes, 27 días en las conducidas con la cepa NPCC1420 y 31 días con la cepa NPCC1314.

Por último, las fermentaciones realizadas en mosto de manzana variedad Pink Lady mostraron cinéticas sustancialmente diferentes, las fermentaciones conducidas con la levadura NPCC1420 se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial (Arroyo-López et al., 2009) mientras que las conducidas con la cepa NPCC1314 se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo modificado por Gompertz (Lambert y Pearson, 2000), mismo modelo al cual se ajustaron todas las curvas previamente descriptas. Esto estuvo asociado a los tiempos en que cada cepa finalizó el proceso fermentativo, 23 días para la cepa NPCC1420 y 36 días para NPCC1314, esta última no concluyó definitivamente la fermentación dejando

azúcares residuales en una concentración de 8 g/L. Debido a que las dos curvas se ajustaron a modelos diferentes no se pudo realizar el análisis de la varianza (ANOVA) para comparar los parámetros cinéticos de ambas fermentaciones, no obstante en la Figura 1.16 puede observarse claramente la diferencia entre las curvas, notándose el rápido consumo de sustrato por parte de la cepa NPCC1420 en comparación con la cepa NPCC1314.

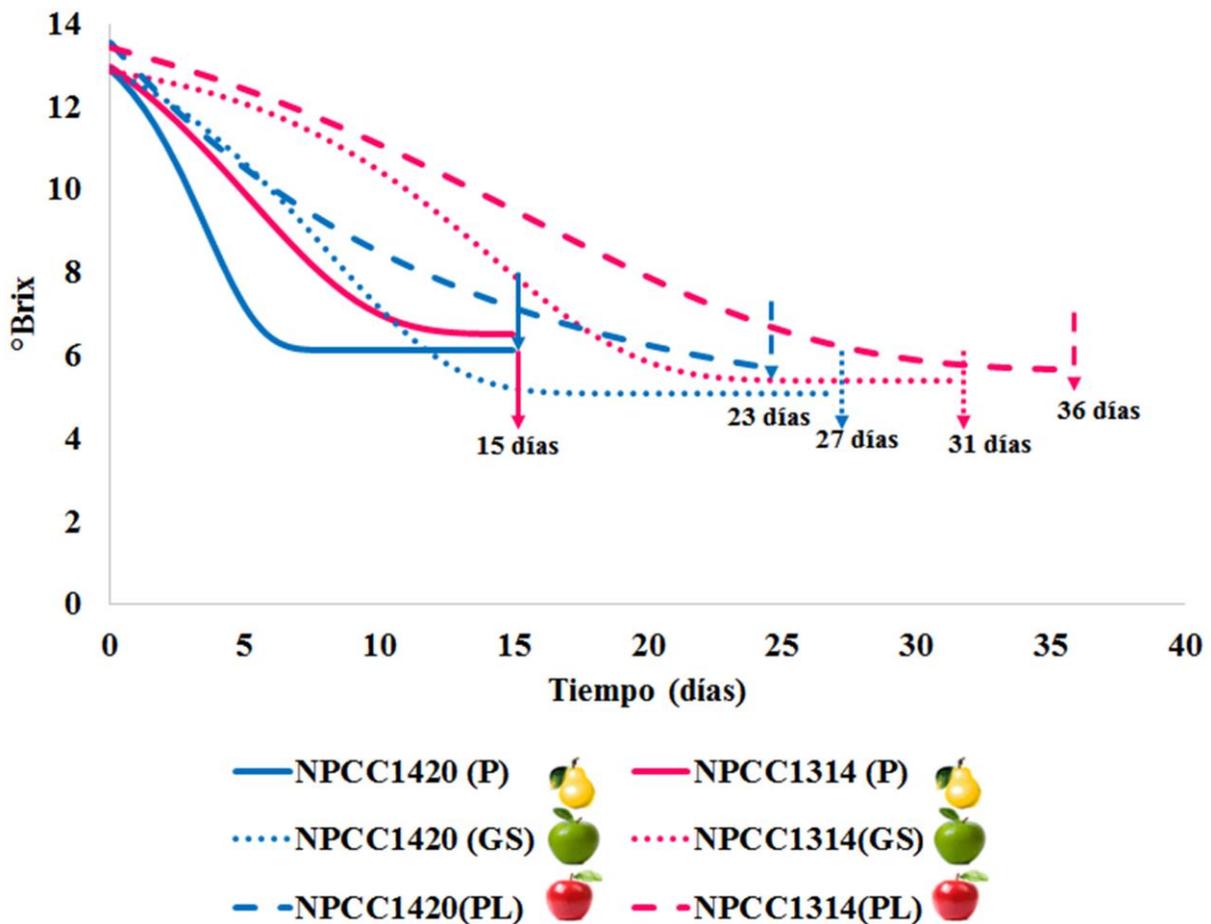


Figura 1.16: Cinética de Fermentación a escala semipiloto para dos cepas de *S. uvarum* en mosto de pera (P) y mosto de manzana variedad Granny Smith (GS) y Pink Lady (PL).

1.6.3. Implantación de las cepas en escala semipiloto

La evaluación de la implantación se realizó tomando 20 colonias del final de cada fermentación individual y se analizó el crecimiento a 37°C y el perfil de restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmit). Las colonias que desarrollaron a 37°C fueron descartadas

para el análisis molecular ya que solo era de nuestro interés evaluar el porcentaje de implantación de *S. uvarum*, levadura que no crece a alta temperatura.

Tabla 1.19. Parámetros cinéticos en fermentaciones a 13°C con mosto de pera y manzana a escala semipiloto usando dos cepas de *S. uvarum*

Parámetros	Pera		Manzana Granny Smith		Manzana Pink Lady		
	Sidra NPCC1420	Chicha NPCC1314	Sidra NPCC1420	Chicha NPCC1314	Chicha NPCC1314	Parámetros Decaimiento Exponencial **	Sidra NPCC1420
A (°Brix)	6,114±0,124	6,508±0,016	5,0875±0,0097	5,3969±0,1015	5,652±0,321	D (°Brix)	4,471±0,050
C	8,079±0,297	8,836±0,447	9,3362±0,2571 ^b	8,0214±0,0871 ^a	9,885±0,795	S	9,071±0,031
K (°Brix.h ⁻¹)	0,021±0,003	0,009± 0,001	0,0088±0,0007	0,0076± 0,0007	0,004± 0,001	K (°Brix.h ⁻¹)	0,003±4E ⁻⁴
M (h)	85,131±0,429 ^a	125,072±5,652 ^b	193,5462±0,379 ^a	341,7969±17,965 ^b	376,119±4,603		

Los superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (ANOVA y test de Tuckey n=2) por mosto, en aquellos valores donde no se colocó superíndice indica que no hay diferencias significativas.

* Función de decaimiento sigmoideo o Gompertz modificado usado previamente por Lambert ay Pearson (2000).

** Función de decaimiento exponencial Arroyo-Lopes et al. 2009.

El ajuste para todas las curvas fue 4 de R≥0.98

Con respecto a las fermentaciones llevadas a cabo en mosto de pera se observó una muy buena implantación de las dos cepas inoculadas, 100% para la cepa NPCC1314 y 95% para NPCC1420. En cuanto a las fermentaciones llevadas a cabo en mosto de manzana para las dos variedades evaluadas, la implantación nuevamente fue total en aquellas conducidas con la cepa NPCC1420 aislada de sidra, sin embargo, fue baja o nula en aquellas llevadas a cabo con la cepa NPCC1314 de chicha (20% de implantación) en mosto Granny Smith y nula en mosto Pink Lady. Es interesante mencionar que la mayoría de las colonias aisladas del estadio final en las fermentaciones en mosto de manzana, donde se inoculó la cepa NPCC1314, no crecieron a 37°C y presentaron perfiles RFLP-ADNmt diferentes al de la cepa inoculada.

En la Figura 1.17 pueden observarse los perfiles mitocondriales correspondientes a las colonias aisladas de todas las fermentaciones y el porcentaje de implantación de cada una de las cepas inoculadas. Los perfiles A1-A6 se correspondieron a cepas que no crecieron a 37°C y no presentaron el perfil mtDNA-RFLP de la cepa inoculada. Estas seis cepas (A1-A6) se identificaron a nivel molecular realizando la amplificación del gen nuclear altamente polimórfico *CAT8* y la posterior digestión con la enzima de restricción *MspI*, esta

metodología, descrita por Pérez-Través et al., (2014), permite diferenciar las especies *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* y *S. uvarum*.

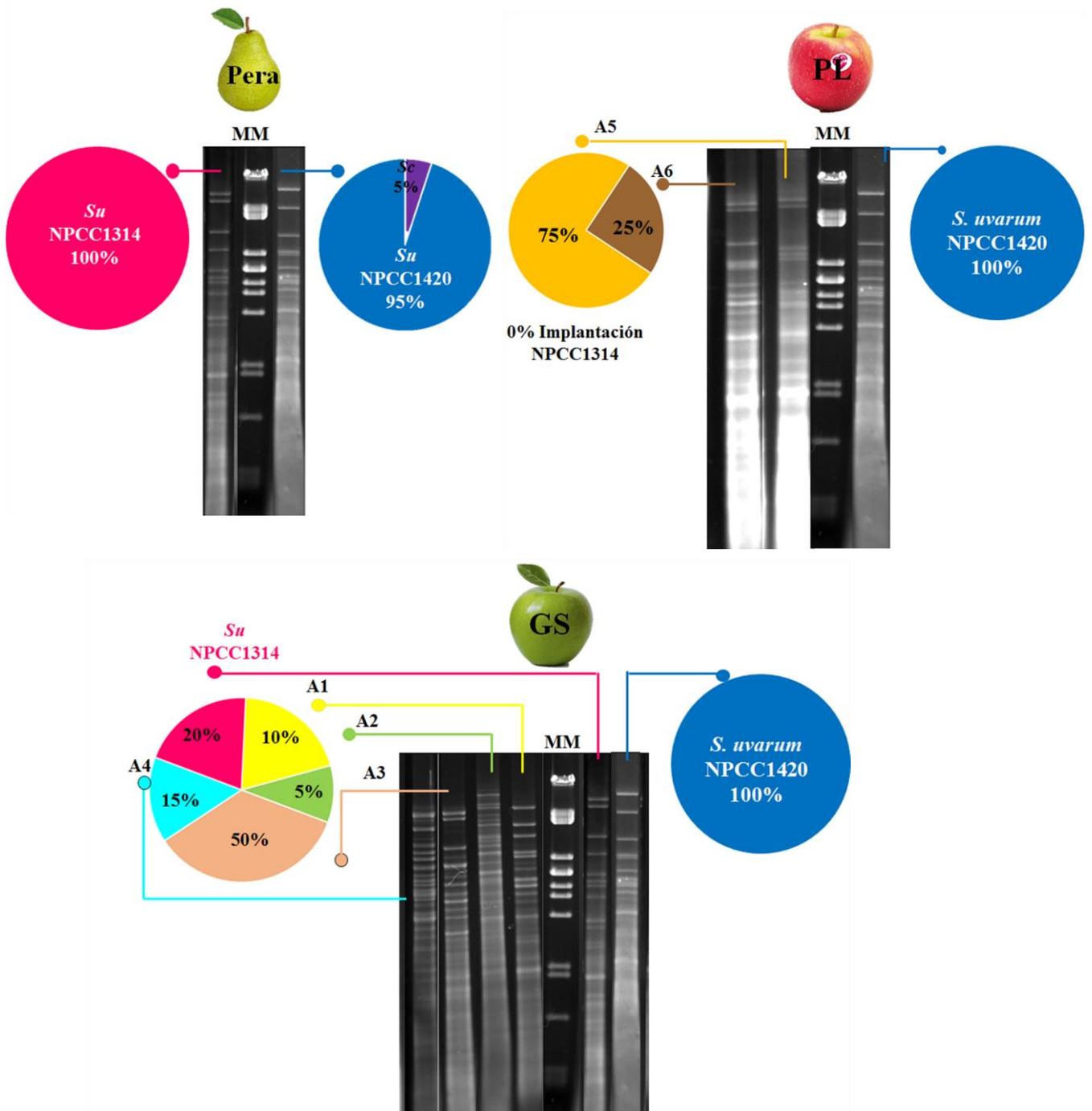


Figura 1.17: Implantación de fermentaciones a escala semipiloto conducidas con *S. uvarum* en diferentes mostos, A: en mosto de Pera (variedad Packams/D’anjou), B: en mosto de manzana Pink Lady y C: en mosto de manzana Granny Smith. A la derecha de cada gel se representa el porcentaje de implantación de la cepa NPCC1420 y a la izquierda el de la cepa NPCC1314. MM: Marcador molecular PstI. PL: Pink Lady. GS: Granny Smith. *Su*: *S. uvarum*. A1-A6 perfiles mitocondriales de colonias que no crecieron a 37°C.

El amplificado tuvo un peso molecular de 810 pb y el perfil RFLP observado correspondió al de la especie *S. uvarum* (360-250-200pb). En la Figura 1.18 se representa el gel de digestión (3% agarosa) con el perfil mencionado. Este hallazgo representó la obtención de seis nuevas cepas de esta especie involucradas en procesos de fermentaciones industriales a bajas temperaturas, nuevamente asociado a la producción de sidras.

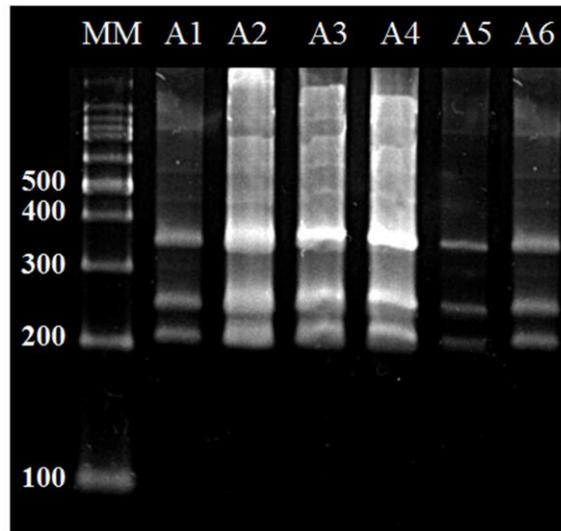


Figura 1.18. Perfil RFLP del gen nuclear *CAT8* digerido con la enzima de restricción *MspI*. MM: Marcador molecular de 1000pb. Los números a la izquierda representan pesos moleculares del marcador en pb. A1-A6: perfiles RFLP correspondientes a la especie *S. uvarum* (360+250+200).

1.4.3. Propiedades fisicoquímicas y perfil aromático de las sidras

Luego de la obtención de las sidras base se procedió a la clarificación de los mismos con bentonita, este proceso requirió el triple de tiempo para los caldos de pera que para los de manzana, 2 meses versus 20 días. La corrección de la acidez se realizó únicamente en las sidras de pera mediante adición de ácido cítrico 0,5 g/L, debido a la baja acidez de este producto y a las recomendaciones de los productores regionales a fin de obtener sidras similares a la de los mercados. También se realizó el agregado de 30 g/L de azúcar a las sidras fermentadas en los tres mostos (pera, manzana Granny Smith y Pink Lady) para obtener un producto final de clasificación *Sec* (metodología punto 1.2). Posteriormente se procedió a la toma de la espuma, en esta etapa de la tesis se realizó incorporando directamente

CO₂ al caldo base (Gasificación artificial) y se embotellaron las sidras inmediatamente (metodología punto 1.2.2). Debido a que en esta etapa no se realizó segunda fermentación en botella, las propiedades fisicoquímicas se evaluaron sobre la sidra base (previo a la corrección de la acidez y al agregado de azúcar) ya que son las únicas dos variables que cambian en el producto final que probarán los comensales. Por otra parte, se analizaron algunos compuestos generales y ácidos orgánicos en los mostos iniciales (sin fermentar) con el objetivo de constatar el posible impacto del metabolismo de las levaduras inoculadas en cada fermentación (Tabla 1.20).

Tabla 1.20. Compuestos generales evaluados en los tres mostos utilizados en las fermentaciones a escala semipiloto

Mostos	Glucosa	Fructosa	Etanol	Glicerol	Sorbitol	Ácido acético	Ácido láctico	Ácido málico
Pera Packams/D'anjou	29,52	83,39	0,180	0,141	51,92	0,043	0,211	2,967
Manzana Granny Smith	41,25	82,45	0,210	0,011	ND	0,012	0,006	7,417
Manzana Pink Lady	29,54	84,16	ND	0,016	ND	0,011	ND	6,678

Todos los compuestos están expresados en g/L excepto etanol que se expresa en % v/v.

Con respecto a las sidras de pera, se observó que las fermentadas con la cepa NPCC1420 presentaron mayor concentración de glicerol, ácido málico, ácido acético en relación a la cepa NPCC1314. Además, la concentración de estos tres compuestos fue mayor a la determinada en el mosto de pera (Tabla 1.20 y 1.21) indicando que fueron sintetizados durante la fermentación. En contraste, las sidras fermentadas con la cepa NPCC1314 evidenciaron concentraciones ínfimas de ácido málico y cantidades de ácido láctico significativamente superiores en comparación al mosto y a las sidras obtenidas con NPCC1420 (Tablas 1.20 y 1.21). En ambas fermentaciones se observó una disminución de la concentración de sorbitol de casi un 40%.

Por otro lado, las sidras de pera evidenciaron un perfil aromático opuesto en cuanto a los alcoholes superiores y ésteres. Las sidras obtenidas con NPCC1420 se caracterizaron por tener el 50% y 40% más de alcoholes superiores totales y alcoholes minoritarios (alcoholes totales- alcohol isoamílico) respectivamente y menores cantidades de ésteres que las sidras producidas por NPCC1314 (Tabla 1.21). Las concentraciones elevadas y significativas de 2-feniletanol, alcohol isoamílico e isobutílico, así como de acetato de isoamilo, acetato de 2-

feniletilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo caracterizaron el perfil aromático de las sidras de NPCC1420. Mientras que las sidras de pera fermentadas con la cepa NPCC1314 se caracterizaron por tener elevadas cantidades de lactato de etilo siendo 100 veces superior a las otras sidras. A su vez, esta levadura produjo concentraciones más altas de terpenos y fenoles totales destacándose en esos grupos el geraniol y el 4-etilfenol respectivamente. Otros parámetros que caracterizaron las sidras obtenidas con esta cepa fueron el pH y las concentraciones de fructosa y metanol observándose valores elevados y significativos en los tres casos (Tabla 1.21).

Un dato interesante de observar en las fermentaciones en mosto de pera, fue que las concentraciones de metanol y sorbitol fueron altamente superiores a las detectadas en sidras de manzana independientemente de la variedad (Tabla 1.21).

Por otro lado, las sidras inoculadas con las dos levaduras en mosto Granny Smith no evidenciaron tantas diferencias respecto a sus propiedades fisicoquímicas. Aquellas fermentadas con la cepa NPCC1420 presentaron mayor concentración de sorbitol, glicerol y ácido málico en relación a las bebidas fermentadas con la cepa NPCC1314, aunque debe considerarse que en el caso de esta última el porcentaje de implantación fue bajo, implicando que los compuestos evaluados no se deben a los metabolitos producidos por la levadura inoculada (Tabla 1.21). Por otro lado, las cantidades de ácido málico determinadas en ambas fermentaciones fueron menores a la observada en el mosto sin fermentar indicando que hubo un consumo y no una producción de este compuesto en ambas fermentaciones (Tabla 1.20 y 1.21). Si bien los dos tipos de sidras no mostraron diferencias significativas en alcoholes superiores y esteres totales, algunos compuestos se destacaron en la sidra NPCC1420 como el 2-feniletanol y dentro de los terpenos el en la sidra se alfa-terpineol (Tabla 1.21). En cuanto a las bebidas obtenidas inoculando con la cepa NPCC1314, evidenciaron mayor concentración de ácido láctico y acético y estos compuestos también fueron mayores que en el mosto inicial (Tabla 1.20 y Tabla 1.21).

Con respecto a las sidras de manzana Pink Lady es interesante resaltar dos aspectos, por un lado, se observó un mayor número de diferencias fisicoquímicas entre los dos tipos de sidras obtenidas y, por otro lado, se observó un mayor número de diferencias en comparación con las observadas en otro mosto de manzana evidenciando el diferente comportamiento de las levaduras en sustratos diferentes. Cabe reiterar que en las sidras

inoculadas con la cepa NPCC1314 no hubo implantación en este mosto con lo que los compuestos evaluados no se deben a los producidos por la levadura utilizada.

Las sidras obtenidas con la cepa NPCC1420 presentaron mayores concentraciones de glicerol y ácido málico, sin embargo, la cantidad de este último fue igual a las concentraciones del mosto inicial indicando que no hubo producción por parte de la levadura. Diferente fue lo observado en las sidras inoculadas con la cepa NPCC1314 donde se observó un consumo de ácido málico y una mayor concentración de ácido láctico que en el mosto inicial indicando que hubo producción del mismo. También, estas sidras evidenciaron las mayores concentraciones de acetaldehído, fructosa, 1-butanol, alcohol bencílico, acetato de etilo, por ende, de esterés totales (Tabla 1.21).

Además, se observaron diferencias significativas en algunos alcoholes superiores como ser el 2-feniletanol, alcohol isoamílico, lo que se tradujo en una mayor concentración de los alcoholes superiores totales. Con respecto a los esterés se observaron diferencias únicamente el succinato de dietilo y en cuanto a los terpenos en el alfa-terpineol, siendo mayores en las sidras fermentadas con la cepa NPCC1420.

A fin de poder visualizar de forma gráfica el perfil aromático de cada sidra y explicar mejor estas diferencias significativas detectadas se realizó un ACP. El plano conformado por las dos primeras componentes principales reunió 76,44% de la variabilidad total observada (Figura 1.19.A y B). En primera instancia se pudo observar que se logró una buena reproducibilidad de los datos, agrupándose los duplicados biológicos muy cercanos entre sí. Además, las sidras se reunieron en cinco grupos diferenciados, todos se asociaron en función de la levadura y el mosto en el que se evaluaron, denotando una gran importancia de ambos en el perfil fisicoquímico de las mismas, con excepción de las sidras fermentadas con la levadura NPCC1420 en ambos mostos de manzana, donde el perfil fue tan similar que se asociaron en un único grupo (Figura 1.19.A). EL grupo I se formó por las fermentaciones llevadas a cabo en mosto de pera (Packams/D'anjou) con la cepa NPCC1314 aislada de chicha, estas sidras se caracterizaron por presentar los valores más alto de pH y concentraciones altas de ácido láctico, succinato de dietilo, limoneno, geraniol y 4-etilfenol. Sin embargo, las sidras fermentadas en este mismo mosto con la levadura NPCC1420 obtuvieron un perfil fisicoquímico muy diferente (grupo II) las cuales se caracterizaron por presentar altas concentraciones de varios esterés como ser el acetato de isoamilo, acetato de

Tabla 1.21: Características fisicoquímicas de las sidras base obtenidas a partir de mostos de pera y dos variedades de manzana usando dos cepas de *S. uvarum*.

	MOSTO PERA		MOSTO GRANNY SMITH		MOSTO PINK LADY	
	<i>S. uvarum</i> NPCC 1420	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. uvarum</i> NPCC 1420	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. uvarum</i> NPCC 1420	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
Compuestos generales						
Glucosa (g/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fructosa (g/L)	0,002±0,001	0,470±0,010	1,636±0,431	1,943±0,618	1,465±0,102	7,500±1,046
Etanol (% v/v)	5,790±0,520	5,430±0,000	6,680±0,010	6,055±0,375	6,534±0,087	5,621±0,386
Glicerol (g/L)	4,220±0,320	3,540±0,090	5,733±0,093	4,087±0,973	5,728±0,280	4,441±0,175
Acetaldehído	52,160±8,030	42,380±2,190	19,115±0,725	20,310±3,420	17,620±0,430	46,025±0,035
SO ₂ libre	32,00±12,80	25,60±6,40	21,54±6,1	21,0±3,99	22,81±5,78	24,54±4,38
SO ₂ Total	57,600±19,200	50,530±5,730	48,27±7,89	54,22±4,55	42,78±8,27	58,74±7,25
Sorbitol (g/L)	31,553±0,109	31,818±0,016	5,550±0,073	3,182±0,266	4,069±0,120	4,679±0,450
pH	3,60±0,010	4,050±0,030	3,49±0,18	3,27±0,25	3,31±0,31	3,48±0,67
Metanol	64,000±3,380	76,005±5,585	36,755±2,935	22,205±1,045	26,850±1,820	26,080±0,400
Ácidos orgánicos						
Ácido acético (g/L)	0,960±0,120	0,648±0,035	0,009±0,001	0,051±0,006	0,011±0,007	0,057±0,006
Ácido láctico (g/L)	0,480±0,002	3,852±0,157	0,210±0,002	0,687±0,041	0,250±0,007	0,72±0,005
Ácido málico (g/L)	3,523±0,089	0,085±0,017	6,660±0,093	5,714±0,804	6,128±0,220	5,231±0,337
Ácidos totales (g/L)	4,963±0,211	4,585±0,209	7,079±0,096	5,833±0,851	6,389±0,234	5,366±0,348
Alcoholes superiores						
1-Butanol	ND	ND	ND	ND	1,615±1,615	2,980±0,070
1-Hexanol	0,840±0,010	1,190±0,070	2,450±0,060	1,765±0,245	2,460±0,020	2,670±0,000
1-Propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Feniletanol	73,215±7,515	26,890±2,020	63,125±1,025	34,070±16,830	65,905±2,005	37,880±5,390
Alcohol Bencílico	0,035±0,001	0,033±0,001	0,043±0,002	0,052±0,002	0,057±0,000	0,137±0,003
Alcohol Isoamílico	224,615±1,115	117,045±0,465	253,820±1,550	218,400±52,260	242,175±12,875	175,545±15,215
Alcohol Isobutílico	58,299±0,781	25,900±0,380	30,130±0,570	33,090±11,540	31,765±1,915	26,310±2,590
Total – Alcohol isoamílico	132,389±8,307	54,013±2,471	95,748±1,657	69,333±28,617	101,802±5,555	169,979±8,053
Alcoholes superiores totales	357,004±9,422	171,058±2,936	349,568±3,207	287,733±80,877	343,977±18,430	245,524±26,268

Continuación de Tabla 1.10

Esteres

Acetato de etilo	15,890±3,320	18,915±0,395	12,130±0,290	14,475±2,605	12,095±0,055	22,840±0,620
Acetato de 2-feniletilo	0,135±0,005	0,050±0,002	0,196±0,026	0,046±0,046	0,284±0,098	0,064±0,016
Acetato de bencilo	3x10 ⁻⁴ ±1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴ ±1x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁴ ±3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁵
Acetato de hexilo	0,049±2x10 ⁻²	0,003±2x10 ⁻³	0,048±0,003	0,056±0,024	0,038±0,003	0,029±0,003
Acetato de isoamilo	0,466±0,194	0,102±0,011	0,169±0,025	0,164±0,064	0,128±0,032	0,107±0,008
Acetato de isobutilo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Butirato de Etilo	0,033±0,15E ⁻²	0,038±0,150E ⁻²	0,042±0,020E ⁻²	0,041±0,007	0,032±0,026	0,055±0,003
Decanoato de Etilo	0,211±7,05E ⁻²	0,083±1,250E ⁻²	0,008±0,001 E ⁻²	0,029±0,010 E ⁻²	0,010±0,000 E ⁻²	0,018±3x10 ⁻⁵
Hexanoato de Etilo	0,316±11,45E ⁻²	0,084±1,350E ⁻²	0,094±0,004	0,168±0,039	0,114±0,007	0,087±0,006
Lactato de Etilo	0,341±0,05	99,380±23,010	ND	ND	ND	ND
Octanoato de Etilo	0,549±0,24	0,130±0,020	0,017±0,001	0,089±0,020	0,035±0,003	0,025±0,005
Succinato de Dietilo	0,024±0,013	0,001±5x10⁻⁴	0,008±0,001	0,015±0,000	0,010±1x10⁻⁴	0,007±3x10⁻⁴
Total – Acetato de etilo	1,780±0,670	109,978±23,081	0,582±0,061	0,608±0,165	0,651±0,168	0,392±0,044
Esteres totales	17,670±3,990	118,893±23,476	12,712±0,351	15,083±2,815	12,746±0,223	23,232±0,664

Terpenos

Alfa-terpineol	ND	ND	6x10⁻⁵±4x10⁻⁵	1x10⁻⁵±1x10⁻⁶	1x10⁻⁴±1x10⁻⁵	1x10⁻⁵±1x10⁻⁶
Limoneno	2x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴ ±6x10 ⁻⁵	ND	ND	ND	ND
Oxido de Cis-Linalool	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nerol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Geraniol	1x10⁻⁵±5x10⁻⁶	1,250E⁻³±0,150E⁻³	ND	ND	ND	ND
Terpenos Total	3x10⁻⁴±5x10⁻⁵	2x10⁻²±2x10⁻³	6x10⁻⁵±4x10⁻⁵	1x10⁻⁵±1x10⁻⁵	1x10⁻⁴±1x10⁻⁵	1x10⁻⁵±1x10⁻⁶

Fenoles volátiles

4- Etilfenol	0,002±8x10⁻⁴	0,027±1x10⁻³	0,004±0,003	0,084±1x10 ⁻⁵	0,002±0,093E ⁻²	9x10 ⁻⁴ ±9x10 ⁻⁵
4- Etilguaiaicol	0,002±6x10 ⁻⁴	0,006±4x10 ⁻³	0,002±0,001	0,083±2x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴ ±3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁵
Fenoles volátiles totales	0,004±1x10⁻³	0,033±4x10⁻³	0,006±0,004	0,167±3x10 ⁻⁴	0,003±1x10 ⁻³	1x10 ⁻³ ±1x10 ⁻⁴

Los valores resaltados en negrita indican diferencias significativas entre los valores obtenidos para el mismo mosto (ANOVA and Tukey test n = 2), los valores que no se encuentran resaltados no se observaron diferencias significativas. Todos los valores están expresados en mg/L con excepción de los indicados particularmente entre paréntesis.

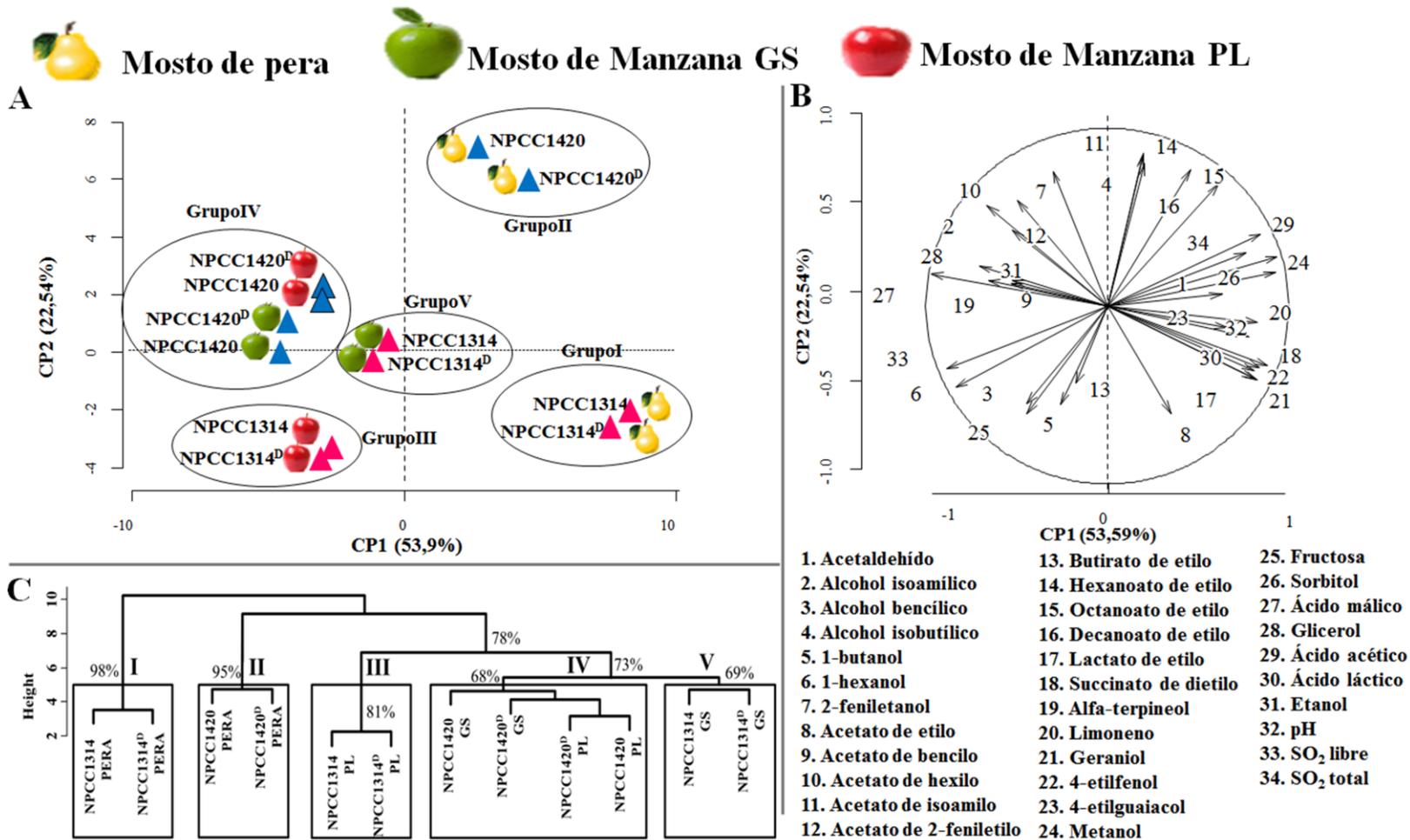


Figura 1.19: A: Análisis de Componentes Principales ACP de sidras a escala semipiloto utilizando tres mostos y dos levaduras de la especie *S. uvarum*, todas fermentadas a 13°C. B: Autoproyección de autovectores correspondiente a las 34 variables evaluadas, en el listado se detallan las variables con los respectivos números con que fueron representados. C: Análisis de agrupamiento UPGMA con un K=5. El superíndice ^D indica duplicado biológico. GS: Granny Smith. PL: Pink Lady.

2-feniletilo, hexanoato de etilo, butirato de etilo, octanoato de etilo, también presentaron altas concentraciones de 2-fenietanol y alcohol isobutílico. Lo único que presentaron en común las sidras fermentadas en mosto de pera con ambas levaduras, fueron las altas concentraciones de sorbitol, en más de 10 veces en relación a todas las sidras fermentadas con los mostos de manzana, indicando un compuesto típico del mosto de pera.

El grupo III se formó con las sidras inoculadas con la levadura NPCC1314 en mosto de manzana Pink Lady (fermentadas por un complejo de dos cepas de la especie *S. uvarum*), estas sidras se caracterizaron por presentar concentraciones altas de algunos alcoholes superiores minoritarios como ser 1-hexanol, 1-propanol y alcohol bencílico, y también altas concentraciones de butirato de etilo. El grupo IV se formó con todas las sidras fermentadas con la levadura NPCC1420 en mosto de manzana (Pink Lady y Granny Smith) indicando un perfil directamente relacionado con la levadura y no con el tipo de mosto utilizado. Estas sidras presentaron altas concentraciones de etanol, glicerol, ácido málico y alfa-terpineol. Por último, el grupo V se formó con las fermentaciones inoculadas con la cepa NPCC1314 en mosto de manzana Granny Smith (sidras fermentadas por un complejo de cinco cepas de la especie *S. uvarum* A1-A4 y la cepa inoculada), este grupo no se destacó por altas concentraciones de ningún compuesto en particular, se localizó en el centro del gráfico presentando valores intermedios de los principales alcoholes superiores y esterés, también de los compuestos generales.

Todos los grupos mencionados, asociados en el ACP, se respaldaron con el análisis de agrupamiento UPGMA que se muestra en la Figura 1.19.C.

1.4.4. Análisis sensorial de las sidras

El análisis sensorial de las sidras obtenidas se realizó nuevamente con dos tipos de público, el público general (formado por 56 comensales), que realizó únicamente el test de preferencia de producto, y el panel de expertos (formado por 8 personas) que realizó el análisis sensorial de la bebida describiendo las características visuales, gustativas y olfativas de la bebida, incluyendo defectos y observaciones de interés.

Como se muestra en la Figura 1.20, el público en general no tuvo una preferencia por una levadura específica en los tres mostos, por el contrario, escogieron a las sidras fermentadas con la cepa NPCC1314 en mosto de Pera (Figura 1.20.A) y a la fermentada con

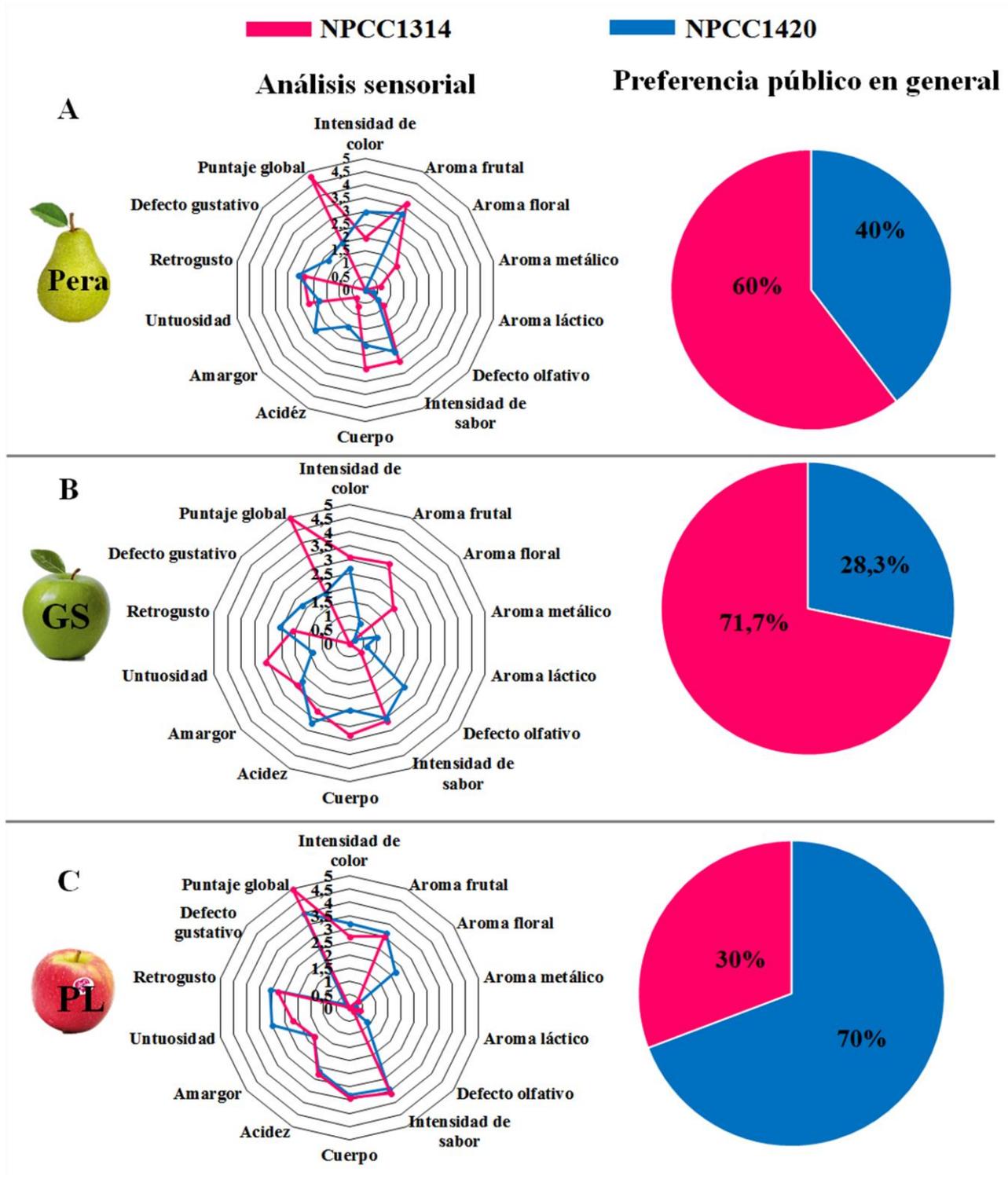


Figura 1.20: Análisis sensorial y degustación de sidras con tres diferentes mostos y dos levaduras de la especie *S. uvarum*. A la izquierda se representa el análisis sensorial realizado por el panel entrenado. A la derecha el porcentaje de preferencia de producto por el público en general. A: Sidras de pera (variedad Packams/D'anjou). B: Sidra de manzana Granny Smith. C: Sidra de manzana Pink Lady

la cepa NPCC1420 en mosto de Pink Lady (Figura 1.20.C), y en cuanto a la bebida realizada en mosto Granny Smith (Figura 1.20.B) no tuvieron una preferencia por ninguna, eligiendo a ambas bebidas en igual proporción.

En cuanto a análisis sensorial de las bebidas el panel de expertos caracterizó a las sidras utilizando una escala de 0 a 5 para propiedades visuales, olfativas y gustativas. En todas las bebidas se observaron perfiles sensoriales muy diferentes. En las sidras de pera fermentadas con la cepa NPCC1314 se observó mayor complejidad aromática con aromas frutales y florales metálicos y también características gustativas como mayor cuerpo, untuosidad e intensidad de sabor. Además, las sidras de pera fermentadas con la cepa NPCC1420 presentaron mayor acidez y amargor y un leve defecto gustativo (Figura 1.20.A).

Con respecto a las fermentaciones realizadas en mosto Granny Smith las sidras inoculadas con la cepa NPCC1314 presentaron mayores aromas frutales, florales cuerpo y untuosidad, y las fermentadas con la cepa NPCC1420 presentaron un aroma metálico y un leve defecto gustativo y olfativo. Sin embargo, la acidez y el amargor fueron iguales en ambas bebidas (Figura 1.20.B).

Las bebidas más similares fueron las fermentadas en mosto de manzana Pink Lady (Figura 1.20.C) y se diferenciaron únicamente en un mayor aroma metálico y untuosidad, presente en la bebida realizada con la cepa NPCC1420. Si bien en este análisis la bebida inoculada con la cepa NPCC1314 obtuvo un mayor puntaje global por el panel de expertos, no fue preferentemente elegida por el público en general, quienes eligieron significativamente a las sidras fermentadas con la cepa NPCC1420.

También se evaluó la intensidad de color siempre utilizando la misma escala de 0 a 5. En cuanto a las propiedades olfativas se evaluó la presencia de aromas florales, frutales, metálicos, vegetales y defectos varios. Por último, en cuanto a las propiedades gustativas se evaluó la acidez, el amargor, el cuerpo (untuosidad en boca) y los defectos gustativos.

DISCUSIÓN

La gran capacidad de competencia de *S. cerevisiae* en condiciones de fermentación, debida principalmente a su alto vigor fermentativo y a su elevada capacidad para tolerar y producir etanol (Piskur et al., 2006), ha convertido a esta especie en la dominante en la mayoría de las bebidas alcohólicas realizadas a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) o

superiores en todo mundo. Sin embargo, bajo condiciones específicas de fermentación esta especie cosmopolita comparte su nicho ecológico con otra especie del género, *S. uvarum*. Como se mencionó en la primera parte de esta Tesis, estas condiciones en las que *S. uvarum* coexiste con *S. cerevisiae* o incluso puede llegar a desplazarla, se relacionan con procesos realizados a bajas temperaturas. La levadura criotolerante *S. uvarum* ha sido aislada de procesos de vinificación (Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2000; Sipiczki et al., 2001), de producción de sidras (Coton et al., 2006; Suárez Valles et al., 2007) y de chichas de manzana (Rodríguez et al., 2017) en regiones caracterizadas por las bajas temperaturas ambientales.

Basado en estos datos, y utilizando como sustrato la corteza de diferentes árboles mayormente de Europa, Sampaio y Goncalves, (2008), lograron el aislamiento de cepas de las especies criotolerantes *S. uvarum* (sólo de árboles de Canadá) y *S. kudriavzevii* (sólo de árboles de Portugal) únicamente cuando las muestras se incubaron a bajas temperaturas, mientras que al usarse temperaturas superiores detectaron *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Este resultado evidenció la relevancia de la temperatura en la competencia entre especies de levaduras coexistiendo en un mismo sustrato. Posteriormente, Alonso-del-Real et al., (2017) analizaron específicamente la capacidad de competencia de *S. uvarum* en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* bajo diferentes condiciones pero en ambiente de fermentación, demostrando que las bajas temperaturas (13°C) mejoran la habilidad de competencia de la especie criotolerante. Esta observación resulta coherente con los resultados obtenidos en esta Tesis, respecto del aislamiento de *S. uvarum* por primera vez a partir de una bebida industrial (sidra) en Sudamérica, utilizando bajas temperaturas de fermentación. El hecho de que, a partir del mismo mosto, pero realizando la fermentación a 25°C se pudieron aislar únicamente cepas de *S. cerevisiae*, apoya la hipótesis de que las bajas temperaturas mejoran la capacidad de competencia de *S. uvarum*.

También se pudo observar que las bajas temperaturas de fermentación influyen positivamente en la biodiversidad total de especies aisladas durante todo el proceso, evidenciado en los altos índices de diversidad H' , mayores en las fermentaciones realizadas a 13°C en los dos estadios evaluados (medio y final), con excepción del estadio final de la fermentación llevada a cabo en mosto GS, donde la biodiversidad fue nula debido a que se detectó únicamente a la especie *S. cerevisiae*. De hecho, especies como *C. boidinii*, *C.*

californica, *P. flavescens*, *P. kudriavzevii*, *Saccharomyces sp.*, y *Zygorhynchus sp.*, fueron solamente aisladas en los mostos fermentados a 13°C. A pesar de que estas especies no han sido descritas como microorganismos criotolerantes, los cambios en las cinéticas de fermentación y en la dinámica microbiana asociadas con las bajas temperaturas de fermentación parecen ser la causa de la presencia de estas especies solo bajo estas condiciones. Este es el primer trabajo en donde se evalúa el efecto de la temperatura en la diversidad durante el proceso elaboración de sidra. Otros trabajos sobre diversidad de levaduras en sidras utilizaron solo bajas temperaturas de fermentación (Pando Bedriñana et al., 2010; Suárez Valles et al., 2007) o simplemente no controlan este parámetro (Morrissey et al., 2004) o no especifican las temperaturas de fermentación que usaron (Coton et al., 2006).

Es interesante notar que no solo la temperatura fue decisiva para el aislamiento de *S. uvarum* y otras especies minoritarias, sino también el sustrato. La mayoría de los estudios sobre biodiversidad se realizaron utilizando una mezcla de manzanas ácidas, amargas y dulces. En esta etapa de la Tesis se utilizaron dos variedades de manzana: Granny Smith y Red Delicious. En base a la acidez y el contenido tánico la variedad Granny Smith es clasificada como una variedad ácida, mientras que Red Delicious es considerada una variedad dulce (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). Esta diferente clasificación habla sobre una clara diferencia en el sustrato que puede haber estado relacionada con la presencia de una u otra levadura. En la región Norpatagónica, estas dos variedades son destinadas al consumo fresco, sin embargo, una gran proporción de la producción total es también destinada a la industria de jugo concentrado y a la industria sidrera. Además de las diferencias antes mencionadas entre las dos variedades de manzana, y aun cuando las concentraciones de azúcares totales fueron similares en los mostos obtenidos a partir de cada una de ellas (120 y 130 g/L en mosto GS y RD, respectivamente), se evidenció una gran diferencia en la relación glucosa/fructosa. El mosto obtenido a partir de manzanas Red Delicious presentó una proporción de 0,88 mientras que el obtenido a partir de manzanas Granny Smith mostró una relación de 1,55. Esta diferencia en su composición química también podría estar relacionada con las diferencias observadas en la diversidad de levaduras. En este trabajo, *S. uvarum* fue solamente aislada de mosto Red Delicious, en donde la proporción de fructosa fue mayor a la de glucosa (aproximadamente un 53% de fructosa y un 47% de glucosa). La capacidad

fructofílica de *S. uvarum* ha sido reportada previamente por varios autores (Gonçalves et al., 2000; Sipiczki et al., 2001; Tronchoni et al., 2009) y se discutió previamente, y podría estar relacionada con el hallazgo de *S. uvarum* únicamente en fermentaciones en mosto Red Delicious.

Las especies minoritarias de levaduras *C. boidinii*, *C. californica*, *P. occidentalis* y *Rhodotorula* sp, fueron también detectadas únicamente en mosto Red Delicious, mientras que *Filobasidium* sp., *H. osmophila*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces* sp., *Vishniacozyma* sp., *Y. mexicana*. y *Zygotorulaspora* sp., fueron únicamente detectadas en mosto Granny Smith. La mayoría de las especies identificadas en este trabajo han sido descritas anteriormente en fermentaciones de mosto de manzana en otros países incluyendo España (Pando Bedriñana et al., 2010; Suárez Valles et al., 2007), Francia (Coton et al., 2006), Irlanda (Morrissey et al., 2004) e Italia (Lorenzini et al., 2018). La mayoría de estos estudios coincide en la presencia mayoritaria de *S. cerevisiae* en fermentaciones en mostos de manzana y solo algunos de ellos reportan la presencia de otras especies del género *Saccharomyces* como *S. bayanus* (Coton et al., 2006; Morata et al., 2007; Pando Bedriñana et al., 2010). Actualmente se ha aceptado que *S. bayanus* es el nombre asignado a un grupo de cepas quiméricas compuestas por porciones de genomas pertenecientes a *S. eubayanus* y *S. uvarum* (Libkind et al., 2011). La existencia de otras cepas quiméricas en sidras fue también evidenciada después de la caracterización molecular de la levadura CID1, aislada de sidra en Francia, cuyo genoma presenta porciones de tres especies el género: *S. cerevisiae*, *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* (Groth et al., 1999).

El descubrimiento de lo que podría ser una nueva población de *S. uvarum* asociada al proceso industrial de sidra en la Norpatagonia, generó la inquietud de profundizar los estudios poblacionales de esta especie, aspecto que se desarrollaran en el siguiente capítulo de esta Tesis. Sin embargo, en esta etapa resultó de interés al menos conocer mediante el empleo de métodos de caracterización intraespecífica sencillos, la cantidad de cepas diferentes de esta especie que participaron de la fermentación, y algunas de las características fisiológicas y tecnológicas de estas que resultan de interés para la elaboración de sidras. Esta caracterización permitiría también comparar estas cepas nuevas con las ya estudiadas en la primera parte de la Tesis y que fueran obtenidas de sustratos diferentes. Si bien existen múltiples técnicas moleculares para diferenciación de levaduras a nivel intraespecífico,

varios autores coinciden en que resulta indispensable realizar una combinación de al menos dos técnicas (Baleiras Couto et al., 1996; Lopes et al., 2002). En esta Tesis se utilizó entonces un método de diferenciación a nivel del genoma mitocondrial (RFLP-ADNmt) -método que fuera ya utilizado para diferenciar las cepas en la etapa 1 de este capítulo- y un método a nivel del genoma nuclear (RAPD-PCR utilizando cebadores diferentes: *p24* y *p28*). Aun utilizando dos metodologías diferentes, la variabilidad intraespecífica detectada fue muy baja (2,24%). Además, resulta interesante destacar que el 82% de los aislados correspondieron a una misma cepa; es decir, mostraron el mismo perfil molecular con los marcadores utilizados. Esta extremadamente bajad variabilidad detectada en la sidra en relación a la observada en ambientes naturales o chichas (Rodríguez et al., 2017), puede relacionarse con varias condiciones específicas de este ambiente como la presencia de diferentes factores de estrés (etanol, SO₂), la competencia con *S. cerevisiae* que favorecen la supervivencia de pocas cepas adaptadas a estas condiciones, etc. Algunos de los mecanismos de inhibición y competencia han sido descritos previamente en la especie *S. cerevisiae* (Bauer y Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Perrone et al., 2013; Vendramini et al., 2017) y serán discutidos en más detalle en el segundo capítulo de esta Tesis.

Aplicando la misma lógica de utilización de dos métodos de caracterización intraespecífica complementarios, se detectaron seis cepas nuevas entre los aislados originales de *S. uvarum* provenientes de ambientes naturales y dos nuevas cepas a partir de los aislados de chicha en relación a las obtenidas previamente por Rodríguez et al., 2014 y 2017, respectivamente). Esto permitió además reforzar la idea de utilizar más de una técnica de caracterización molecular.

La caracterización fisiológica de las 12 nuevas cepas (incluyendo todas las de sidra y las nuevas cepas detectadas entre los aislados de chicha y ambientes naturales) en fermentación de mosto de manzana, se volvió a evidenciar una diferenciación por origen. Se agruparon por un lado todas las cepas aisladas de ambientes naturales y por otro las cepas de chicha y sidra, es decir las de ambientes fermentativos, lo cual vuelve a demostrar la relación que existe entre el origen de las cepas y sus características fisiológicas. Nuevamente, tal como se evidenció en la primera parte de este capítulo, las cepas aisladas de ambientes naturales presentaron las fases *lag* más largas, lo que pone en evidencia su necesidad de adaptación a este ambiente fermentativo. Estas mismas cepas produjeron las concentraciones más

elevadas de ácido acético, fenómeno que no se había observado anteriormente y que pudo haberse observado en este caso debido a las diferencias en el mosto utilizado respecto del empleado en la primera parte. Las cepas fermentativas (aisladas de chicha y sidra) se caracterizaron principalmente por producir las cantidades más elevadas de etanol, fenómeno relacionado seguramente con la adaptación de estas cepas a ambientes fermentativos. Se seleccionó la cepa de sidra NPCC1420, por su mayor velocidad máxima de fermentación, y por presentar además actividades enzimáticas interesantes y actividad antagonista, a fin de comparar su comportamiento en escala semipiloto con el de la cepa NPCC1314 seleccionada en la primera parte. Cabe recordar también que el objetivo principal de esta parte de la Tesis era mejorar el impacto sensorial que fue negativo en las fermentaciones llevadas a cabo a 13°C en la etapa previa, donde se había logrado un 100% de implantación de la cepa de *S. uvarum* aislada de chicha.

Basados en los resultados de la implantación de *S. uvarum* en la primera etapa, las fermentaciones se realizaron nuevamente a 13°C. En esta oportunidad se ajustaron además algunos otros detalles experimentales: i) Las fermentaciones se realizaron en tres diferentes mostos, debido al efecto marcado el sustrato observado en los ensayos previos sobre la cinética y las propiedades aromáticas y ii) Se utilizaron dosis de metabisulfito de potasio similares a las que se utilizan en las sidreras regionales (200 mg/L de $K_2O_5S_2$), a fin de poder tener una aproximación real de cuan adaptadas están estas cepas a una fermentación industrial.

En todas las fermentaciones se observó un marcado efecto de la cepa. Tanto las propiedades cinéticas como los porcentajes de implantación fueron superiores para la cepa *S. uvarum* NPCC1420 aislada de sidra que para la cepa NPCC1314 aislada de chicha, independientemente del mosto utilizado, lo cual evidencia una mejor adaptación de la cepa de sidra a este ambiente específico. En cuanto a las cinéticas, el ejemplo más extremo se observó en mosto Pink Lady, donde los datos obtenidos a 13°C con la cepa de sidra se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial (Arroyo-López et al., 2009). Este resultado llamó la atención dado que, hasta el momento, todas las cinéticas de las fermentaciones realizadas a 13°C se habían ajustado al modelo de decaimiento sigmoideo (Lambert y Pearson, 2000), independientemente de la levadura evaluada. Lo que le confiere

a esta cepa un gran potencial biotecnológico, con tiempos de fermentación similares a los industriales, pero en bajas temperaturas.

El efecto de la relación glucosa/fructosa sobre las propiedades cinéticas de las fermentaciones ha sido previamente reportado, e incluso Berthels et al., (2008) lo propusieron como un criterio de selección de cepas para procesos fermentativos. Debido a las grandes concentraciones de fructosa que contienen en general los mostos de manzana, este criterio de selección debería ser tenido en cuenta especialmente. Otra característica relevante que pudo ser observada en esta cepa fue su elevada capacidad de competencia en condiciones de fermentación en mosto no estéril, es decir su capacidad de implantación. Como se mencionó previamente la implantación de la cepa *S. uvarum* NPCC1420 fue del 100% en los tres mostos evaluados (es decir que todas las colonias de levaduras recuperadas del final de las fermentaciones correspondieron a la cepa inoculada). Esta gran capacidad de competencia respecto de la observada para la cepa de chicha NPCC1314, podría estar relacionada con una mayor tolerancia al sulfito, resistencia que se pudo haber generado como mecanismo adaptativo en respuesta a este compuesto agregado frecuentemente en las sidreras como antimicrobiano, como ya se mencionó previamente en esta Tesis. Por su parte, la cepa *S. uvarum* NPCC1314 aislada de chicha podría ser menor tolerante a este compuesto, dado que no se utiliza en la elaboración de estas bebidas tradicionales. Este fenómeno ya fue observado en cepas de la especie *S. cerevisiae*, la mayoría de las cepas aisladas de ambientes fermentativos presentan una alta resistencia al sulfito, mientras que las cepas de ambientes naturales o de laboratorio muestran una muy baja resistencia (Divol et al., 2012; Sicard y Legras, 2011; Yuasa et al., 2004). Sin embargo, no existen trabajos similares en la especie *S. uvarum*. En el siguiente capítulo de esta Tesis, y con el objetivo de responder a esta interrogante, se profundizó el estudio de tolerancia al sulfito en las levaduras estudiadas en esta Tesis.

Un hecho que vale la pena resaltar fue la excelente implantación de la cepa aislada de chicha *S. uvarum* NPCC1314 durante la fermentación del mosto de pera, que alcanzó también el 100%, mientras la misma fue muy baja o nula en los mostos de manzana Granny Smith y Pink Lady, respectivamente. Esta diferencia se dio incluso habiendo utilizado la misma concentración de metabisulfito de potasio en todas las fermentaciones. Una posible explicación podría estar relacionada con el pH del mosto de pera, que fue significativamente

superior al de los mostos de manzana (pH 4 en pera vs $3,6 \pm 0,1$ en mostos de manzana). Como se mencionó anteriormente, el pH cumple un rol fundamental en la actividad antimicrobiana del sulfito, dado que interviene en el equilibrio entre sus formas químicas en solución. A pH 4 la concentración de la forma SO_2 molecular, que es la que presenta acción antimicrobiana, es inferior (entre un 50% menos) que a pH 3,5 (Divol et al., 2012), lo que provoca una disminución del rendimiento como molécula antimicrobiana. Este efecto podría explicar por qué en el mosto de pera, la cepa de chicha NPCC1314 logró un 100% de implantación mientras que no fue capaz de dominar completamente las fermentaciones en los mostos de manzana. Por otra parte, cuando se compara la implantación de esta misma cepa aislada de chicha en los dos mostos de manzana analizados, y aun considerando que la misma fue baja en ambos casos, cabe resaltar que en mosto de manzana Granny Smith al menos la cepa fue capaz de llegar al estadio final de la fermentación, mientras que en mosto Pink Lady no fue detectada en absoluto en esta etapa de la fermentación. En este caso, y considerando que el pH y la concentración de metabisulfito de sodio fueron iguales en ambos mostos, la diferencia podría deberse a naturaleza química del mosto. Particularmente se evidenció una gran diferencia en la relación glucosa/fructosa de ambos mostos, pareciendo más favorable un mosto con una mayor relación G/F, sin embargo, en el mosto donde fue menor la relación G/L (Pink Lady) dominaron la fermentación otras cepas mejor adaptadas a las altas concentraciones de fructosa. Resulta particularmente interesante que todas las cepas recuperadas del final de las fermentaciones donde no se implantó la cepa *S. uvarum* NPCC1314 fueron también identificadas como *S. uvarum*. Más interesante aun es el hecho que las cepas de *S. uvarum* en ambos mostos no fueron las mismas, como pudo apreciarse mediante el análisis de mtDNA-RFLP, sugiriendo que pudo haber un efecto del mosto sobre la diversidad de las cepas de esta especie. Probablemente estas cepas presentarían una mayor tolerancia al SO_2 dado que corresponderían a cepas seleccionadas en este ambiente de elaboración de sidra, como sucedió con la cepa NPCC1420, y por ello hayan podido competir con la cepa de chicha NPCC1314 aun cuando ésta hubiera sido inoculada en grandes cantidades en el mosto. Adicionalmente cabe mencionar que todas las cepas de *S. uvarum* encontradas en estas fermentaciones (diferentes a las inoculadas) fueron distintas molecularmente a las aisladas de las fermentaciones espontáneas analizadas al comienzo de esta parte del capítulo.

Los datos obtenidos a nivel aromático y sensorial de los diferentes productos deben ser analizados teniendo en cuenta la implantación de la cepa inoculada. Sólo de esta manera se pueden atribuir los perfiles obtenidos en las sidras a la levadura de interés (esta situación corresponde a todas las fermentaciones realizadas en mosto de pera y a las realizadas con la cepa de sidra *S. uvarum* NPCC1420 en mostos de manzana). Interesantemente, fue en los productos obtenidos de la fermentación del mosto de pera donde se observaron mayores diferencias aromáticas entre tratamientos. En gran medida muchas de las diferencias observadas en este mosto se debieron al desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) en los mostos fermentados con la cepa de chicha NPCC1314. Estos productos presentaron concentraciones más elevadas de los compuestos relacionados directamente con la FML como ácido láctico y su éster derivado lactato de etilo (más de 100 veces más elevado que en la fermentación con *S. uvarum* NPCC1420) y como consecuencia de la FML también presentaron un pH más elevado. En este sentido, los productos fermentados a partir de mosto de pera inoculado con la cepa de sidra *S. uvarum* NPCC1420, presentaron los más altos valores de octanoato de etilo, de igual manera que se observó en las sidras elaboradas en la primera parte de esta Tesis y donde no se observó FML. Cabe recordar que este compuesto producido por la levadura se encuentra directamente relacionadas a las altas concentraciones de ácido octanoico, que como ya se mencionó inhibe la FML. Además, el pH final de estas bebidas fue significativamente inferior al observado en el mosto de peras y en los productos fermentados en los que sí se desarrolló la FML, potenciando el efecto del SO₂ como antimicrobiano sobre las BAL. Esto es consistente con lo observado en los demás mostos evaluados (Granny Smith y Pink Lady, pH 3,6±0,1), donde no se llevó a cabo FML espontánea independientemente de la levadura utilizada como cultivo iniciador.

Otra característica destacable que presentaron los productos fermentados a partir de mosto de pera con la cepa de chicha *S. uvarum* NPCC1314 fue la elevada concentración de terpenos, una propiedad que no se había observado previamente para esta cepa en otros mostos. Esto quizá esté relacionado con la mayor concentración de glicoconjugados (glicósidos) que contienen algunos mostos de pera en relación a mostos de manzana (Schieber et al., 2001), y posiblemente también con una mayor actividad glicosidasa de esta cepa en relación a la cepa aislada de sidra (cabe recordar que las dos cepas presentaron actividad β-glicosidasa en los ensayos detallados previamente en este capítulo). Como han

descrito números autores, los terpenos provienen de varios precursores glicosídicos (glicoconjugados) presentes en el mosto y se liberan como terpenos libres en el mosto debido a la actividad de las enzimas glicosidasas presentes en numerosas levaduras (Delcroix et al., 1994; Zoecklein et al., 1997). Por ello es que la actividad glicosidasa es una propiedad de las levaduras buscada a nivel industrial, ya que tiene un impacto organoléptico favorable en las bebidas permitiendo potenciar el aroma primario (Ganga et al., 1999). La combinación de todas estas características mencionadas hasta aquí tuvo un impacto sensorial positivo en la bebida, siendo preferida por el público en los ensayos de preferencia.

Por último, los productos fermentados a partir de mosto de pera con la cepa de sidra *S. uvarum* NPCC1420 presentaron diferencialmente un número de compuestos con gran impacto sensorial, como algunos esteres y alcoholes superiores. No obstante, esta bebida tuvo una menor aceptación por parte del público que puso haberse debido a su mayor acidez (más ácido málico) y un mayor contenido de ácido acético.

Otra característica interesante que se pudo evidenciar en los mostos de pera fue la elevada concentración de sorbitol. Este mosto presentó 10 veces más de este compuesto que los mostos de manzana, alcanzando valores de 50 g/L. El sorbitol es un polialcohol producido principalmente por un grupo grande de plantas pertenecientes a la familia *Rosaceae* (familia en la que se incluyen el manzano y el peral). Las concentraciones más elevadas de este compuesto, sintetizado como producto primario de la fotosíntesis, son producidas por el duraznero (*Prunus persica*), el ciruelo (*Prunus domestica*), el almendro (*Prunus dulcis*), el cerezo (*Prunus sp.*) y el peral (*Pyrus communis*) (Bielecki 1982). El sorbitol es una fuente carbonada para muchas levaduras, aunque también puede ser producido por muchas de ellas en respuesta a diferentes factores. Recientemente, se reportó que los transportadores de hexosas de las levaduras conocidos como Hxt13, Hxt15, Hxt17 y Hxt19, funcionan como transportadores de sorbitol de afinidad intermedia. Estos transportadores no son específicos para sorbitol, y se reprimen en presencia de elevadas concentraciones de glucosa en el medio. Los transportadores Hxt13 y Hxt17 se expresan también en respuesta a las altas concentraciones de fructosa (Jordan et al., 2016). El sorbitol cuando ingresa a la célula es incorporado a la vía glucolítica y puede desviarse hacia la producción de etanol o glicerol (Duvnjak et al., 1991). Hasta el momento la capacidad de consumir sorbitol ha sido descrita en la especie *S. cerevisiae*, y no en todas las cepas de esta especie sino sólo en algunas

adaptadas a consumir este metabolito (Jordan et al., 2016). Aunque no se tienen registros bibliográficos que reporten esta misma capacidad en *S. uvarum*, los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que, al menos las cepas evaluadas en mosto de pera, fueron capaces de consumir este compuesto ya que se observó una disminución del 50% del sorbitol al finalizar las fermentaciones. Las elevadas concentraciones de fructosa que presentó este mosto, favorecieron la expresión de los transportadores una vez consumida la glucosa a fin de evitar la represión por catabolito antes mencionada.

Finalmente, el último aspecto que cabe mencionar en esta parte es la elevada concentración de metanol detectada en las bebidas obtenidas a partir del mosto de pera, independientemente de la levadura inoculada. Estos valores fueron significativamente mayores que los observados en las sidras de manzana y probablemente estén relacionados con la gran cantidad de pectinas que tiene la pera (Hulme, 1958). Como se mencionó en la sección de resultados, estas pectinas dificultaron mucho el proceso de clarificación de estos productos, requiriéndose cuatro veces más de tiempo que en el caso de las sidras de manzana para lograr clarificar el producto y aun así no se obtuvo la misma transparencia. Las pectinas son heteropolisacáridos que componen la pared celular y son principalmente importantes muchas frutas, incluidas las manzanas y peras (Hulme, 1958). La adición de enzimas de tipo pectinolíticas (pectinasas) a las sidras es una práctica habitual en el proceso de elaboración de estas bebidas. Sin embargo, se ha reportado que esta actividad libera residuos metilo de las pectinas produciendo metanol, que es un compuesto tóxico cuando supera concentraciones de 200 mg/L (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). Por ello es importante controlar la adición de enzimas de este tipo en la elaboración de bebidas a base de peras e incluso evaluar qué tipo de levaduras se desea incorporar como cultivo iniciador dado que muchas levaduras (como las dos utilizadas en esta etapa de la Tesis) presentan actividad pectinasa.

En las sidras obtenidas a partir de mosto de manzana se observó una menor variabilidad a nivel aromático. Las dos sidras fermentadas con la cepa aislada de sidra *S. uvarum* NPCC1420 (Granny Smith y Pink Lady) mostraron características muy similares, hecho que está relacionado con el elevado porcentaje de implantación obtenidos en los dos casos con esta cepa. Los metabolitos típicos producidos por esta cepa fueron el glicerol y el 2-feniletanol, compuestos que se han descrito como metabolitos típicos producidos en altas

concentraciones por *S. uvarum* y que ya fueron discutidos en la primera parte de esta Tesis. Al comparar entre la dos sidras fermentadas con cepas de *S. uvarum*, se detectó que la cepa de sidra produjo concentraciones significativamente mayores de estos metabolitos que los evaluados en las sidras donde se inoculó la cepa de chicha NPCC1314, lo que sigue resultando de interés enológico que convierte a la cepa de *S. uvarum* NPCC1420 aislada de sidra, en una herramienta biotecnológica más interesante, cuando se compara a esta cepa en relación a sidras fermentadas por un complejo de cepas de *S. uvarum* (no caracterizadas). Esta diferenciación a nivel intraespecífico ya fue descrita previamente para la especie (Magyar y Tóth, 2011) y discutida anteriormente en esta Tesis. A nivel sensorial, la preferencia del público fue variable ya que eligieron la sidra fermentada por esta cepa NPCC1420 sólo cuando se compararon las obtenidas a partir de manzanas Pink Lady. Como ya se mencionó, estos resultados de preferencia deben ser considerados teniendo en cuenta que la cepa *S. uvarum* NPCC1314 de chicha no logró una buena implantación en estos mostos.

Pero al contrario en mosto Granny Smith el público prefirió la bebida fermentada con la cepa de chicha NPCC1314. Si bien en estas sidras la implantación fue baja, la misma llegó al estadio final de fermentación, indicando que probablemente algunos de los metabolitos producidos en estas sidras pueden deberse a la cepa inoculada, aunque resulta difícil de asegurar esta aseveración. Esto además podría ser la causa de que las sidras fermentadas con las dos cepas sean más diferentes a nivel aromático y sensorial. En general la mayoría de los compuestos con impacto sensorial positivo se encontraron en concentraciones más elevadas en las sidras fermentadas con la cepa de sidra NPCC1420 (glicerol, sorbitol, ácido málico, algunos alcoholes y esteres), pero esta bebida presentó un defecto a nivel aromático de acuerdo a los comentarios realizados por el panel de expertos, que hizo que el público prefiriera el producto inoculado con la cepa de chicha NPCC1314.

En conclusión, la cepa *S. uvarum* NPCC1420 aislada de sidra, posee varias características de interés enológico para la industria sidrera, mejores que la cepa aislada en chicha *S. uvarum* NPCC1314, particularmente una mayor capacidad de competencia en las condiciones similares a las comerciales. Estas características podrían deberse a mecanismos adaptativos típicos de una levadura domesticada y podrían relacionarse a una mayor resistencia al SO₂, mayor tolerancia al etanol, entre otras. Esta cepa produce también una

variedad de compuestos aromáticos de interés para la elaboración de esta bebida. De todas formas, resulta interesante resaltar que en todos los casos se advirtió (a nivel químico y sensorial) una gran diferencia entre las bebidas fermentadas, indicando un marcado efecto de las cepas en las propiedades de las sidras. De hecho, estos ensayos permitieron también evidenciar que para cada sustrato podría proponerse el uso de una cepa de levadura particular, que permita obtener un perfil aromático de mejor calidad. Por ejemplo, la cepa aislada de chicha *S. uvarum* NPCC1314 en particular también podría ser una alternativa para elaborar sidra de pera, en donde la implantación, cinética, aromas e impacto sensorial fueron mejores.

Durante el desarrollo de este capítulo han surgido varias interrogantes relacionadas sobre todo con las relaciones filogenéticas que existen entre las cepas estudiadas de *S. uvarum*, como así también sobre las posibles adaptaciones de las distintas cepas a los procesos fermentativos que podrían estar involucradas en el proceso de domesticación de esta especie, como se observó en *S. cerevisiae*. Mientras que algunas de estas respuestas exceden el alcance de esta Tesis, otras tratarán de ser dilucidadas en el siguiente capítulo.



CAPITULO II

Historia evolutiva y ecológica de *S. uvarum*: Búsqueda de eventos de domesticación a nivel genotípico y fenotípico

INTRODUCCIÓN

En la Patagonia se encuentra la mayor diversidad genética de la especie *S. uvarum*, reportándose dos subpoblaciones muy divergentes, tanto es así que se cree que el origen de esta especie probablemente sea la Patagonia (Almeida et al., 2014). Actualmente esta especie ha sido aislada en muchas partes del mundo y su distribución alcanza todos los continentes con excepción de África (Almeida et al., 2014; Rodriguez et al., 2017; Zhang et al., 2015). Sin embargo, asociada a eventos fermentativos solamente fue aislada en diferentes países de Europa (conformando una población con muy baja variabilidad) y recientemente en la Patagonia. La incorporación de cepas aisladas de sidra (caracterizadas en el capítulo I de esta tesis) permite reconstruir una línea desde el ambiente natural hasta el ambiente más industrializado en la Patagonia, lo que impulsó a llevar a cabo comparaciones a nivel mundial en esta especie, entre cepas fermentativas y de ambientes naturales con el objetivo de hacer foco en la historia evolutiva de esta especie principalmente en la Patagonia.

Este capítulo se organizó en dos partes:

Parte I: Se estudiaron eventos a nivel genómico con el objetivo de reconstruir la historia evolutiva de la especie, para ello a nivel local (con 33 cepas Patagónicas) se estudiaron procesos biogeográficos y de dinámica poblacional, y posteriormente a nivel global (incorporando al análisis local 27 cepas europeas aisladas de ambiente naturales y fermentativos y una cepa de Nueva Zelanda utilizada como grupo externo) se realizaron estudios filogenéticos, de estructura poblacional, así como de diversidad nucleotídica, a nivel del genoma nuclear y mitocondrial, a fin de poder interpretar la historia evolutiva de las poblaciones Patagónicas.

Parte II: Se estudió el comportamiento fisiológico global de la especie con todas las cepas analizadas a nivel genotípico (con excepción de las dos cepas patagónicas CRUB1556 y 1778, y la cepa australiana ZP966, debido a que no se contaba con autorización en el laboratorio para su uso en este tipo de ensayos) en respuesta a cuatro diferentes escenarios relacionados directamente con la adaptación de las levaduras a procesos fermentativos industriales, entre ellos el estatus nutricional (perfil de consumo de nitrógeno fácilmente asimilable), respuesta a la temperatura y resistencia al etanol y al Dióxido de Azufre (SO₂). Además, se realizaron competencias entre las subpoblaciones genómicas más divergentes a fin de poder interpretar la respuesta de las mismas en hipotéticos escenarios de coexistencia.

MATERIALES

1. Mosto

Mosto de manzana variedad Granny Smith, cosecha 2016. Las características del mismo se describen en la Tabla 1.1 en el apartado Materiales del Capítulo I.

2. Levaduras

En este capítulo se utilizaron un total de 61 cepas de *S. uvarum*; 31 cepas Patagónicas caracterizadas a nivel molecular y fisiológico en el capítulo 1 (Capítulo 1, etapa 2, resultados Tabla 1.5). Además, se incorporaron con fines comparativos 57 levaduras de referencias: dos cepas Patagónicas CRUB 1586 y 1778, 27 cepas europeas (21 aisladas de ambientes fermentativos y 6 aisladas de ambientes naturales) y una cepa de Australia ZP966 aislada de ambiente natural (Tabla 2.1).

3. Medios de Cultivo

3.1. Medios de cultivo generales

GPY-caldo (m/v): 0,5% extracto de levadura, 0,5% pluripectona, 2% glucosa.

GPY-agar (m/v): 0,5% extracto de levadura, 0,5% pluripectona, 2% glucosa, 2% agar.

Medio de esporulación AcK (acetato de potasio) (m/v): 1% acetato de potasio, 0,1% glucosa, 0,125% extracto de levadura, 2% agar.

3.2. Medios de cultivo para ensayos de estrés y competencias

Medio YNB-caldo (Medio base nitrogenado para levaduras) (m/v): 0,67% de YNB amortiguado a pH 4,5 y suplementado de acuerdo a la condición en estudio.

Medio YEPD-TA + Sulfito (m/v): 2% pluripectona, 1% extracto de levadura, 2% glucosa, 2% agar, ácido tartárico 75mM, pH 3,5. Se inocularon concentraciones crecientes de sulfito (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mM) de sulfito con espátula de Drigalsky y se esperó 48 h con la finalidad de que el sulfito se combine con el medio.

Mosto Sintético MS300. La composición química del mosto sintético se detalla a continuación (Tabla 2.2), este mosto contiene los compuestos básicos de un mosto de uva.

Tabla 2.1. Cepas de referencia de *S. uvarum* utilizadas con fines comparativos.

Cepa de Referencia	Origen	País	Ambiente F/N	Referencias
CRUB1778	Semilla de <i>Nothofagus pumillio</i>	Argentina	N	Almeida et al., 2014
CRUB1586	<i>Cyttaria sp.</i>	Argentina	N	
ZP966	Semilla de <i>Nothofagus solandri</i>	Nueva Zelanda	N	
CBS7001	Insecto	España	N	Pérez-Través et al., 2014
CECT1369	Ambiente natural	Hungría	N	
CETC1969	Jugo <i>Ribes nigrum</i>	Holanda	N	
CECT10618	Alpechin	España	N	
NCAIM789	Exudado <i>Carpinus betulus</i>	Hungría	N	
NCAIM868	Exudado material	Hungría	N	
CETC1884	Vino	España	F	
CBS2946	Desconocido	Desconocido	-	
CECT10174	Desconocido	España	-	
CECT1189	Cerveza ale	Inglaterra	F	
CECT12600	Mistela	España	F	
CECT12627	Vino	España	F	
CECT11036	Cerveza	Desconocido	F	
CECT12629	Mosto	España	F	
CECT12669	Uvas	España	F	
CETC12922	Vino	España	F	
CECT12930	Vino	España	F	
CBS377	Vino de pera	Alemania	F	
CBS431	Jugo de pera	Desconocido	F	
CBS2986	Vino	Suiza	F	
CBS2898	Starter vino	Suiza	F	
S10	Sidra	Irlanda	F	
S4	Sidra	Irlanda	F	
S14	Sidra	Irlanda	F	
S20	Sidra	Irlanda	F	
ZIM2112	Mosto	Eslovenia	F	
ZIM2113	Mosto	Eslovenia	F	

F: Ambiente fermentativo; N: ambiente natural.-(origen desconocido)

-Los aminoácidos utilizados para la realización del mosto sintético MS300 fueron provistos por Sigma.

-El medio de cultivo YNB fue de marca Difco™, Bectron and Dichinson Company, Sparks, MD.

-Los reactivos restantes utilizados para los medios de cultivo fueron de calidad pro-análisis.

4. Reactivos utilizados en estudios moleculares

4.1. Soluciones

Solución 1 (400 mL): 372,27 mL de sorbitol 1M y 72,72 mL de EDTA 0,5M. Autoclavar.

Tabla 2.2 Composición del Mostos Sintético MS300

Compuestos generales	g/L	Aminoácidos (en 1 L de solución tampón NaHCO₃ 2 %, 20 g/L)	g/L
Glucosa	100	L-tirosina	1,5
Fructosa	100	L-triptofano	13,4
NH ₄ Cl	0,46	L-isoleucina	2,5
Ácido málico	5	L-ácido aspártico	3,4
Ácido cítrico	0,5	L-ácido glutámico	9,2
Ácido tartárico	3	L-arginina	28,3
KH ₂ PO ₄	0,75	L-leucina	3,7
K ₂ SO ₄	0,5	L-treonina	5,8
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,25	L-lisina	1,4
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,16	L-glutamina	38,4
NaCl	0,2	L-alanina	11,2
Vitaminas (1000 X)	10	L-valina	3,4
Oligoelementos (100 X)	1	L-metionina	2,4
Aminoácidos	13,09	L-fenilalanina	2,9
Factores de anaerobiosis (1000 X)	1	L-serina	6
Oligoelementos (solución stock 1000 x)		L-histidina	2,6
MgSO ₄ . H ₂ O	4	L-lisina	1,3
ZnSO ₄	4	L-cisteína	1,5
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1	L-prolina	46,1
KI	1	Vitaminas (solución stock 100 x)	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,4	Mio-inositol	2
H ₃ BO ₃	1	Ácido nicotínico	0,2
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	1	Panteonato de calcio	0,15
Factores de anaerobiosis (solución stock 1000 X)		Tiamina HCl	0,025
Ergosterol	15	Piridoxina HCl	0,025
Ácido oleico	5	Biotina	0,0003
Se mezclan los factores de anaerobiosis en etanol puro y Tween 80 (1:1)			

Solución 2 (400 mL): 20 mL de Tris-HCl 1M, 16 mL de EDTA 0,5M y H₂O destilada c.s.p. 400 mL. Ajustar a pH 7,4 y autoclavar.

Acetato de potasio, AcK (5M/3M): a 60 mL de una solución de AcK 5M se añadió ácido acético glacial hasta pH 4,8 y se llevó a 100 mL con H₂O destilada.

Solución reguladora TBE: 45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH 8.

4.2. Enzimas y reactivos

-La Zimoliasa 20T utilizada fue provista por *US Biological*, y se utilizó resuspendida en Solución 1 (2 mg/mL).

- La *Taq* ADN polimerasa, Cl_2Mg y dNTPs fueron provistos por Inbio Highway (Argentina).
 - Los cebadores *BRE5*, *CAT8*, *MNLI*, *GAL4*, *MET6*, *CYC3*, *EGT2* y *COX2* fueron suministrados por Genbiotech (Argentina).
 - Enzimas *Hinf*I y RNAasa fueron provistas por Roche Diagnostics© (Germany).
 - Los dNTPs fueron provistos por Promega.
 - Los marcadores de peso molecular de 100-bp y 50-bp fueron provistos por Inbio Highway (Argentina).
 - La agarosa fue provista por Genbiotech.
 - El *Gel Red* fue de la marca por Biotum.
 - El Sorbitol fue provisto por Anedra.
 - El agua milliQ utilizada fue de Sintorgan®.
- Kit de purificación de ADN AccuPrep® (Cat. No. k-3034, K-3034-1) Bioneer, Inc Korea.
El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad pro-análisis.

MÉTODOS

1. Análisis Evolutivos de *S. uvarum*

1.1. Análisis Filogeográfico

Los análisis filogeográficos se realizaron con las cepas de *S. uvarum* de la Argentina, incluyendo las 31 cepas caracterizadas previamente y dos cepas de referencia CRUB1586 y CRUB1778. Se amplificaron los genes nucleares *BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2* y *MNLI* según las especificaciones descritas por Perez-Tráves et al., 2014. Los productos de PCR fueron purificados usando kit de purificación de ADN AccuPrep siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Bioneer, Inc). La secuenciación se realizó utilizando los servicios de la empresa Macrogen, Korea. Los genes secuenciados se concatenaron para obtener una matriz única de datos utilizando el programa *Sequences Matrix* (Vaidya et al., 2011) y, además, con la misma matriz se realizaron los siguientes análisis filogeográficos:

Distribución geográfica

El estudio de la dispersión geográfica se realizó ingresando a la matriz concatenada de los siete genes nucleares mencionados previamente, las georeferencias de los sitios de aislamiento de las cepas con el objetivo de localizar los haplotipos en proporción a las

ubicaciones cartográficas de donde se aislaron. La representación en el mapa de los haplotipos se realizó utilizando el software online PhyloGeoWiz (<http://phylogeoviz.org>).

Construcción de Red de Haplotipos

Se realizó en primera instancia la clasificación de los haplotipos utilizando el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) y posteriormente la construcción de la red de haplotipos con el estadístico Median Joining (MJ) utilizando el software Network 4.5 (<http://www.fluxus-engineering.com/>).

Mismatch distribution

La construcción del análisis de distribución de las frecuencias alélicas con el objetivo de evaluar los recientes cambios poblaciones se realizó utilizando el programa Arlequin v1.05, el archivo de entrada (input) utilizado fue el generado previamente en el programa DNAsp (*.arp). Los análisis se realizaron bajo un modelo poblacional constante (hipotético). Una vez obtenidas las frecuencias se realizó el gráfico de barras en Excel.

Estadísticos de Test de Neutralidad de Tajima y distancia entre poblaciones

-Proporción de sitios segregantes p_s : S/total de la secuencia, siendo S la cantidad de sitios segregantes (Tajima, 1989).

-Theta Θ (Nei y Kumar 2000): $\Theta = p_s/a_1$, donde a_1 es $=1+2^{-1}+2^{-1}+\dots+(m-1)^{-1}$, y m la tasa de mutación por sitio para el modelo.

-Distancia nucleotídica o heterocigosidad π (Nei y Li, 1979): $\pi = \sum_{ij}^q x_i x_j d_{ij}$

Donde q es el número total de alelos diferentes en la población, x_i es la frecuencia poblacional del alelo i y d_{ij} es el número de nucleótidos diferentes o sustituciones por sitio entre i y j. En una población al azar este estadístico mide la heterocigosidad esperada.

-Estadístico D de Tajima (Tajima, 1989): Se calcula obteniendo la estimación entre los parámetros Θ y π con la siguiente formula $D = \frac{d}{\sqrt{V(d)}}$ donde d indica la diferencia entre los dos parámetros y $V(d)$ la desviación estándar de d.

1.2. Análisis Filogenéticos

1.2.1. Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se realizaron con el objetivo de establecer relaciones evolutivas entre las diferentes poblaciones de *S. uvarum* a nivel global, incluyendo cepas representantes de diferentes países de Europa.

Para la construcción del Árbol de los genes nucleares se utilizaron las secuencias de los siete genes previamente utilizados para la construcción de la red de haplotipos y se agregaron en esta instancia las secuencias- obtenidas de la base de datos del GenBank- de estos siete genes de las cepas europeas, patagónicas y australiana (Almeida et al., 2014; Rodriguez et al., 2017, 2014) (Tabla 1). Un total de 61 cepas de *S. uvarum* fueron utilizadas para construir los árboles filogenéticos. La cepa australiana ZP966 fue utilizada como grupo externo (*outgroup*) para lograr el enraizado del árbol.

Los siete genes para las 61 cepas se concatenaron utilizando nuevamente *Sequences Matrix* (Vaidya et al., 2011). Con la matriz concatenada cada set de secuencias homólogas se alinearon utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). El mejor modelo evolutivo se seleccionó utilizando el programa JModelTest y el estadístico de asociación utilizado fue Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) utilizando el programa MEGA7 (Kumar et al., 2016). Para el análisis del gen mitocondrial *COX2* se utilizó el análisis Neighbor net Joining que contempla mecanismos de evolución reticulada (Huson y Bryant, 2006), con la ayuda del programa SplitsTree versión 4.14.3 de acceso libre.

1.2.2. Estructura poblacional

Los análisis de estructura poblacional se realizaron para las 61 cepas mencionadas previamente con la secuencia de los siete genes nucleares utilizando el programa GENELAND (Guillot et al., 2012) el mismo utiliza el método de agrupamiento Bayesiano individual. El número de poblaciones K se estimó con múltiples corridas con 1 millón de iteraciones y un *burning* de 100000 generaciones. Los resultados se produjeron con un K fijo inicial con un tope de 10 K. En adición, se realizaron 30 múltiples corridas independientes con 2 millones de iteraciones y un *burning* de 200000 (Coulon et al., 2006) para confirmar la primer corrida. Para el análisis se usaron los datos diploides de las secuencias y se asumió el modelo poblacional correlacionado entre poblaciones.

2. Ensayo de tolerancia a factores de estrés

De todas las cepas caracterizadas a nivel genómico también nos interesó conocer el comportamiento fisiológico para diferentes condiciones de estrés relacionadas con los procesos fermentativos.

2.1. Preparación del inóculo

Cada cepa de levadura fue inoculada en forma individual en 5 mL de caldo GPY y luego incubada a 27°C por 48 h. Luego, 1 mL de cada aislado fue centrifugado a 8000 x g durante 5 min. El precipitado de células obtenido se lavó con agua estéril, se centrifugó y se resuspendió en 0,5 mL de agua estéril para obtener una concentración de 1×10^8 células/mL.

2.2. Crecimiento en microplacas de 96 pocillos

Cada pocillo de una microplaca fue rellenado con 0,25 mL con medio YNB o mosto sintético según el ensayo e inoculado con 0,1 mL de suspensión de levadura (1×10^6 células/mL).

Para evaluar el crecimiento en diferentes temperaturas se utilizó el medio YNB suplementado con 20 g/L de glucosa como fuente de carbono y las microplacas se incubaron a 8, 13, 25, 30 y 37°C.

Para el ensayo de estrés por etanol el medio YNB también fue suplementado con 20 g/L de glucosa y se agregó etanol absoluto para obtener las siguientes concentraciones finales: 0, 2, 3, 5, 7 y 8% (v/v).

Para el ensayo de estatus nutricional se utilizó mosto sintético MS300 y se suplementó con nitrógeno fácilmente asimilable FAN (incluyendo los aminoácidos del medio y amonio) para obtener las siguientes concentraciones de nitrógeno: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 y 300 mg/L.

Todas las placas se incubaron a 25°C, con excepción de las correspondientes al ensayo de respuesta a estrés por temperatura. El crecimiento se monitoreó a través de la medición de DO_{630nm} mediante un lector de Microplacas (Rayto RT-2100 C, Nanshan, Shenzhen, China). Las mediciones fueron realizadas cada hora durante al menos tres días (dependiendo de la condición) con agitación previa de las microplacas durante 40 segundos.

2.3. Ensayo de crecimiento celular a diferentes concentraciones de SO₂ en placas

Se desarrolló un ensayo de crecimiento por goteo en placas de YEED-TA suplementada con sulfito en las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mM. Las placas fueron inoculadas con 3 μ L (cada gota) de una suspensión de levaduras con una concentración final de 1×10^6 células/mL proveniente de cada una de las cinco diluciones seriadas consecutivas realizadas. Las placas fueron incubadas a 25°C y el crecimiento fue observado diariamente durante cinco días.

2.4. Cinéticas de crecimiento

Los datos de DO obtenidos para cada cepa fueron modelados, utilizando la función de Gompertz modificada (Arroyo-López et al., 2009) y el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A diferencia de lo descrito previamente para el modelado de las microfermentaciones (Capítulo I), en el caso de la DO se utiliza el $\ln(N_t/N_0)$ como variable dependiente Y . En este caso la ecuación resultante para el modelo es la siguiente:

$$Y = A \cdot \left\{ \exp \left[- \exp \left(\left((\mu_{m\acute{a}x} \cdot 2,718282) / A \right) \cdot (\lambda - t) + 1 \right) \right] \right\}$$

Donde en la variable dependiente dada por $Y = \ln(N_t/N_0)$, N_0 es la densidad óptica inicial del cultivo y N_t es la densidad óptica medida al tiempo t . $A = \ln(N_\infty/N_0)$ es el valor máximo de población alcanzado cuando N_∞ , $\mu_{m\acute{a}x}$ es la máxima velocidad de crecimiento específica (h^{-1}) y λ es la duración de la fase *lag* o de inicio hasta alcanzar la fase de fermentación tumultuosa (h).

2.5. Análisis estadísticos de agrupamiento

2.5.1. Gráfico de calor (*Heatmaps*)

Los gráficos de calor se realizaron con los parámetros cinéticos (fase lag λ y máxima velocidad específica de crecimiento μ) estandarizados por separado. Los resultados se expresan en tonalidades de colores que van desde verde (valores negativos) hasta rojo (valores positivos) que indican que el parámetro es menor o mayor a la media (del análisis de todas las cepas en cada condición ensayada) respectivamente. Este gráfico se realizó utilizando el software MeV Multiexperimental Viewer 4.9.0. (Saeed et al., 2003).

2.5.2. UPGMA

Se utilizó como medida de asociación entre individuos la asociación por CLUSTERS-UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), método de agrupación

jerárquica. El software utilizado fue MeV Multiexperimental Viewer 4.9.0. (Saeed et al., 2003).

3. Competencias entre cepas de *Saccharomyces uvarum*

Las competencias se realizaron entre cepas que se destacaron en cada condición de estrés analizada con el objeto de evaluar las posibles ventajas de unas sobre otras.

Con respecto al estatus nutricional se realizaron competencias en las dos condiciones extremas: 40 y 300 mg/L de nitrógeno en mosto sintético MS300. Con respecto al crecimiento a diferentes temperaturas se evaluó a 13°C y 30°C en medio YNB. En cuanto a la tolerancia al etanol se evaluó a 0 y 8% v/v en medio YNB y en cuanto al estrés por SO₂ se evaluó en medio YNB con concentraciones de 60 y 100 mg/L de SO₂ libre.

Para las cuatros situaciones de estrés analizadas se utilizó una cepa representativa de cada una de las poblaciones de *S. uvarum* descritas (Holártica, Sudamérica A y Sudamérica B). Las mismas fueron CECT12600, NPCC1298 y NPCC1414.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos de 50 mL conteniendo 35 mL del correspondiente medio y se realizaron por duplicado. Las mismas se inocularon con tres cepas de *S. uvarum* de diferentes orígenes, el inóculo inicial de cada cepa fue de 1x10⁶ células/mL. El porcentaje de implantación se analizó en el estadio final de las fermentaciones, a partir de una alícuota de cada fermentador se aislaron 20 colonias al azar de cada placa para su identificación mediante análisis de RFLP-ADNmt.

4. Traslocación del Cromosoma XVI por VII

Para confirmar una traslocación recíproca entre el cromosoma XVI y el cromosoma VII para todas las cepas analizadas filogenéticamente y fisiológicamente (patagónicas y europeas) se diseñaron cuatro cebadores correspondientes a la localización de la supuesta traslocación. Estos cebadores se nombraron como XVI-F, XVI-R y VII-F, VII-R y amplifican un segmento de 600 pb en el respectivo cromosoma. Para detectar la traslocación las amplificaciones se realizaron combinando los cebadores: XVI-F/XVI-R, VII-F/VII-R, XVI-F/VI-R, VI-F/XVI-R. Aquellas cepas que amplificaron con la combinación XVI-F/XVI-R, VII-F/VII-R fueron las de tipo *wild type* y no presentaron la traslocación mientras que las que amplificaron con la combinación XVI-F/VI-R, VI-F/XVI-R si la presentaron. La PCR se realizó en un termociclador Progene (Techne,

Cambridge, UK) y los cebadores utilizados fueron: XVI-F (GCTGGCTAAACGCGTGAT); XVI-R (ACTCGTGTGACTGGGGTC); VII-F (GTGACGTAAACGACTTTTGCGC) y VII-R (GAACGTCCATTGCGTACGAG). Dos μL de ADN diluido (1/20) se resuspendieron en 18 μL de la mezcla de amplificación conteniendo 0,16 μL de cada cebador 50 μM , 1,6 μL de deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 1 mM, 0,8 μL de MgCl_2 25 mM, 4 μL de solución reguladora para *Taq* ADN polimerasa (5X), 1,2 μL de agua destilada estéril y 0,1 μL de *Taq* ADN polimerasa (1U/ μL). Los parámetros del termociclador fueron: un ciclo de desnaturalización (95°C por 5 min), luego 35 ciclos de tres pasos- desnaturalización (94°C por 1 min), hibridación (60°C por 2 min) y extensión (72°C por 2 min)- y por último un ciclo de extensión (72°C por 10 min). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1,5% m/v con solución reguladora TBE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90V). Los geles se tiñeron con Gel Red 5000X (0,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y se revelaron bajo luz ultravioleta (UV). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de ADN de 100 pb.

5. Expresión génica del gen *SSU1* por PCR-RT

Se realizó el estudio de la expresión diferencial del gen *SSU1* de cuatro cepas de *S. uvarum* seleccionadas por sus capacidades de crecimiento en placas suplementadas con SO_2 y por sus orígenes genéticos. Las cepas seleccionadas fueron la europea CECT12600 y las patagónicas NPCC1314 y NPCC1290 aisladas de chicha y *A. araucana* respectivamente. Para ello se realizó, extracción de ARNm utilizando el método de fenol:cloroformo con modificaciones menores descrito por Combina et al., (2012). El ADNc fue sintetizado a partir del ARN y la expresión del gen *SSU1* se cuantificó por PCR en tiempo real (qRT-PCR). El DNAc fue sintetizado usando 13 μl (2 μg de ARN) y el mix se constituyó con 0,8 mM de dNTPs, 80 pmol Oligo (dT). La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y en hielo durante 1 minuto. Luego, se agregaron 5 mM de ditioneitol (DTT), 50 U de inhibidores de ARNsas (Invitrogen), 1x buffer Strand (Invitrogen) y 200 U de superscript III (Invitrogen). El mix se incubó a 50°C durante 60 minutos y a 75°C durante 15 minutos. Los cebadores utilizados fueron *ssu1-F* (TGGCTACTTGAAAACGGCTCT) y *ssu1-r* (ACTGGCAGTCTTTCCGTCC) diseñados a partir de las secuencias completas. Para obtener la curva estándar se utilizaron los cebadores control *act1* y *rnd18-1* de expresión constitutiva en esta especie (Starovoytova et al., 2013).

Parte I

RESULTADOS PARTE I

1. Análisis evolutivo de *S. uvarum*

1.1. Filogeografía de cepas de *S. uvarum* patagónicas

Con el objetivo de comprender las relaciones filogenéticas y posible evidencia de flujo génico entre levaduras aisladas de los diferentes ambientes analizados, que puedan relacionarse con la distribución geográfica y la historia de las cepas de *S. uvarum* en la Norpatagonia, se procedió al análisis filogeográfico de las 31 cepas patagónicas caracterizadas en el Capítulo anterior (Tabla 1.5). En primera instancia, y tal como se muestra en la Figura 2.1, se procedió a la geolocalización de todos los aislados de *S. uvarum* patagónicos. Se utilizaron los datos obtenidos de la caracterización molecular (patrones de RAPD-PCR y mtDNA-RFLP) en el Capítulo anterior, a fin de mostrar la variabilidad intraespecífica detectada en cada sitio de muestreo y sustrato. A fin de contar con un dato que permita comparar las zonas de muestreo y sustratos, se calculó la variabilidad intraespecífica (V.I). Debido a que en las muestras de ambientes naturales y las de fermentaciones se obtienen de diferente manera, este dato es meramente descriptivo. Como se observa en la Figura 2.1, la mayor variabilidad se encontró en la zona de muestreo Huechulafquen, Argentina, sitio del cual se aislaron únicamente cepas de ambientes naturales. En contraste, la menor variabilidad fue observada en la zona de Cipolletti, Argentina para los aislados de sidra. Cabe mencionar que estos aislados de sidra provienen de un único mosto (fermentaciones en Red Delicious a 13°C), de la misma manera que las cepas de chichas aisladas de Pucón y Tirúa; sin embargo, la variabilidad intraespecífica en las chichas fue mayor.

En segunda instancia, se obtuvieron las secuencias de regiones correspondientes a siete genes nucleares (*BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GALA*, *MET6*, *EGT2* y *MNL1*) a partir de ADN proveniente de las 31 cepas de *S. uvarum* patagónicas. Se utilizaron las cepas de *S. uvarum* CRUB1778 y CRUB1586 como referencia de las poblaciones Patagónicas denominadas Sudamérica A (SA-A) y Sudamérica B (SA-B), reportadas por Almeida et al. 2014.

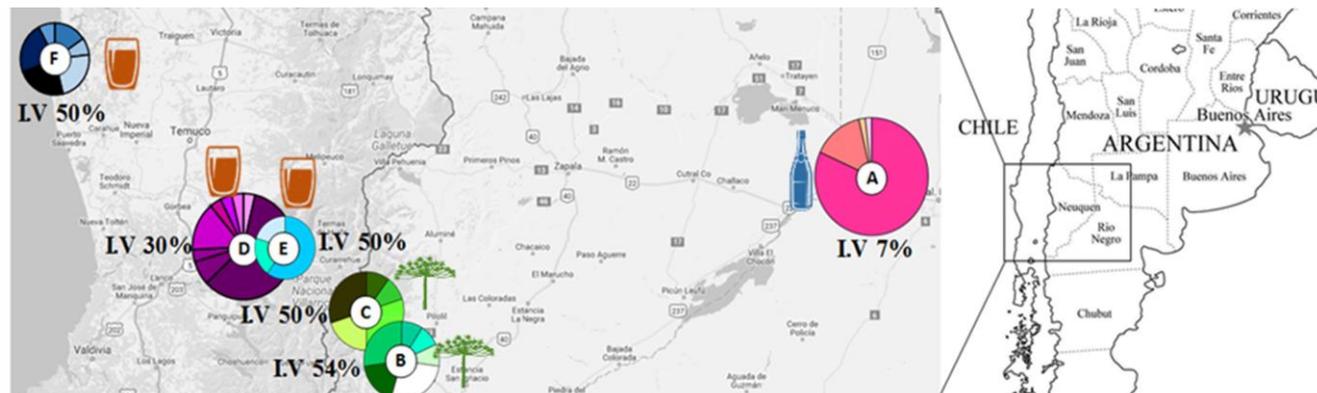


Figura 2.1. Distribución geográfica de diferentes aislados de *S. uvarum* en la Norpatagonia. A: Aislados de Sidra en Cipolletti, Argentina. B y C: Aislados de *A. araucana* de Huechulafquen y Tromen, Argentina respectivamente. D, E y F: Aislado de Chicha de Villarrica, Pucón y Tirúa, Chile, respectivamente. I.V: Variabilidad intraespecífica en cada zona de muestreo.

En la red de haplotipos se pueden distinguir tres grandes grupos de cepas, que se denominaron grupos A, B y C, con un flujo génico limitado (Figura 2.2). Particularmente se evidenció un flujo génico muy bajo o nulo entre el grupo B y los grupos A y C. El grupo C, conformado por un único haplotipo cuyo representante es la cepa NPCC1309, parece derivar de un ancestro común incluido en la población A. El haplotipo representado por la cepa *S. uvarum* NPCC1309 fue el único detectado en tres ambientes distintos: Villarrica, Pucón y Tirúa, siendo además el único haplotipo en común en todas las chichas. La principal diferencia entre el haplotipo representado por la cepa *S. uvarum* NPCC1309 (grupo C) y los haplotipos incluidos en el grupo A, fue la presencia de un alelo proveniente de *S. cerevisiae* correspondiente al gen *MNL1* en el primero. En el grupo A se observó un elevado flujo génico entre los individuos, evidenciable en el alto número de interconexiones de la red entre cepas dentro del grupo.

En este análisis además se observó una pseudo estructuración geográfica, delimitando subgrupos como Cipolletti, Tromen, Villarrica y Tirúa (Figura 2.2) en donde un único hipotético haplotipo origina al resto de los individuos en la misma zona de muestreo (forma de red estrellada). En contraste, en la zona de muestreo Huechulafquen se observó la mayor heterogeneidad poblacional, y por ende una falta de estructuración geográfica. El caso más extremo parece corresponder a la cepa *S. uvarum* NPCC1293, que no comparte flujo génico

con ninguna cepa de la misma zona de muestreo, localizándose incluso en el grupo B (Figura 2.2).

La población B se encontró representada únicamente por cepas aisladas de ambientes naturales todas de la zona de Tromen, con excepción de la cepa *S. uvarum* NPCC1293, mencionada en el párrafo anterior. Las cepas utilizadas con fines comparativos CRUB1586 y CRUB1778 se ubicaron asociadas a la población A y B, respectivamente.

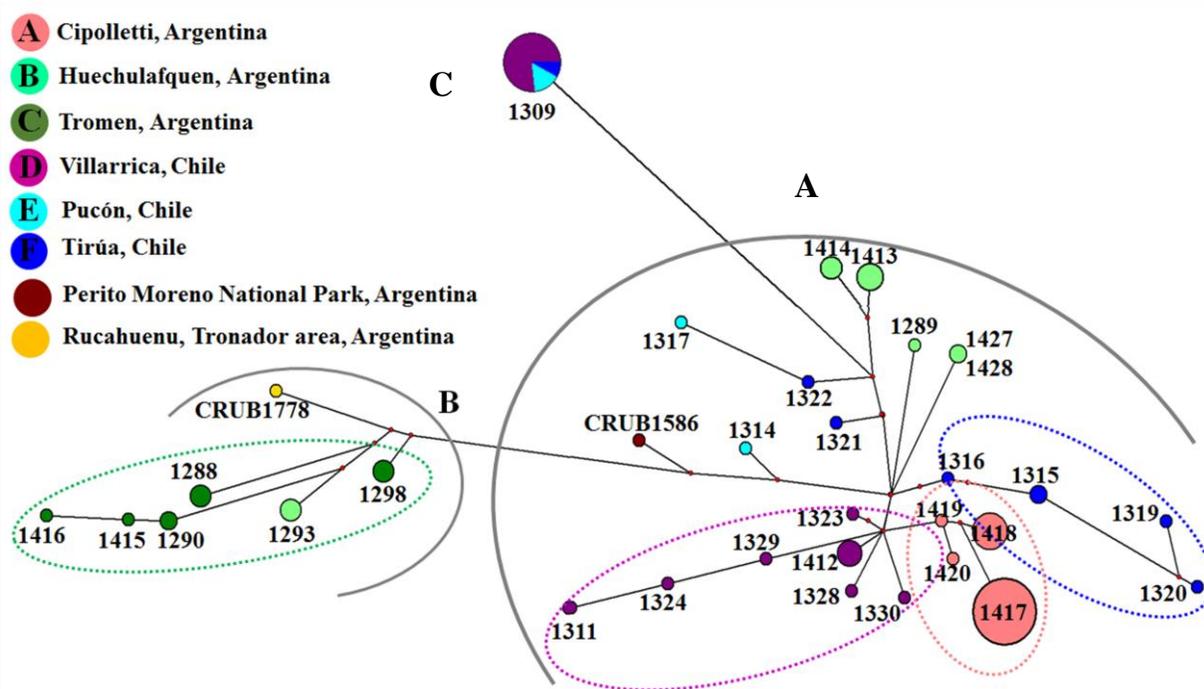


Figura 2.2. Red de haplotipos de diferentes cepas de *S. uvarum* de la Norpatagonia.

un tamaño poblacional estable por un largo periodo de tiempo, sin procesos de expansión reciente. Por el contrario, en todas las zonas geográficas donde se aislaron las cepas de chicha se observó un comportamiento Bimodal (dos campanas opuestas) para los datos observados, indicando una separación poblacional reciente (Figura 2.3). Por último, en la zona de Cipolletti (sidra) se observó una marcada forma unimodal desplazada hacia la izquierda, que indica una reciente expansión poblacional en esta área. Finalmente, en la zona de Villarrica (chicha) se observó un modelo de tipo, mientras que el modelo de predicción indicó que se trata de una población que se encuentra en reciente expansión.

1.2. Análisis filogenético global de *S. uvarum*

Las 31 cepas de *S. uvarum* que se analizaron previamente para estudios filogeográficos se utilizaron para realizar una reconstrucción global de la filogenia de la especie. Para esto se incorporaron al análisis, además de las dos cepas patagónicas de referencia (CRUB1778 y CRUB1586) previamente utilizadas, 27 cepas europeas aisladas de diferentes países y orígenes (Pérez-Través et al., 2014) y una cepa aislada en Nueva Zelanda (ZP966) utilizada como grupo externo. En la Tabla 1 se detallaron las principales características de estas nuevas cepas de *S. uvarum*. Con este nuevo total de 61 cepas de diferentes orígenes y países se procedió a la reconstrucción de un árbol filogenético, utilizando el método *Neighbor Joining* (NJ) y los datos de secuencias nucleotídicas de los siete genes nucleares antes mencionados (*BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2* y *MNLI*).

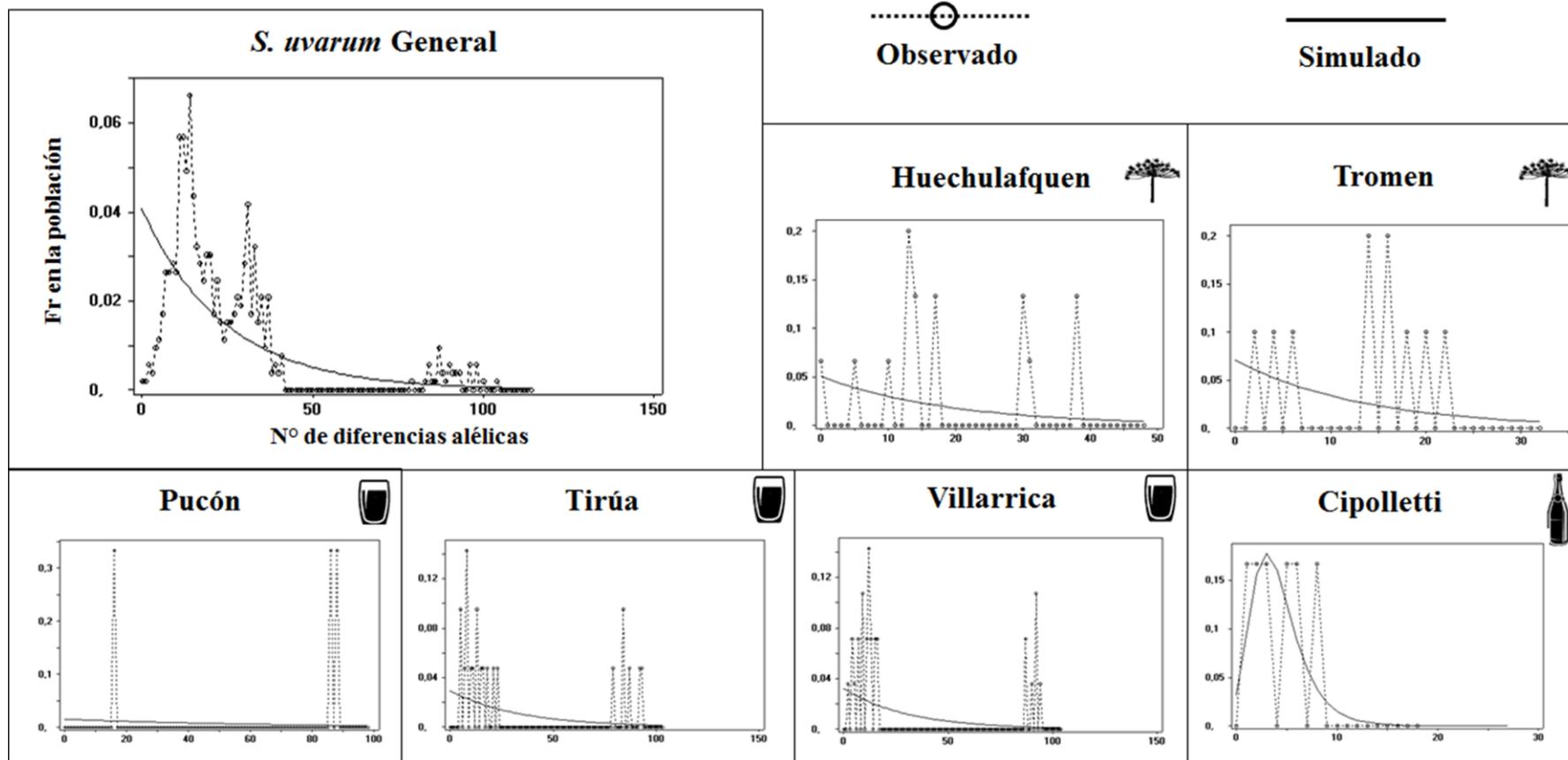


Figura 2.3. Mismatch distribution de todos los haplotipos de *S. uvarum* de la Norpatagonia. Las líneas continuas representan los datos simulados por el modelo, las líneas punteadas los datos observados.

En el árbol filogenético de genes nucleares (Figura 2.4) se formaron tres grandes clados, nombrados A, B y C. El clado C está integrado por la cepa ZP966 utilizada como grupo externo. En clado B se formó casi exclusivamente con las cepas aisladas de ambientes naturales (*A. araucana*) provenientes de la zona de Tromen, Argentina, excepto por la cepa *S. uvarum* NPCC1293 que fue aislada en Huechulafquen. Este clado es consistente con el grupo B formado en la red de haplotipos (Figura 2.2) y presenta una gran distancia con el resto de las cepas Patagónicas. Por último, el clado A es el más heterogéneo de todos, está formado por la mayoría de las cepas de *S. uvarum*, incluyendo cepas europeas y patagónicas, aisladas de ambientes naturales y de ambientes fermentativos. Aunque este gran grupo es muy heterogéneo, la mayoría de las cepas Patagónicas están más cercanas entre sí, de igual manera que las cepas europeas entre sí, con excepción de la cepa NCAIM 868 que quedó más relacionada con las patagónicas.

Además, se puede observar que las cepas aisladas de sidra en la ciudad de Cipolletti Argentina, se encuentran muy cercanas entre sí, y están cercanamente relacionadas a cepas aisladas de chicha (Figura 2.4). Se observó también un grupo formado por cepas europeas aisladas de (cepas S04, S10 y S14) que se agrupan con la cepa NPCC1309 proveniente de chicha de la Patagonia. Estas cepas se relacionan debido a la presencia de una introgresión en el gen *MNLI* correspondiente a la especie *S. cerevisiae*. Esta introgresión es la causa del agrupamiento y justifica la cantidad de sustituciones nucleotídicas medias por sitio que manifiestan en relación a las demás cepas.

1.3. Estructura poblacional de *S. uvarum*

Para el análisis de estructura poblacional se decidió omitir el gen nuclear *MNLI* debido a que la introgresión en este gen, con la especie *S. cerevisiae*, que presentan las cepas NPCC1309, S04, S10 y S14 distorsiona este tipo de análisis.

Al utilizar las 61 cepas que previamente fueron utilizadas en el análisis filogenético, se pudieron observar solo dos cluster ($K=2$), uno correspondiente a la cepa ZP966 (utilizada previamente como grupo externo) y otro cluster conteniendo el resto de las cepas (Figura 2.5.A). Esto se debe a la gran distancia génica que presenta esta cepa con el resto, previamente observado en el árbol filogenético. Debido a la marcada divergencia que

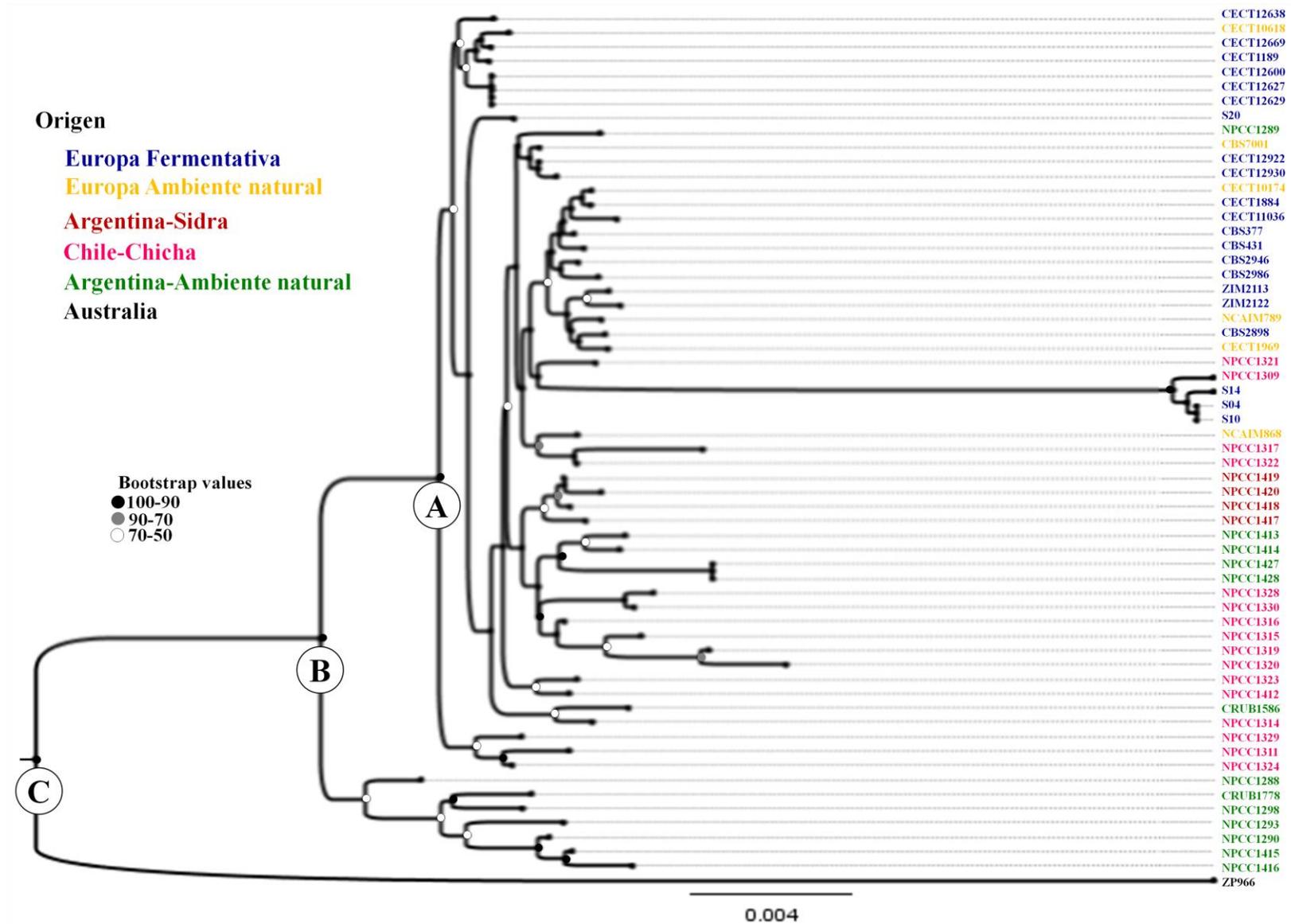


Figura 2.4. Árbol Filogenético de *S. uvarum* construido con el método Neighbor Joining (NJ) para siete genes nucleares (*BRE5*, *CAT8*, *CYC3*, *GAL4*, *MET6*, *EGT2* y *MNL1*). La escala corresponde a la sustitución nucleotídica media por sitio. Los puntos en los nodos se corresponden a los valores de Bootstrap que respaldan el cluster. El modelo evolutivo utilizado fue Kimura 2-parámetros.

mantiene la población de Nueva Zelanda, se decidió volver a realizar el análisis excluyendo esta última cepa. Interesantemente, en este nuevo análisis se observaron tres grupos o subpoblaciones diferentes ($K=3$). La subpoblación K1 quedó constituida por todas las cepas europeas con excepción de la cepa NCAIM868, la cual quedó incluida en la subpoblación K2. También se incluyeron en la subpoblación K1, un grupo de cepas aisladas de ambientes fermentativos de la Patagonia, que incluyen cepas aisladas de chicha y todas las cepas aisladas de sidra, con excepción de la cepa NPCC1417 (Figura 2.5.B).

Únicamente las cepas aisladas de chicha presentaron mezclas genéticas entre las subpoblaciones K1 y K2, que se evidenciaron por mostrar dos colores en el análisis de estructura poblacional (Figura 2.5.B), siendo más evidente en las cepas NPCC1330 y NPCC1328 ambas aisladas de chichas de Villarrica.

La subpoblación K2 se conformó con cepas aisladas de la Patagonia, incluyendo cepas de ambientes naturales (Huechulafquen) y de chicha (Pucón, Tirúa y Villarrica). En esta subpoblación también se encontró la cepa de sidra NPCC1417, la cual representa el perfil mayoritario en este ambiente. Finalmente, la subpoblación K3 representa una población bastante homogénea, formada únicamente por cepas aisladas de ambientes naturales de la Norpatagonia (todas provenientes de Tromen, con excepción de las cepas NPCC1293 de Huechulafquen y CRUB1778 utilizada como cepa de referencia del grupo SA-B reportado previamente por Almeida et al. 2014).

Es interesante observar que las cepas aisladas en la zona de Huechulafquen, Argentina, se encuentran representadas en las tres subpoblaciones obtenidas en el análisis de estructura poblacional: la cepa NPCC1289 se agrupó con la subpoblación K1, la cepa NPCC1293 se agrupó con la subpoblación K3 y el resto se agrupó en la subpoblación K2. Esta zona de muestreo es altamente heterogénea y estos resultados son consistentes a los observados en la red de haplotipos, siendo la única zona de muestreo en donde no se observó ningún tipo de estructuración geográfica.

1.4. Índices evolutivos

Con las 61 cepas se calcularon diferentes índices de variabilidad genética con el objetivo de establecer relaciones evolutivas globales (entre todos los individuos) y poblacionales. Utilizando los datos obtenidos de las secuencias de los siete genes nucleares,

se calculó el número de sitios segregantes (S) y la relación entre este parámetro y el total de sitios (ps) que correspondió a 3129pb (Tabla 2.3). Los resultados obtenidos para estos índices indicaron una relativamente baja cantidad de sitios segregantes para las cepas analizadas, con un porcentaje de 8% de variabilidad. No obstante, cabe destacar que toda la extensión de la secuencia correspondió a regiones codificantes del genoma.

Además, se evaluó el estadístico “ $F_{st} \Theta$ ” y la distancia nucleotídica “ π ”. Los valores obtenidos para estos parámetros evidenciaron también una variabilidad genética relativamente baja para toda la especie, de 1,7% y 0,8% respectivamente para los genes analizados. Por último, el test de neutralidad de Tajima estimado es negativo y alto, indicando el efecto de la selección normalizadora en este caso (Tabla 2.3).

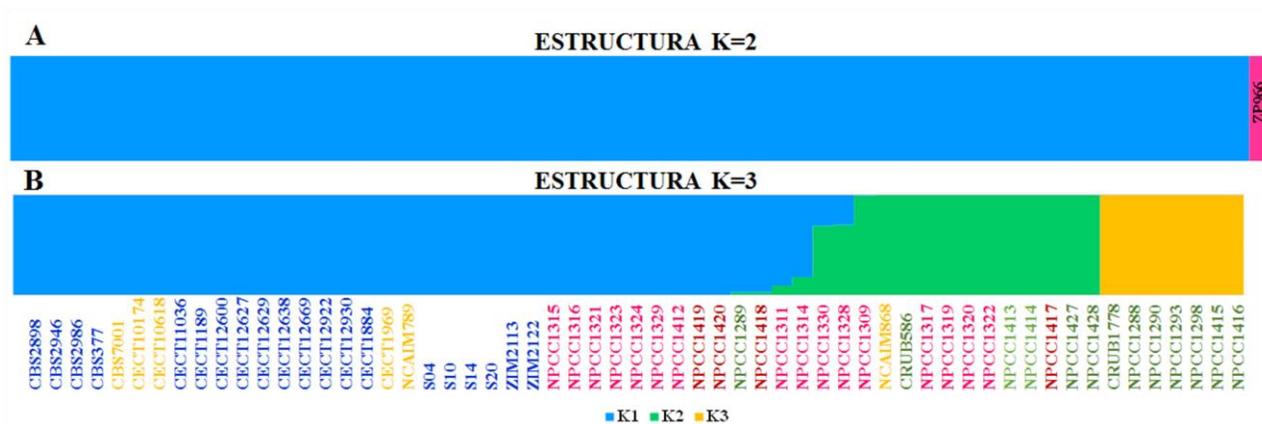


Figura 2.5. Estructura poblacional de *S. uvarum*. A. Resultado obtenido con la incorporación de la cepa de Nueva Zelanda ZP966. B. Resultado obtenido excluyendo la cepa ZP966. Cepas europeas: fermentativas (azul); ambiente natural (naranja); Cepas patagónicas: ambiente natural (verde); chicha (fucsia); sidra (rojo). K: grupos poblacionales.

Tabla 2.3: Índices de distancia y test de Neutralidad de Tajima

m	S	ps	Θ	π	D
61	259	0.081140	0.017338	0.007985	-1.910072

m: número de cepas; S: número de sitios segregantes para la matriz concatenada de los 7 genes nucleares; ps: S/n (extensión total de la secuencia 3129pb); Θ : Estadístico F_{st} de Wright 1951; π (diversidad nucleotídica o heterocigosidad); D: Test de neutralidad de Tajima.

Posteriormente se evaluó la distancia genética entre los grupos (subpoblaciones) que resultaron del análisis de estructura poblacional: K1, K2 y K3. Para ello se utilizó el modelo de Kimura 2-parámetros para la sustitución nucleotídica por sitio. La cepa ZP966 se utilizó como grupo externo. A partir de los resultados de este análisis se observó que las poblaciones K1 (formada por cepas europeas y algunas cepas fermentativas de la Patagonia) y K2 (cepas fermentativas y de ambientes naturales de la Patagonia) presentan la menor distancia nucleotídica (0,007). Por otra parte, la población K3 (cepas patagónicas de ambientes naturales) presentó una distancia menor con la población K2 (patagónica) que con la población K1 (mayormente europea). Finalmente, el grupo externo formado por la cepa ZP966 presentó la mayor distancia (entre 0,042 y 0,045) con el resto de las poblaciones, indicando un valor crítico para definir a esta cepa dentro de la especie *S. uvarum* (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Distancias nucleotídicas entre diferentes poblaciones de *S. uvarum*

	K1	K2	K3
K1	-	-	-
K2	0,007	-	-
K3	0,01	0,009	-
Grupo externo	0,044	0,045	0,042

1.4. Evolución mitocondrial en *S. uvarum*

A fin de conocer si las relaciones filogenéticas observadas a nivel nuclear se relacionan con las que podrían existir a nivel mitocondrial, se analizaron las secuencias del gen mitocondrial *COX2* de las 60 cepas estudiadas en esta Tesis. La cepa ZP966 no fue incluida en este análisis debido a que no se encontró disponible la secuencia del ADN mitocondrial de la misma, ni de ninguna otra cepa de esta región. Se seleccionó este gen debido a que había demostrado previamente un alto poder discriminatorio entre cepas de *S. uvarum* (Pérez-Través et al. 2014). Para el análisis filogenético se utilizó el método Neighbor net Joining. En el mismo, en función de la cantidad de cepas y de la distancia observada en la red se formaron cinco grandes grupos y luego ramificaciones menores. Los grupos I, II y III (en sí representan tres haplotipos) estuvieron formados por todas las cepas europeas (de ambientes naturales y fermentativos), todas las cepas de sidra y algunas cepas de chicha de la Patagonia, con excepción del grupo II que además estuvo formado por tres cepas aisladas de ambientes fermentativos en la zona de Tromen (Figura 2.6). El grupo IV (separado con línea de puntos)

estuvo formado por seis diferentes haplotipos todos aislados de ambientes naturales en la Patagonia (de la zona de Tromen, Huechulafquen, Parque Perito Moreno y Rucahuenu Tronador). Este grupo fue uno de los más distanciado en la red, evidenciando un bajo flujo con el resto de las cepas. Por último, el grupo V, marcadamente distanciado al igual que el grupo IV, estuvo formado por cepas aisladas de chicha (de la zona de Tirúa). Luego los grupos minoritarios estuvieron formados por cepas aisladas de chicha (de diferentes zonas de muestreo) y dos cepas aisladas de ambientes naturales de las dos zonas de muestreo. Interesantemente estos grupos minoritarios estuvieron en el medio de los grupos I, II y III, indicando mayor cercanía con estos (Figura 2.6).

Por otro lado, al analizar las secuencias pudimos detectar que a partir de la posición 471pb del amplicón las cepas del grupo V (NPCC1309, NPCC1315, NPCC1319, NPCC1320) presentaban una gran diferencia con el resto de las cepas, fenómeno que también fue observado en la red, es por ello que realizamos análisis de Blastn con este pequeño segmento de 42pb y detectamos que la secuencia se correspondía (con un 100% de identidad) con *S. cerevisiae* (Tabla 2.5).

Por último, con la secuencia de este gen mitocondrial se analizaron los índices de variabilidad genética previamente analizados para el genoma nuclear. En cuanto a la cantidad y a la proporción de sitios segregantes (parámetro S y ps) se observaron los mismos valores que a nivel nuclear, siendo muy bajos para todos los individuos de la especie analizados (Tabla 2.6).

Con respecto a la distancia nucleotídica utilizando el estadístico F_{st} (Θ) se observó nuevamente una baja variabilidad para la especie, pero utilizando el estadístico π (medida de la heterocigosidad esperada) para este tipo de herencia se observó una variabilidad dos veces mayor a la observada a nivel nuclear. Por último, en cuanto al estadístico de Neutralidad de Tajima D, se observó nuevamente un valor negativo que indica que esta especie está sometida a una selección normalizadora también en este gen (Tabla 2.6).

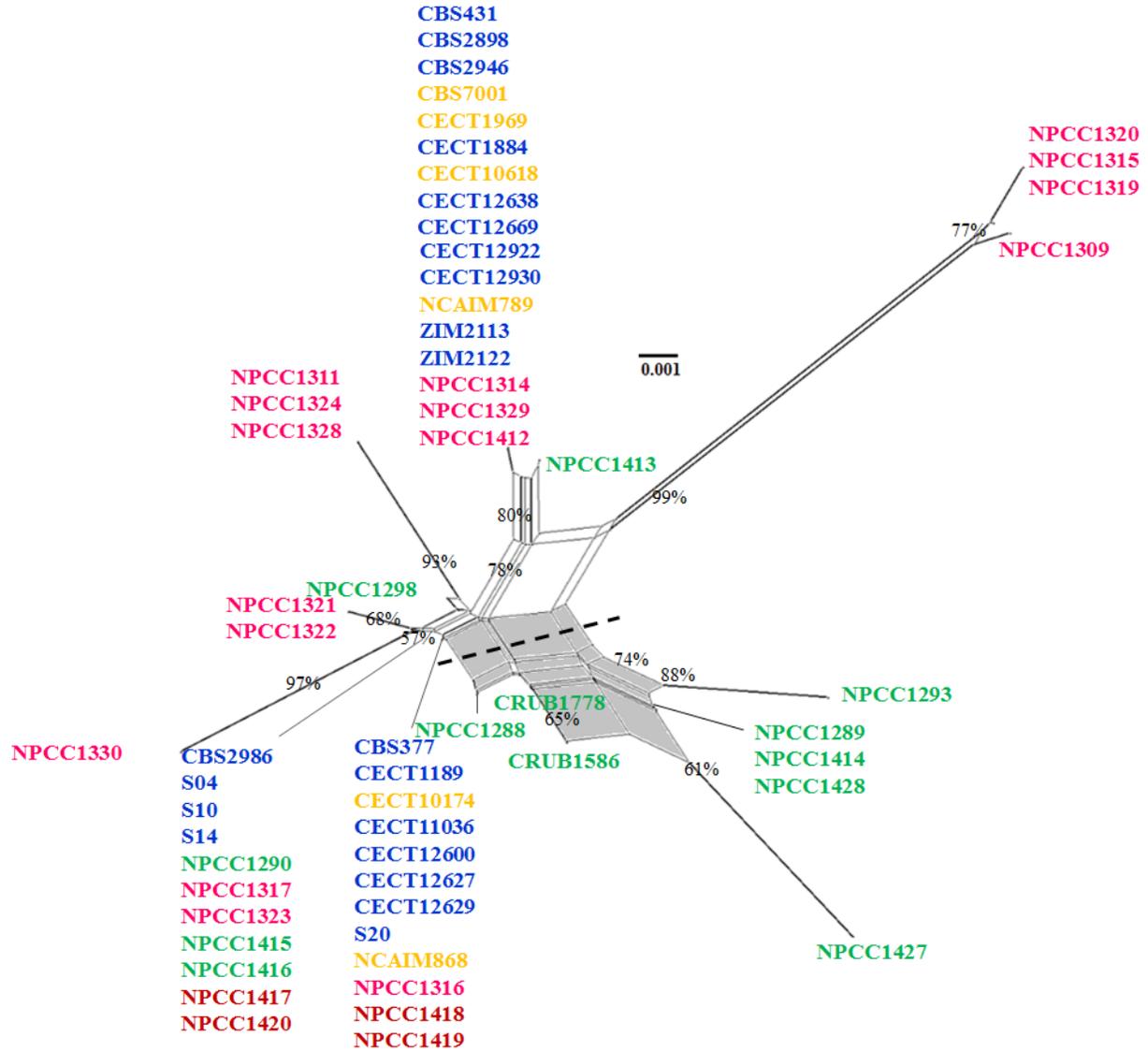


Figura 2.6. Neighbor net Joining del gen mitocondrial *COX2* de *S. uvarum*. La escala representa el número de sustituciones nucleotídicas media por sitio. Porcentajes en los nodos representan valor de Bootstrap. En azul y naranja: cepas europeas aisladas de ambiente fermentativo y natural respectivamente. En verde, rosa y rojo cepas patagónicas aisladas de ambiente natural, chicha y sidra respectivamente.

Tabla 2.5. Fragmento 3' de la secuencia del gen *COX2* a partir de la posición 471, mostrando solamente los sitios invariables. Grupo I, II y III se corresponden a los tres haplotipos representados en la Figura 2.6.

Cepas	Secuencia
	↓471pb
Grupo I	CCAAATTAAG ATCCTC
Grupo III	...TC..T..
Grupo IIC..
NPCC1288A
NPCC1289;NPCC1414; NPCC1428	T.....C..A
NPCC1293	T.T...C..A
NPCC1298C..
NPCC1311; NPCC1324; NPCC1328	.T.....C..
NPCC1321; NPCC1322C..
NPCC1330C..
NPCC1413	...TC..T..
NPCC1427	T.....C..A ...A.A
CRUB1586A
CRUB1778A
NPCC1309	..GGCCC.G. GAT.A.
NPCC1315; NPCC1319	..GGCCC.G. GAT.A.
NPCC1320	..GGCCC.G. GAT.A.
<i>S. cerevisiae</i>	..GGCCC.G. GAT.A.

Tabla 2.6: Índices de distancia y test de Neutralidad de Tajima

m	S	ps	Θ	π	D
17	36	0,0070175	0,020757	0,016713	-0,801723

m: número de cepas; S: número de sitios segregantes para la matriz concatenada de los 7 genes nucleares; ps: S/n (extensión total de la secuencia 513pb); Θ : Estadístico F_{st} de Wright 1951; π (diversidad nucleotídica o heterocigosidad); D: Test de neutralidad de Tajima.

DISCUSIÓN

La exposición de plantas, animales y microorganismos a ambientes antrópicos ha llevado al surgimiento de adaptaciones asociadas al proceso conocido como domesticación, el último caso de divergencia adaptativa en respuesta a la selección humana (Gibson y Liti, 2015; Goddard y Greig, 2015). Así, existen en la naturaleza varias especies con poblaciones más o menos domesticadas, que constituyen una fuente de información para planteo de estudios evolutivos íntimamente relacionados con la historia del hombre. Entre las levaduras, el caso de la especie *S. cerevisiae* ha sido el más extensamente estudiado. Esta especie cuenta

con cepas de ambientes naturales, cepas de laboratorio, cepas asociadas a procesos de elaboración de bebidas fermentadas, cepas clínicas, etc. Varios trabajos han estudiado a esta especie y sus mecanismos de adaptación a nichos generados por la actividad del hombre, sobre todo en los últimos años (Duan et al., 2018; Gallone et al., 2016; Gibson y Liti, 2015). En el caso de otras especies del género, los estudios son mucho más escasos. El hallazgo de *S. uvarum* asociado con sidras en la Norpatagonia durante el desarrollo de esta Tesis, así como la presencia recientemente reportada de cepas de esta especie asociadas a fermentaciones de chicha de manzana (Rodríguez et al., 2017) y a ambientes naturales (Almeida et al., 2014; Libkind et al., 2011; Rodríguez et al., 2014) en la misma región resultan descubrimientos interesantes para el planteo de un nuevo escenario de domesticación para esta especie.

El primer trabajo en el que se plantea la posibilidad de una domesticación en *S. uvarum* fue realizado por Almeida et al., (2014) utilizando datos de secuencias completas del genoma de 54 cepas diferentes de esta especie. En ese trabajo los autores incluyeron únicamente cepas sudamericanas obtenidas de hábitats naturales, dado que hasta el momento no se disponía de cepas patagónicas de ambientes fermentativos. Utilizando un análisis de estructura poblacional los autores pudieron identificar dos poblaciones ($k=2$) en la especie *S. uvarum*, una correspondiente al clado A (clado observado también en esta Tesis y que corresponde a cepas de Australasia) y otra que incluía todas las cepas Patagónicas y las cepas del hemisferio Norte (clados B y C en esta Tesis). En un segundo análisis generado eliminando las cepas de Australasia, Almeida et al. (2014) proponen la existencia de tres subpoblaciones ($k=3$), una claramente diferente y correspondiente al clado B (también observado en esta Tesis) denominada subpoblación Sudamérica B (SA-B) y dos subpoblaciones que resultan de dividir el clado A en dos subpoblaciones. Esta división se respalda parcialmente con el árbol filogenético de los datos de SNPs y corresponde a una estructuración artificial puramente geográfica, generando la subpoblación Holártica (Hol) -formada por cepas de diferentes países del hemisferio norte, principalmente aisladas de ambientes fermentativos- y la subpoblación Sudamérica A (SA-A) - formada únicamente por cepas Patagónicas aisladas de ambientes naturales.

El hallazgo posterior de nuevas cepas de *S. uvarum* a partir de fermentaciones tradicionales (Rodríguez et al., 2017) vuelve a demostrar la existencia de dos subpoblaciones

en la Patagonia, una subpoblación de ambientes naturales y otra que incluye las cepas de chichas que se relaciona con las cepas Holárticas. El descubrimiento en esta Tesis de cepas de *S. uvarum* asociadas a fermentaciones industriales (sidras) en la Norpatagonia, permite dibujar una nueva imagen sobre la diversidad de esta especie. Los clados observados en esta Tesis a partir de los datos de secuencias multilocus parecieran corresponder en líneas generales con los clados obtenidos por Almeida et al., (2014) utilizando los datos de SNPs de los genomas completos. Sin embargo, la incorporación de nuevas cepas aisladas de chichas de manzana y de sidras permitió en esta oportunidad detectar las tres subpoblaciones (K=3), respaldadas con el análisis de estructura poblacional. Estas subpoblaciones corresponderían a las subpoblaciones Hol, SA-A y SA-B denominadas K1, K2 y K3 en el análisis de estructura poblacional realizado en este trabajo. Este fenómeno probablemente se deba a la adición de las nuevas cepas de ambientes fermentativos, localizadas en el clado A (que incluye a las subpoblaciones Hol y SA-A) en el árbol filogenético. En el caso particular de las cepas de sidra, el análisis de estructura poblacional indica que la mayoría de ellas pertenece a la subpoblación Hol.

Resumiendo, las cepas aisladas de sidra en esta Tesis y gran parte de las cepas de chicha parecieran pertenecer a la subpoblación Hol o, al menos, ser mezclas entre esta y la subpoblación SA-A. El posible origen de estas dos poblaciones es controversial. En la hipótesis propuesta por Almeida et al., (2014), se propone que la subpoblación Hol deriva de la subpoblación SA-A, hipótesis que es soportada con en el análisis de divergencia donde observaron que el tiempo de coalescencia de la subpoblación Hol es menor que el de la subpoblación SA-A y SA-B. Por otro lado, Rodríguez et al., (2017) proponen que un grupo de cepas Hol probablemente originaron a la subpoblación SA-A en un evento mucho más reciente (≈ 500 años) asociado a la colonización de los españoles en el continente americano. Las dos teorías hasta el momento son muy consistentes y los datos nuevo aportados en esta Tesis no terminan de respaldar ni una ni la otra. Del análisis de la hipótesis de Almeida et al., (2014) resulta difícil de comprender porqué divergieron tanto las subpoblaciones SA-A y SA-B coexistiendo en los mismos ambientes, si bien la explicación de los autores es sólida, proponiendo que han seguido el mismo camino evolutivo asociado a la evolución de *Nothofagus* (en donde se reportó un fuerte aislamiento reproductivo por barreras geográficas relacionadas a las glaciaciones) esto no explicaría porque las cepas encontradas en A.

araucana (que no se vió sometida a este fenómeno ecológico) también están tan separadas a nivel filogenético. Además, tampoco ofrecen una explicación a cómo pudieron llegar estas poblaciones a los ambientes fermentativos, fenómeno que no fue explorado en este trabajo debido a hasta el momento no se había reportado el hallazgo de las cepas fermentativas en la Patagonia.

Almeida et al., (2014) reportaron que 20 de 34 cepas Holárticas presentaban introgresiones con diferentes especies del género *Saccharomyces* (*S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* y principalmente *S. eubayanus*), mientras que en Sudamérica no detectaron este fenómeno. Los autores proponen que los eventos de introgresión son favorecidos en ambientes fermentativos, como mecanismos propios de la domesticación, y eso podría explicar por qué en la Patagonia, donde se encuentra a la especie *S. uvarum* coexistiendo con su especie hermana *S. eubayanus* no ocurren este tipo de eventos debido a que ambas ocupan nichos en ambientes naturales (todo esto extraído del análisis de estos autores). Por ende, posiblemente este tipo de introgresiones ocurrieron en Europa en respuesta a la adaptación a ambientes fermentativos. Esta hipótesis fue reforzada por el estudio de la ontología genética donde encontraron que la mayoría de las regiones introgresadas poseen genes involucrados en el metabolismo de compuestos nitrogenados, regulación y resistencia al sulfito entre otras características involucradas en la adaptación a los ambientes fermentativos (Almeida et al., 2014). A favor de esta hipótesis, Rodríguez et al., (2017) reportaron la presencia de una introgresión con la especie *S. cerevisiae* en la región subtelmérica del cromosoma VII (evidenciada a través del análisis de secuencia del gen *MNLI*) en la cepa NPCC1309 aislada de chicha de manzana en la Patagonia. Interesantemente, esta introgresión es similar a la que poseen las cepas europeas aisladas de sidras de Irlanda S4, S10 y S14. Prácticamente toda la extensión del amplicón (aproximadamente 230pb) es exactamente idéntico para estas cuatro cepas. El análisis de Blastn de estas secuencias evidenció un 100% de identidad con múltiples cepas de *S. cerevisiae* provenientes de ambientes fermentativos en Europa (datos no mostrados). Resulta difícil inferir si este evento se produjo en una única cepa y en un único lugar y en caso de ser así si se produjo en la Patagonia o en Europa, debido a que en tanto en las chichas donde se aisló la cepa NPCC1309 como en las sidras donde se aislaron las cepas S4, S10 y S14 se observó la coexistencia de *S. uvarum* con *S. cerevisiae*. En el caso de las cepas de *S. cerevisiae* de chichas de la Patagonia, todas presentaron una estrecha relación

filogenética con las cepas de la población vínica europea de esta especie (Rodríguez et al., 2017), por lo que no se puede diferenciar el origen de la porción *S. cerevisiae* introgresada. Datos preliminares obtenidos en el laboratorio en colaboración con el grupo de la Dra. Amparo Querol parecen evidenciar que los sitios de recombinación no son exactamente los mismos en las cepas europeas y sudamericanas, lo cual sugeriría que fueron eventos independientes en respuesta al ambiente de fermentación de mosto de manzana.

El hallazgo de cepas incluidas en la subpoblación Holártica en ambos continentes, pero de cepas correspondientes a la subpoblación SA-A sólo en Sudamérica refuerza la idea de una colonización de la población Hol desde Europa hacia Sudamérica. Si bien con el análisis de estructura poblacional (para los genes nucleares) se observó una cepa aislada de ambientes naturales de Hungría (NCAIM868) incluida en la subpoblación SA-A, la misma cepa se ubicó en la subpoblación Hol cuando se analizaron las secuencias completas (Almeida et al., 2014). Esta discrepancia podría deberse a un sesgo por la baja cantidad de información al utilizar sólo algunos genes en lugar de secuencias completas. Por último, el hallazgo de cepas mixtas Holartica/SA-A solo en Sudamérica es una evidencia adicional que soporta esta hipótesis, debido a que si la población SA-A originó a las europeas sería más probable encontrar alguna cepa mixta en Europa y no en Sudamérica.

No es el objetivo de esta Tesis evaluar el origen de las poblaciones de *S. uvarum* en el mundo, no obstante, sí resulta de interés conocer los posibles eventos que permitan explicar la diversidad genética y fisiológica de las poblaciones encontradas en la Norpatagonia. En este sentido el escenario propuesto por Rodríguez et al., (2017) resulta particularmente interesante, ya que proponen la existencia de una dispersión de cepas de *S. uvarum* desde Europa hacia América asociada con la introducción de las manzanas. Los colonos introdujeron manzanas en el continente americano en los siglos XVI al XVII, particularmente en Estados Unidos, México, Chile y Argentina. El hecho que *S. uvarum* ha sido frecuentemente aislada de sidras, llegando incluso a niveles poblacionales superiores o iguales a los de *S. cerevisiae* en algunos casos (Coton et al., 2006; Morrissey et al., 2004; Suárez Valles et al., 2007), permitió proponer la idea de la entrada de la subpoblación Hol de esta especie en asociación con los manzanos en Sudamérica. Como sugiere Rodríguez et al., (2017), la explotación de los manzanos fue adoptada por las comunidades aborígenes Mapuches en el sur de Chile (Pardo y Pizarro, 2005) quienes los introdujeron en el lado

argentino de los Andes durante sus viajes como comunidades nómades (Bandieri 2005). Los manzanos propagados por las comunidades mapuches sobrevivieron y se reprodujeron naturalmente en la región norte de la Patagonia Andina, compartiendo hábitat con otras especies de árboles nativos, incluidas las del género *Nothofagus* y la gimnosperma *A. araucana* (Barrera et al., 2000). Calvo et al., (2010) evidenciaron la existencia de al menos tres poblaciones diferentes de manzanos silvestres en la actualidad y una fuerte influencia humana en su distribución geográfica. En este nuevo ambiente, las cepas Holárticas de *S. uvarum* se encontraron con las cepas nativas de Sudamérica (al menos las de la subpoblación SA-B que se encuentra distribuida a lo largo de toda la cordillera de los Andes y presenta una gran variabilidad típica de las poblaciones naturales) lo que representó el primer contacto entre estas subpoblaciones (SA-B y Hol). Interesantemente en las zonas más australes de la cordillera (por debajo del paralelo 45°), donde no se introdujeron los manzanos, tampoco se advierte la presencia de la subpoblación SA-A ni tampoco la subpoblación Hol de esta especie. El hecho de haber encontrado cepas pertenecientes a la subpoblación Hol en las sidras evaluadas en esta Tesis, también refuerza la propuesta de Rodríguez et al., (2017) sobre la migración de estas cepas desde Europa. Sin embargo, proponemos que probablemente pudo existir un segundo contacto más reciente con la llegada de los inmigrantes (principalmente europeos) en el siglo XIX en el Alto Valle de Río Negro (detectado en Cipolletti) quienes introdujeron en esta zona nuevas variedades domesticadas de manzana y vid dispersando a *S. uvarum*. Esto se soporta por el hecho de que las cepas aisladas de sidra son principalmente Holárticas en el análisis de estructura poblacional y están más cercanamente relacionadas a las cepas europeas. Un evento similar también fue descrito por Zhang et al., (2010) quienes demostraron que cepas de *S. paradoxus* (de corteza de árbol) están íntimamente relacionadas con cepas europeas de *S. paradoxus*. Los autores sugieren que estas cepas pueden haber sido introducidas recientemente en asociación con las bellotas traídas con los inmigrantes. En la Figura 2.7 se expone un esquema que explica la hipótesis expuesta en esta Tesis.

Todos estos supuestos se interpretan con mayor precisión al analizar la dinámica poblacional a escala regional, que en sí es el objetivo de este capítulo, el poder comprender la historia evolutiva de las poblaciones patagónicas. Una marcada estructuración geográfica se evidenció en la red de haplotipos, observada en la mayoría de las áreas de estudio,

principalmente en Villarrica, Tirúa, Tromen y Cipolletti. Pero en la zona de Huechulafquen, las cepas se encontraron representadas en las dos poblaciones detectadas con el análisis de estructura poblacional (SA-A y SA-B). Esta área es un ejemplo de coexistencia simpátrica entre dos subpoblaciones genéticamente distantes. Este fenómeno se puede atribuir al hecho de que Huechulafquen, a diferencia de Tromen (con cepas solo de la subpoblación SA-B), es un área más antrópica cerca de la región habitada de Junín de los Andes (Neuquén). Como ya fue sugerido por Rodríguez et al., (2017), la población íntimamente relacionada a las cepas europeas parece estar presente tanto en ambientes de fermentativos como en ambientes naturales con mayor presencia del hombre, mientras que la población SA-B está presente solo en ambientes naturales donde la presencia del hombre es muy baja.

La dinámica poblacional en la Patagonia puede ser interpretada en el análisis de *Missmatching Distribution*. Para ambos sitios de muestreo donde se aislaron únicamente cepas de ambientes naturales (Tromen y Huechulafquen) se obtuvo un modelo de distribución de tipo multimodal, indicativo de una población estable, no sometida a ningún tipo de selección sino más bien a eventos de tipo estocásticos, donde los genes actualmente están en equilibrio. Este tipo de poblaciones son frecuentemente observadas cuando el número poblacional de la muestra de estudio es muy grande (Marjoram y Donnelly, 1994); sin embargo, aun cuando en nuestro análisis el número no es lo suficientemente grande se observó este mismo fenómeno. Esto posiblemente esté relacionado a que las presiones selectivas en un ambiente natural son muy distintas, quizás las cepas al no verse sometidas a presiones selectivas artificiales (fenómenos observados por la influencia antrópica) no se observa el efecto de la selección sino más bien eventos de tipo neutrales. Un evento similar fue observado por Arias Garcia, (2008), quién evaluó el efecto de la evolución neutral (con el Test de Fisher ω , Test D Tajima y Pruebas de Neutralidad de Hudson Kreitman y Aguadé) en poblaciones vnicas y no vnicas de *S. cerevisiae* (utilizando 128 cepas vnicas y 118 cepas no vnicas), en las primeras observó que no hay efecto de la teoría neutral, proponiendo que las cepas son sometidas a selección positiva (o direccional) favoreciendo la selección de un determinado tipo de genotipos, mientras que en las segundas no observó efecto de la selección proponiendo que el comportamiento se adapta a la teoría de evolución neutral.

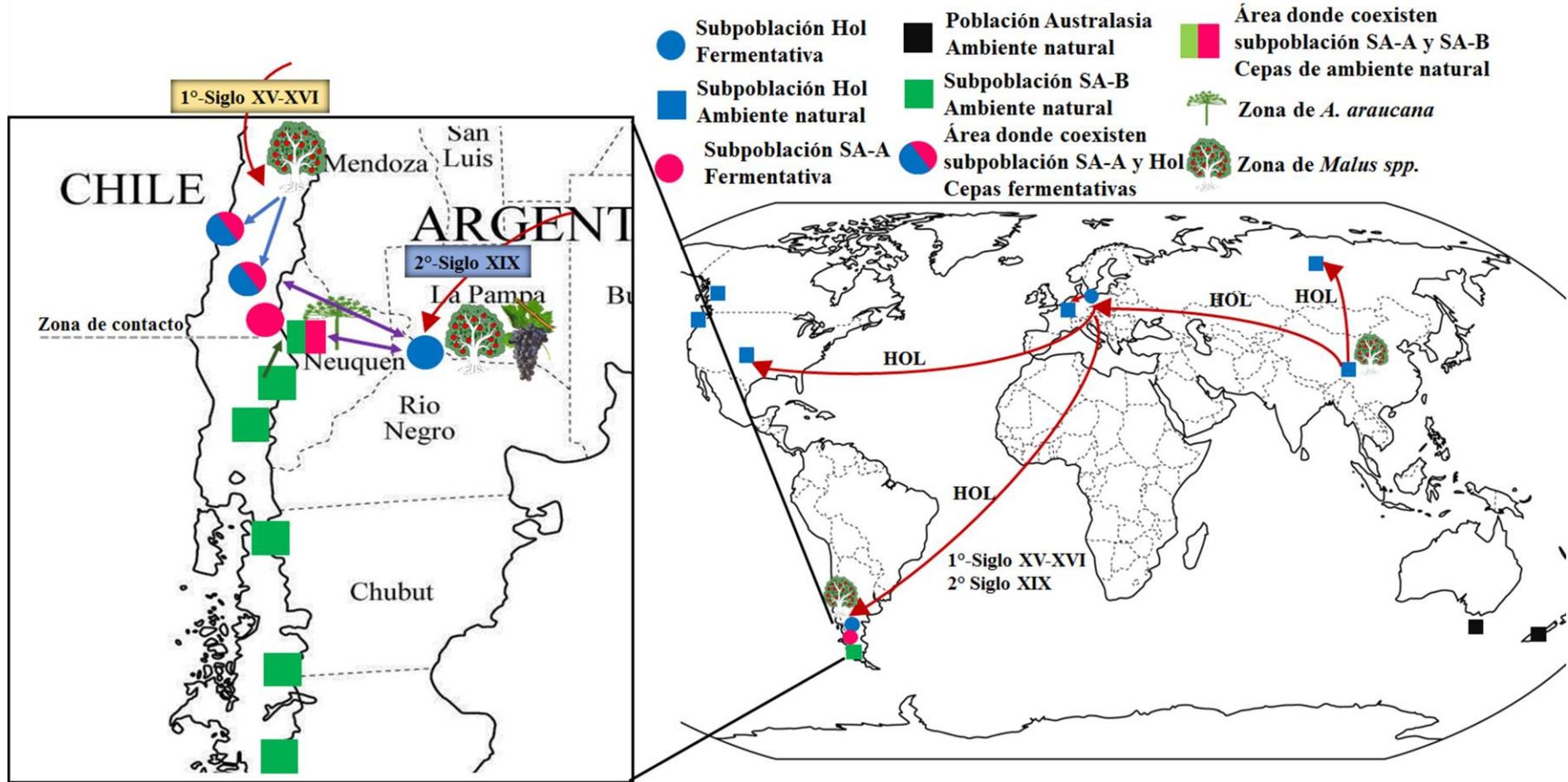


Figura 2.7. Esquema representativo de la posible historia evolutiva y dispersión poblacional de la especie *S. uvarum*, basado en la teoría de Rodríguez et al., 2017 ampliando la distribución para la especie en la Patagonia. Las flechas indican dispersión por el hombre. 1º y 2º primer y segundo contacto.

En los sitios donde se aislaron cepas de ambientes fermentativos se observó un modelo poblacional de tipo bimodal (chichas de Pucón, Tirúa y Villarrica) o unimodal (sidra de Cipolletti). El primer modelo se podría explicar por la presencia de la cepa NPCC1309 (que contiene una porción de *S. cerevisiae* donde se ubica el gen *MNLI*). Probablemente, la presencia de esta introgresión confiera una ventaja adaptativa en la población y esto esté direccionando la selección en un sentido, mientras que el resto de los genotipos estén siendo seleccionados en otro sentido. Este modelo es típico de una selección balanceadora (o disruptiva), un proceso que mantiene dos genotipos opuestos durante un periodo de tiempo y que por lo general termina originando una nueva población mientras que la otra desaparece, o diferenciando dos poblaciones si se sostiene en el tiempo (Ray et al., 2003). En la especie *S. uvarum* se han detectado múltiples introgresiones en la mayoría de los cromosomas, principalmente con la especie *S. eubayanus* (Almeida et al., 2014) y también con *S. cerevisiae* (Warren et al., 2017). Interesantemente se reporta que la mayor cantidad de introgresiones se presentan en las cepas Holárticas fermentativas, mientras que en las cepas salvajes (de Europa, Canadá y Estados Unidos) este fenómeno es poco frecuente (Almeida et al., 2014; Warren et al., 2017). Al contrario de lo observado en nuestro análisis Warren et al., (2017) pudieron detectar una mayor frecuencia de introgresiones en las cepas aisladas de uva y vino que en las de sidra y jugo de manzana, pero específicamente en el cromosoma II detentan una sobre-presencia (tres veces mayor) de una introgresión que involucra al gen *ASPI* -gen que codifica la asparaginasa citosólica involucrada en el metabolismo de la asparagina principal aminoácido en la manzana (Dunlop et al., 1978)- mecanismo de adaptación directamente relacionado con la adaptación al medio, con lo que concluyen que probablemente las introgresiones sean la principal fuente de variabilidad fenotípica aunque la variabilidad genotípica sea baja en las cepas aisladas de ambientes fermentativos de Europa.

En el ambiente más antrópico (sidra) se observó un modelo unimodal desplazado a la izquierda, que indica el principio de una expansión poblacional y el marcado efecto de la selección normalizadora (Excoffier et al., 1992). Esto significa que la mayoría de los genes que están siendo seleccionados son de un fenotipo particular y que en este momento es el fenotipo más frecuente en la población. Este tipo de selección puede deberse a que en un ambiente fermentativo existen prácticas que determina situaciones de estrés para las

levaduras diferentes de las que pueden encontrarse en una fermentación tradicional (como podría ser el uso de SO₂ como antimicrobiano, las elevadas concentraciones de etanol, la necesidad de competir por los sustratos con levaduras que son inoculadas en concentraciones mucha más elevadas a las del mismo mosto). La drástica reducción de la variabilidad observada en la sidra respecto de la evidenciada en ambientes naturales o chichas, también podría estar relacionada a estos factores de estrés típicos de los procesos fermentativos industriales que favorecen la selección de un número reducido de cepas, es decir un número reducido de fenotipos. En la especie *S. cerevisiae* se observó un fenómeno similar al comparar cepas de ambientes fermentativos Europeas en relación con cepas aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica (Mexico), el autor evaluó además la heterocigosidad en las poblaciones y observó que en la mayoría de los casos las cepas aisladas de ambientes fermentativos presentaban una alta homocigosidad, generada por el mecanismo de *genoma renewal* descrito por Mortimer et al., (1994), en este trabajo se propone que con este mecanismo la mayoría de los genes recesivos deletéreos sufren un barrido rápido y se seleccionan una cantidad muy baja de alelos, lo que reducía drásticamente la variabilidad.

Finalmente, al realizar el análisis con todas las cepas (*S. uvarum* general), se observó un modelo unimodal desplazado hacia la izquierda, con un pequeño pico en el extremo derecho, esto indica una reciente expansión poblacional. Probablemente el pico más importante corresponda con todas las cepas pertenecientes a las subpoblaciones Holártica, SA-A y SA-B mientras que el pequeño pico en el otro extremo represente las cepas con la región que contiene al gen *MNLI* de *S. cerevisiae* (representadas por la cepa NPCC1309). La clina en el medio del gráfico muchas veces se relaciona con un aislamiento reproductivo o un bajo flujo génico entre estos dos grupos, fenómeno que también fue observado en la red de haplotipos. En un análisis más detallado del pico más grande, se podría evidenciar la presencia de dos picos que podrían corresponder a las subpoblaciones Hol/SA-A y SA-B, ya que los valores obtenidos del número de diferencias alélicas en los sitios donde se encontraron cepas de estas poblaciones son similares (datos del análisis separado por región) a los observados en el gran pico detectado en el análisis de *S. uvarum* general.

Por último, el análisis de las secuencias del gen mitocondrial *COX2* reveló una historia mucho más compleja que la resuelta por el análisis del genoma nuclear. En una primera mirada se aprecian muchos haplotipos entre las cepas de ambientes naturales de Sudamérica,

una cantidad intermedia de haplotipos entre las cepas de chicha y muy pocos entre las cepas europeas y de sidra (solo tres). Estos haplotipos no se relacionan directamente con las subpoblaciones detectadas a partir del análisis de estructura poblacional realizado a nivel nuclear ya que parece haber un mayor flujo génico al analizar este gen mitocondrial. De hecho, el análisis del Neighbor Net Joining evidenció un grupo de cepas más distanciado del resto, formado por cepas de ambientes naturales incluidas en ambas subpoblaciones SA-A y SA-B que parece evidenciar la existencia de flujo génico entre estas subpoblaciones que parecía no existir al analizar los genes nucleares, tal como se discutió previamente. Esta observación parece lógica ya que los eventos de evolución reticulada, que incluyen la hibridación interespecífica, introgresiones y transferencia horizontal (Dunn et al., 2012; Gladieux et al., 2014; Liti et al., 2009, 2006; Novo et al., 2009; Peris et al., 2012) tienen mayor impacto en el genoma mitocondrial que en el nuclear. La reconstrucción filogenética bajo eventos de evolución reticulada requiere del uso de nuevos modelos evolutivos, el análisis Neighbor net Joining permite considerar este tipo de conflictos lo que amplía la comprensión de las relaciones evolutivas a nivel del genoma mitocondrial (Leducq et al., 2013), tal como se hizo en los trabajos de (Peris et al., 2017, 2014, 2012).

El hecho de encontrar flujo génico entre las subpoblaciones SA-A y SA-B (ya se demostró que entre las subpoblaciones SA-A y Hol sí existe flujo génico y de hecho esto hace que sea muy difícil separar estas dos subpoblaciones) indica que no existen barreras postzigóticas entre las subpoblaciones (barreras precigóticas obviamente no existen por tratarse de una misma especie). Sin embargo, podría ocurrir que la progenie (resultante del cruzamiento entre ambas subpoblaciones) no presente un fitness adaptativo elevado al menos en ambientes naturales que es donde se podrían encontrar representantes de estas subpoblaciones, y es por esto que no perduran cepas con *admixture* de ambas subpoblaciones a nivel de genoma nuclear. En este sentido, Almeida et al., (2014) detectaron sólo dos cepas que parecen corresponder a cepas mixtas entre las poblaciones SA-A y SA-B en ambientes naturales. A fin de descartar la falta de compatibilidad gamética que pueda explicar la existencia de las dos subpoblaciones con un limitado flujo génico en los ambientes naturales de la Patagonia, estos autores realizaron cruzamientos entre cepas de las subpoblaciones SA-A y SA-B y entre cepas de las poblaciones SA-A y Hol y encontraron porcentajes de viabilidad muy elevados en ambos casos (97,2% y 96,8%, respectivamente). Estos datos

biológicos, además de evidenciar que todas las subpoblaciones poseen la misma compatibilidad gamética, reforzaron los resultados de los análisis filogenéticos ya que indican que las subpoblaciones SA-A y Hol se encuentran más cercanas entre sí. La causa de por qué se observa mayor flujo génico a nivel mitocondrial que a nivel nuclear es un fenómeno a discutir. Una posible explicación podría ser que el ADN mitocondrial presenta un gran número de elementos repetitivos tales como zonas ricas en AT y clusters ricos en GC que favorecen la recombinación y se relacionan con la plasticidad del genoma mitocondrial respecto del genoma nuclear (Solieri, 2010). De lo que no cabe ninguna duda es que el genoma mitocondrial evidencia intercambio de material genético en varias direcciones entre las cepas en estudio. Un caso interesante es que cepas de la subpoblación SA-B aisladas de ambientes naturales (NPCC1290, NPCC1415 y NPCC1416 de la zona de Tromen) presentaron exactamente el mismo haplotipo que un gran grupo de cepas aisladas de chicha (NPCC1317 y 1323) y sidra (NPCC1417 y NPCC1420) de la Patagonia y que correspondió también a uno de los tres haplotipo que se observaron entre las cepas de Europa, específicamente las cepas de sidra S4, S10 y S14 y la cepa CBS2986 aislada de vino en Suiza.

Si bien sería más consistente realizar el análisis de todo el genoma mitocondrial o por lo menos de varios genes, la situación observada en el *COX2* evidencia que existió contacto entre las subpoblaciones fermentativas y las de ambientes naturales, lo que refuerza aún más la teoría propuesta por Rodriguez et al., (2017). El flujo génico entre el genoma mitocondrial para estas poblaciones también pudo detectarse en los índices de diversidad nucleotídica que fueron en la mayoría de los casos más altos que en análisis de los genes nucleares, aunque la diferencia en el tamaño de la secuencia fue muchísimo menor. El test D' de Tajima fue también negativo y muy similar al observado para el genoma nuclear, indicando que hay efecto de la selección también sobre estos genes. Aunque es evidente que hubo contacto entre las poblaciones y flujo génico (a nivel del genoma mitocondrial), la baja variabilidad en la secuencia de los haplotipos más heterogéneos (es decir los que contuvieron cepas europeas y patagónicas, de diferentes ambientes) también se debe a que se analizó un solo gen mitocondrial (*COX2*), sin embargo el perfil mitocondrial (detectado por mtDNA-RFLP en el primer capítulo de esta tesis) advierte que al menos todas las cepas Patagónicas utilizadas en este trabajo poseen un genoma mitocondrial diferente, diversidad que ha fue detectada con el análisis de un único gen mitocondrial.

Dentro de los eventos de evolución reticulada que pueden observarse en el genoma mitocondrial y que constituyen la principal causa de variabilidad genética entre las poblaciones que confiere a las levaduras ventajas adaptativas rápidas al momento de adaptarse a nuevos nichos (Peris et al., 2017, 2014) se encuentran las introgresiones y los fenómenos de transferencia horizontal. Las introgresiones con otras especies han sido reportadas en varias especies de género *Saccharomyces* a nivel mitocondrial, como en *S. eubayanus* (Peris et al., 2017), *S. uvarum* (Almeida et al., 2014) y *S. cerevisiae* (Legras et al., 2018). En esta Tesis también se evidenció un evento de introgresión en tres cepas aisladas de chicha de la zona de Tirúa, se observó un fragmento correspondiente a la especie *S. cerevisiae* que podría conferir una ventaja adaptativa. Una de las cepas en donde se encontró este fragmento de *S. cerevisiae* (cepa NPCC1309) es la misma que mostró también la región del ADN genómico conteniendo el gen *MNLI* de esta misma especie, como se mencionó anteriormente. Este descubrimiento es consistente con lo observado por Peris et al., (2017) quienes reportan que existe un sitio caliente de recombinación ubicado exactamente en el mismo lugar detectado en las cepas patagónicas y que se encuentra relacionado con cluster GC típicos del genoma mitocondrial.

En resumen, en esta Tesis se pudieron evidenciar las subpoblaciones propuestas por Almeida al analizar las secuencias nucleares de las cepas de *S. uvarum* analizadas en esta Tesis. De hecho, esta es la primera vez que la existencia de estas tres subpoblaciones es soportada por el análisis de estructura poblacional y no sólo resultan de una estructuración artificial basada en la distancia geográfica. Este hecho fue producto de la incorporación de cepas asociadas a chicha y sidra en este tipo de estudios. Las cepas aisladas de ambientes naturales incluidas en la subpoblación SA-B, presentaron una gran distancia genética con el resto de las subpoblaciones, así como una estabilidad genética (observada en el modelo de dinámica poblacional *Missmatching distribution*), bajo flujo génico a nivel nuclear y un cierto flujo génico a nivel del genoma mitocondrial.

En las cepas aisladas de chicha (incluidas en las subpoblaciones SA-A y Hol) se observó una amalgama de adaptaciones relacionadas con procesos fermentativos (una baja variabilidad, introgresiones en el genoma nuclear y mitocondrial) y adaptaciones a ambientes naturales (mantenimiento de dos genotipos opuestos observado en el modelo de dinámica poblacional de tipo bimodal, flujo génico a nivel mitocondrial con cepas de la subpoblación

SA-B). Con estos resultados se podría concluir que la chicha resulta un nicho intermedio, de tipo disruptivo, donde por un lado se mantuvieron los genotipos que hoy encontramos en los ambientes más antrópicos y por otro lado los que ingresaron al ambiente natural. Probablemente las cepas de chicha hayan podido colonizar el ambiente de la sidrera (manzanas, equipos de sidrera, etcétera, propuesto como 1° contacto) o bien este ambiente pudo haber sido colonizado por cepas holárticas directamente desde Europa (2° contacto). La reducida variabilidad observada en la sidra puede estar relacionada con un efecto fundador de este grupo reducido de cepas, y actualmente la población asociada a la sidra manifiesta un comienzo de expansión poblacional que podría favorecer la selección de las cepas “más domesticadas”.

Todas estas comparaciones nos impulsaron a pensar si a nivel fenotípico se observan los mismos agrupamientos en subpoblaciones que permitan obtener respuestas sobre los posibles eventos de domesticación relacionados con estas levaduras, aspecto que será abarcado en la siguiente parte de este capítulo.

Parte II

RESULTADOS PARTE II

2. Análisis fisiológico comparado de cepas de *S. uvarum*

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera parte de este Capítulo, existen en la Patagonia cepas de *S. uvarum* que podrían ser representantes de diferentes subpoblaciones de esta especie incluyendo Sudamérica-A (SA-A), Sudamérica-B (SA-B) y Holárticas. Con el fin de poner en evidencia posibles propiedades fisiológicas que puedan ser características de cada uno de estos grupos de cepas, o bien que puedan relacionarse con el sustrato de origen o procedencia de las mismas, se procedió al estudio de la respuesta de estas cepas a diferentes factores de estrés típicos del proceso fermentativo.

2.1. Respuesta de las levaduras a la disponibilidad de nitrógeno fácilmente asimilable (FAN)

2.1.1. Ensayos en microplacas

La respuesta de las levaduras a la presencia de concentraciones crecientes de nitrógeno se realizó mediante ensayos de crecimiento en microplacas. Se evaluaron concentraciones de FAN en el rango de 20 a 300 mg/L. Los datos experimentales obtenidos por medición periódica de absorbancia de los cultivos realizados en microplacas se ajustaron al modelo de Gompertz modificado (Lambert y Pearson 2000) a fin de obtener los parámetros que describieron las diferentes cinéticas: μ_{\max} (máxima velocidad de crecimiento) y λ (duración de la fase de latencia).

Los valores obtenidos para los parámetros de crecimiento se expresaron en forma de mapas de calor. Para ello se procedió primero a estandarizar los datos en función de la media para cada condición, lo cual permitió comparar cada condición de manera más adecuada. En la Figura 2.8 se representó el mapa de color correspondiente a los dos parámetros mencionados y además realizamos un gráfico de agrupamiento utilizando el estadístico UPGMA. En el caso de los valores de μ_{\max} se observan tres grupos denominados A, B y C. El grupo A se caracterizó en términos generales por agrupar a las cepas que presentaron valores bajos de μ_{\max} en todas las condiciones, esto se puede apreciar fácilmente dado que en general predomina el color verde en este grupo. El grupo B, por el contrario, mostró en general valores mayores a la media en las diferentes condiciones y para todas las cepas

analizadas, predominando el color rojo. El grupo C correspondió en realidad a una única cepa CECT1969, cuyo comportamiento fue similar al de las cepas del grupo A (Figura 2.8.A). En el grupo B se observaron comportamientos marcados que se subdividieron en tres subgrupos: el subgrupo i y iii formado por cepas que presentaron μ_{\max} altas en las mayores concentraciones de nitrógeno y bajas en concentraciones menores, interesantemente estos subgrupos estuvieron representados por cepas europeas fermentativas y de ambientes naturales (de la subpoblación genética Holártica). Por el contrario, el subgrupo ii estuvo formado por cepas aisladas de chicha y del ambiente natural (de las subpoblaciones SA-A y SA-B) y presentó altas μ_{\max} en bajas concentraciones de nitrógeno y bajas en altas concentraciones de este nutriente. Sin embargo, en los otros grupos (A y C) no se observó para este parámetro una separación de las cepas por procedencia geográfica, sustrato de origen o subpoblación.

El mapa de calor obtenido para el parámetro λ también demostró dos grandes grupos de cepas (grupos A y B), junto con otros grupos minoritarios (grupos C, D, E y F). El grupo A, formado por 23 cepas mayormente pertenecientes a las subpoblaciones Holártica y SA-A, mostraron valores de λ más elevados que el resto en casi todas las condiciones de nitrógeno evaluadas. Por el contrario, el grupo B estuvo formado por 26 cepas de diferentes orígenes que mostraron en general valores de λ menores a las medias en las diferentes condiciones. Interesantemente, en este grupo quedaron incluidas la mayoría de las cepas de ambientes naturales de la Patagonia pertenecientes a la subpoblación SA-B. Los grupos E y F incluyeron cepas que fueron incapaces de desarrollarse en los medios con las concentraciones más bajas de nitrógeno y los grupos minoritarios C y D mostraron un comportamiento similar al del grupo A (Figura 2.8.B).

Además de los gráficos de calor que se utilizaron para agrupar las cepas en función de los valores obtenidos para sus parámetros cinéticos, se decidió contrastar específicamente tres condiciones que se relacionan con concentraciones de FAN baja (40 mg/L), intermedia o estándar (140 mg/L) y elevada (300 mg/L). En esta oportunidad se representaron los valores obtenidos para los parámetros cinéticos μ_{\max} y λ en forma de gráficos de dispersión para observar mejor los valores absolutos obtenidos para cada cepa (Figura 2.9). En este caso se ordenaron las distintas cepas de acuerdo al origen (geográfico y sustrato) y también se indicó

a qué subpoblación pertenecían de acuerdo al análisis de estructura poblacional realizado anteriormente en esta Tesis.

En cuanto a los valores de μ (Figura 2.9.A), se observó que para la mayor parte de las cepas analizadas la velocidad fue mayor en los medios con la concentración de nitrógeno más elevada (300 mg/L, puntos rojos), intermedia en la concentración de nitrógeno de 140 mg/L (puntos naranjas) y menor en las concentraciones más bajas (40 mg/L, puntos verdes). En relación a los valores de λ , esta relación no fue tan clara. La mayor parte de las cepas patagónicas -independientemente del origen- mostraron valores de λ más bajos a 40mg/L que a 300mg/L (o a lo sumo igual). Por el contrario, las cepas europeas -particularmente las aisladas de fermentaciones- presentaron valores de λ elevados a baja concentración de nitrógeno y bajos a concentraciones de nitrógeno intermedia y alta (Figura 2.9.B).

Otro comportamiento interesante que pudo apreciarse a partir de esta Figura fue que para algunas el aumento en la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo no influyó significativamente en los parámetros cinéticos evaluados, mientras que para otras la influencia fue significativa. Entre las primeras se podrían incluir las cepas patagónicas, cuyos valores de ambos parámetros cinéticos μ_{\max} y λ a diferentes concentraciones de nitrógeno fueron similares. Para las cepas europeas aisladas de ambientes naturales, este efecto se observó únicamente para el parámetro cinético λ . Por el contrario, las cepas europeas aisladas de ambientes fermentativos mejoran significativamente su performance (aumenta la μ_{\max} y disminuye la λ) a medida que aumenta la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, con excepción de las cepas aisladas de sidra en Irlanda y de mosto en Eslovenia (S04, S10,S14,S20, ZIM212, ZIM2113) quienes presentaron un comportamiento similar al observado en los ambientes naturales de la Patagonia, es decir valores de *lag* inferiores a la media en las tres concentraciones evaluadas.

2.1.2. Ensayos de competencia

En base a los resultados obtenidos en cuanto al requerimiento de nitrógeno de las diferentes cepas y su posible relación con el origen de las mismas, se decidió evaluar el comportamiento de algunas de estas cepas en ensayos de competencia en medios con diferente concentración de nitrógeno. Se seleccionó por un lado una cepa europea aislada de fermentaciones (CECT12600), perteneciente a la subpoblación Holártica de ambientes fermentativos (con elevados valores de μ_{\max} y bajos valores de λ en diferentes concentraciones de nitrógeno). Por otra parte, se agregaron a la competencia dos cepas patagónicas que también presentaron buen comportamiento sobre todo a bajas concentraciones de nitrógeno: cepas NPCC1298 y NPCC1414, ambas de ambientes naturales pero pertenecientes a las subpoblaciones SA-B y SA-A, respectivamente, de acuerdo al análisis de estructura poblacional.

Las competencias entre las tres levaduras se realizaron en mosto sintético con las condiciones de nitrógeno más contrastantes (40 y 300 mg/L) y al finalizar el crecimiento se aislaron las levaduras en medio GPY-A y se tomaron 20 colonias al azar para evaluar la cantidad de cada una de las cepas mediante análisis de mtDNA-RFLP. En la Figura 2.10.A se representan los perfiles mitocondriales de cada una de las tres cepas inoculadas.

Al finalizar los ensayos realizados en medio conteniendo baja concentración de nitrógeno (40 mg/L FAN), se pudieron recuperar las tres cepas inoculadas, aunque en diferentes porcentajes. La cepa Holártica CECT12600 representó únicamente el 15% de las colonias aisladas, mientras que las cepas patagónicas representaron el 85% restante. De este 85%, la cepa NPCC1298 representante de la subpoblación SA-B (asociada a ambientes naturales únicamente y más distanciada filogenéticamente del resto) representó el 35% de las colonias y la cepa NPCC1414 representó el restante 50% (Figura 2.10.B).

Por el contrario, al analizar la condición de mayor concentración de nitrógeno (300 mg/L FAN), dominó la cepa Holártica CECT12600 con una implantación de 60%, seguida de la cepa de la subpoblación SA-A con un porcentaje de implantación de 40%. En esta condición ninguna colonia correspondió a la cepa de la NPCC1298 (Figura 2.10.C).

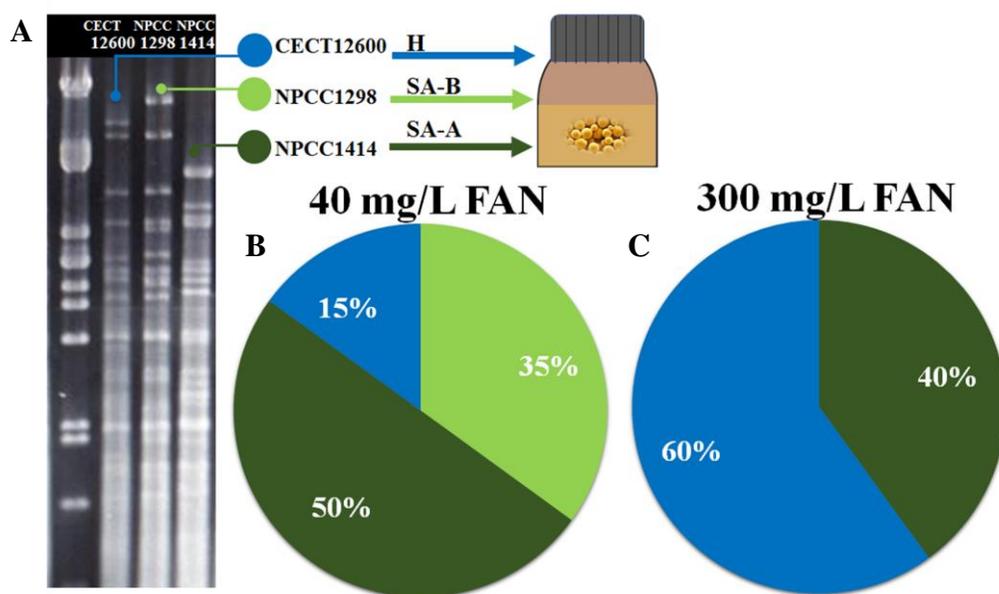


Figura 2.10. Competencia entre tres cepas de *S. uvarum* para dos condiciones de nitrógeno (40 y 300mg/L). A: Perfil mitocondrial de las cepas inoculadas en las fermentaciones con mosto sintético MS300. B y C: Los gráficos de torta representan el porcentaje de implantación en la condición 40 mg/L y 300 mg/L respectivamente, calculado a partir de 20 perfiles mtDNA-RFLP de colonias tomadas en el estadio final de fermentación por duplicado.

2.2. Respuesta de las levaduras a la temperatura

2.2.1. Ensayos en microplacas

Existen múltiples estudios que reportan a la especie *S. uvarum* como una levadura criotolerante comparada con la especie *S. cerevisiae*; sin embargo, poco se conoce sobre este aspecto en diferentes cepas de *S. uvarum*. En esta parte de la Tesis se evaluó la respuesta a la temperatura de las diferentes poblaciones de *S. uvarum*. El estudio se realizó en microplacas utilizando medio de cultivo YNB y la cinética de las fermentaciones realizadas a seis temperaturas diferentes (8, 13, 20, 25, 30 y 37°C) se evaluó mediante seguimiento de la DO630. Tal como se procedió para evaluar la respuesta a concentraciones crecientes de nitrógeno, se ajustaron las curvas obtenidas en las diferentes condiciones al modelo de Gompertz modificado y se obtuvieron los parámetros cinéticos μ_{\max} y λ . En las dos condiciones más extremas; 8°C y 37°C no se observó crecimiento luego de seis días de incubación.

Nuevamente los valores obtenidos para los dos parámetros, estandarizados para cada condición de temperatura, se representaron en forma mapas de calor (Figura 2.11). En cuanto

a la velocidad de crecimiento se observa claramente es que en general no hay diferencia significativa en el crecimiento a 20°C y 25°C, mientras que a las temperaturas más extremas de 13°C y 30°C se observan valores opuestos. Además, las cepas tuvieron un comportamiento variado e independiente de su procedencia geográfica y sustrato de origen. Las cepas del grupo A (en el análisis UPGMA) se caracterizaron por presentar valores de μ_{\max} superiores a la media a 25 y 30°C, las del grupo B por presentar valores más elevados de velocidad de crecimiento a 13°C y las del grupo C presentaron valores mayores que la media a 30°C (Figura 2.11.A).

En cuanto a la fase de latencia (λ), se observaron también tres grupos bien diferenciados y asociados parcialmente por el origen de las cepas. Los grupos A y B -formados mayormente por cepas patagónicas (aisladas de chicha y de ambientes naturales) y algunas cepas europeas de ambientes naturales- se caracterizaron por presentar valores de λ más elevados a 13°C en relación a las demás y más bajos que las demás en el resto de las temperaturas ensayadas (Figura 2.11.B). Por último, el grupo C estuvo formado principalmente por cepas fermentativas europeas y por todas las cepas aisladas de sidra en la Patagonia; este grupo presentó el comportamiento inverso a los otros, presentado fases de latencia más cortas a 13°C en relación al resto y más largas en el resto de las condiciones (20°C, 25°C y 30°C). Todas las cepas del grupo C corresponden a la subpoblación Holártica, excepto las cepas NPCC1415 y 1416, aisladas de ambientes naturales de la Patagonia, que corresponden a la subpoblación SA-B (Figura 2.11.B).

De la misma manera que se hizo para el caso del nitrógeno, se procedió a realizar los diagramas de dispersión con los valores absolutos obtenidos para cada cepa y cada parámetro cinético evaluado (Figura 2.12). En este caso, los puntos celestes representaron el valor del parámetro obtenido a 13°C, los puntos naranjas a los obtenidos a 20°C y los rojos a 30°C. No se agregaron los valores a 25°C ya que, como se mencionó previamente, resultaron muy similares a los obtenidos a 20°C. Analizando los datos a nivel global se observó que en la mayoría de los casos (salvo algunas excepciones) el mejor comportamiento cinético (valores más elevados de μ_{\max} y más bajos de λ) se observó a 30°C (Figura 2.12).

En lo que respecta al parámetro μ_{\max} , no se observó un comportamiento particular que pueda relacionarse al origen de las cepas, ya que todos los puntos se ubicaron alrededor de las líneas que marcan los valores medios obtenidos a cada temperatura (Figura 2.12.A). No

obstante, y en concordancia con lo observado en el análisis de los mapas de calor (Figura 2.12.B), se evidenció una tendencia en los valores de λ . Para este parámetro se observó que las cepas aisladas de ambientes naturales y chicha de la Patagonia (mayormente incluidas en las subpoblaciones SA-A y SA-B), presentaron todos valores menores a la media tanto a 20°C como a 30°C. Por el contrario, las cepas aisladas de sidra de la Patagonia y las cepas fermentativas europeas (todas cepas Holárticas de acuerdo al análisis de estructura poblacional) presentaron valores de λ por encima de las medias a esas mismas temperaturas (Figura 2.12.B). Las únicas excepciones fueron las cepas S4 y S10 aisladas de sidras irlandesas y la cepa CECT1189 aislada de cerveza en Inglaterra, cuyos valores de λ fueron menores a 13°C que a 30°C (Figura 2.12.B).

2.2.1. Ensayos de competencia

Para el ensayo de competencia a diferente temperatura se seleccionaron las mismas cepas que se seleccionaron por los requerimientos de nitrógeno: una cepa europea aisladas de fermentaciones y perteneciente a la subpoblación Holártica (CECT12600) y dos cepas patagónicas aisladas de ambientes naturales NPCC1289 (perteneciente a la subpoblación SA-B) y NPCC1414 (perteneciente a la subpoblación SA-A). Las competencias se realizaron nuevamente en las condiciones extremas (13°C y 30°C) utilizando el mismo sustrato (YNB) usado en los ensayos en microplacas. Al finalizar el ensayo se compararon los porcentajes de implantación de las cepas en base a los perfiles de mtDNA-RFLP tal como se describió previamente. Como resultado de este análisis se observó que a 30°C las tres cepas se recuperaron en cantidades similares al finalizar el ensayo con una leve mayor implantación de la cepa NPCC1414, mientras que a 13°C predominó la cepa Holártica aislada de ambiente fermentativo CECT12600 (54% del total de aislamientos, Figura 2.13).

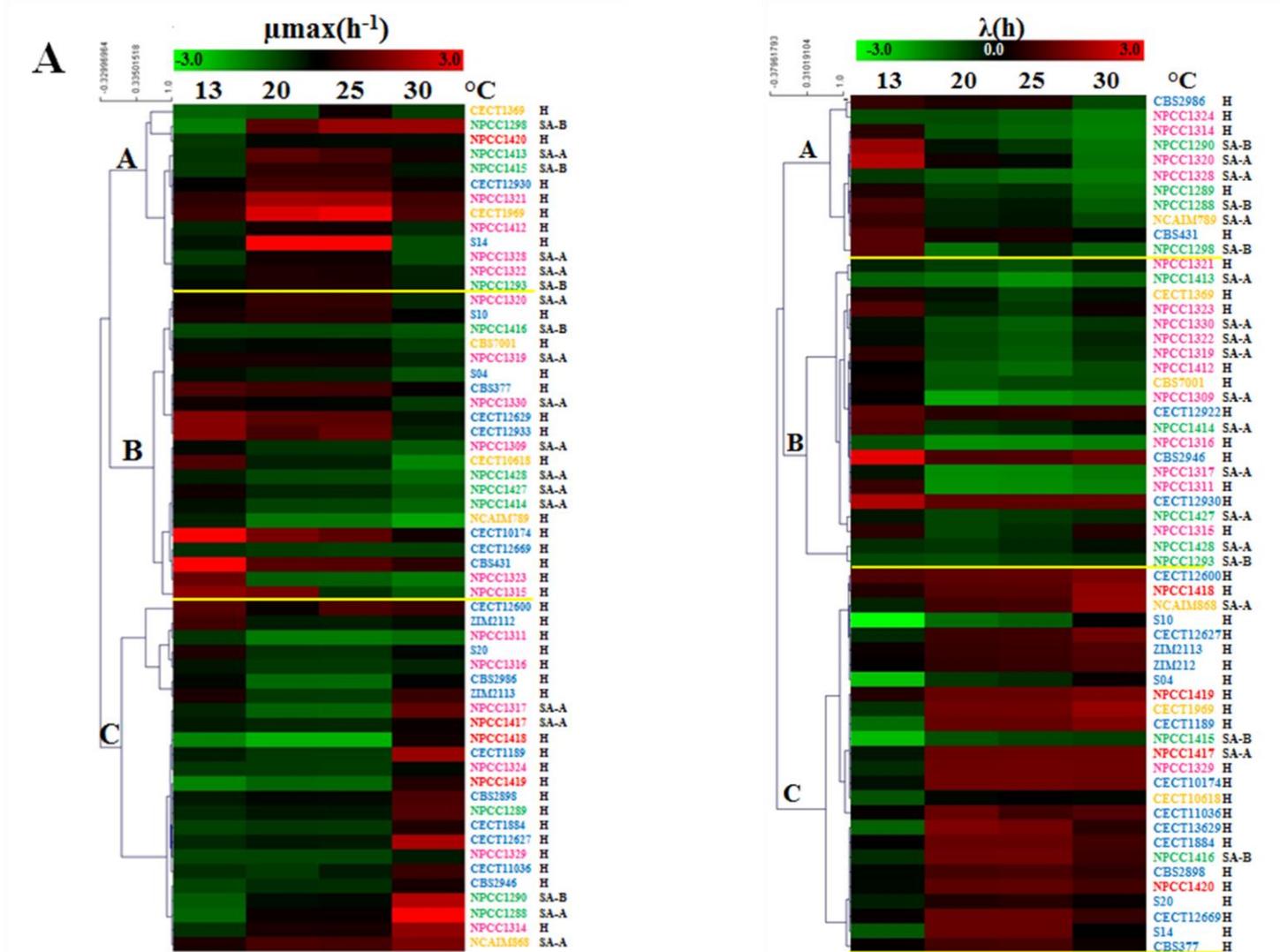


Figura 2.11: Representación mediante mapa de calor de los parámetros de crecimiento: velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y fase lag (λ) de las 58 cepas analizadas en diferentes Temperaturas. A: valores estandarizados de μ_{max} . B: valores estandarizados de λ . Cada línea corresponde a una cepa y cada columna a un valor de temperatura (se indica en la columna superior). La barra de color superior indica los valores de μ_{max} y λ estandarizados que van de -3.0 a 3.0. Valores negativos (verde) indican una velocidad de crecimiento y fase lag menor a la media. Mientras que valores positivos (en rojo) indican una μ y λ mayor a la media. En el lado izquierdo se muestra un agrupamiento jerárquico UPGMA y las letras en los círculos A, B y C indican los grupos generados en este análisis. Las cepas se diferenciaron por color según el origen: Azul cepas europeas aisladas de ambiente fermentativos; Naranja cepas europeas aisladas de ambientes naturales; Verde cepas Patagónicas aisladas de ambientes naturales; Fucsia cepas Patagónicas aisladas de Chicha y Rojo cepas Patagónicas aisladas de Sidras. H, SA-A y SA-B hace referencia a la subpoblación genómica a la que pertenece cada cepa; holártica, Sudamérica A y Sudamérica B respectivamente.

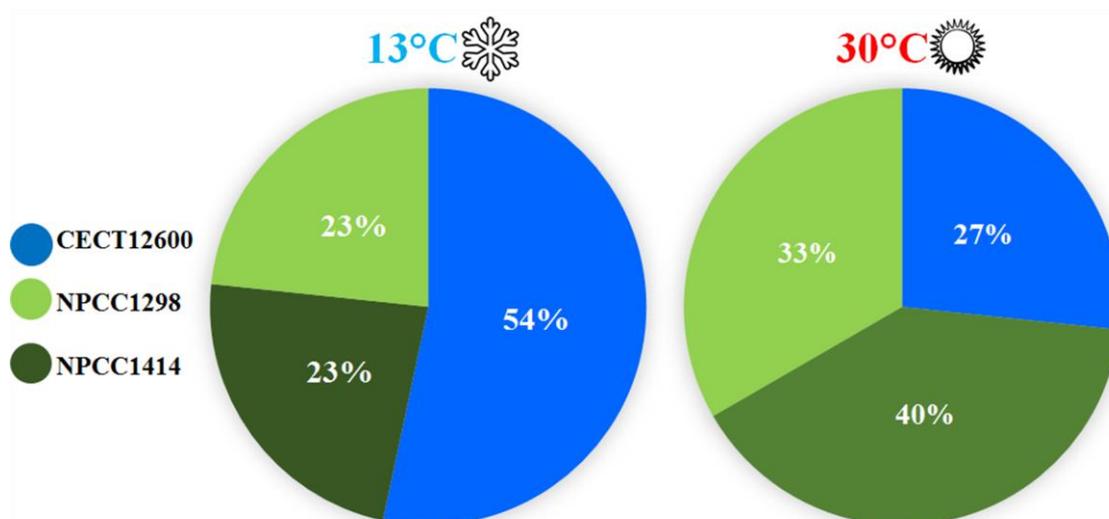


Figura 2.13. Competencia en medio YNB entre tres cepas de *S. uvarum* para dos condiciones de temperatura 13°C y 30°C indicados como porcentaje de implantación calculado a partir de 20 perfiles mtDNA-RFLP de colonias tomadas en el estadio final de fermentación por duplicado.

2.3. Respuesta de las levaduras al etanol

2.3.1. Ensayos en microplacas

Se evaluó posteriormente la respuesta de todas las cepas al etanol. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos (200µL) en medio YNB adicionado con concentraciones de etanol entre 0% y 8% v/v. Las curvas de crecimiento se ajustaron al modelo de Gompertz modificado, se calcularon los parámetros de crecimiento y estos datos estandarizados se representaron en un mapa de calor (Figura 2.14).

Nuevamente los mapas de calor se realizaron primero para los valores estandarizados de μ_{\max} (Figura 2.14.A) y posteriormente para los valores estandarizados de λ (Figura 2.14.B). Con respecto a los valores de μ_{\max} , se formaron tres grandes grupos que contuvieron a la mayor parte de las cepas analizadas (A-C) y dos grupos minoritarios (D-E). El grupo A presentó valores de μ_{\max} elevados en la mayoría de las condiciones ensayadas; este grupo estuvo conformado por cepas de diferente origen e incluidas en distintas subpoblaciones de acuerdo al análisis de estructura poblacional. El grupo B, formado mayormente por cepas patagónicas y sobre todo aquellas aisladas de ambientes naturales, mostró valores de μ_{\max} elevados hasta niveles de etanol de 5% v/v, mientras que para las concentraciones superiores la velocidad fue menor. El grupo C, por otra parte, presentó valores de este parámetro

inferiores a la media para todas las condiciones. Esto puede observarse en la Figura 2.14.A como una gran zona verde, que correspondió sobre todo a cepas Holárticas. El grupo D estuvo formado sólo por la cepa NPCC1323 aislada de chicha, con velocidades de crecimiento bajas a concentraciones de etanol bajas y velocidades más elevadas a 5, 7 y 8% etanol. Por último, el grupo minoritario E (cepas NPCC1309, NPCC1314 y CECT1369) presentó características similares al grupo C, evidenciando una velocidad de crecimiento baja en todas las concentraciones de etanol evaluadas (Figura 2.14.A).

Nuevamente, los valores obtenidos para el parámetro λ fueron más explicativos que los obtenidos para μ_{\max} . El mapa de calor generado con estos valores estandarizados generó cuatro grupos (Figura 2.14.B). Los grupos A y C, formados casi exclusivamente por cepas patagónicas aisladas de diversos sustratos (incluyendo todas las de ambientes naturales pertenecientes a la subpoblación SA-B) se caracterizaron por presentar valores de λ elevados en todas las condiciones. Por el contrario, el grupo B, representado mayormente por cepas patagónicas y europeas incluidas en la subpoblación Holártica, mostraron valores de λ bajos en todas las condiciones. El grupo D, también compuesto casi exclusivamente por cepas Holárticas, mostró valores cercanos a la media para cada condición. Finalmente, el grupo E sólo conformado por la cepa NPCC1428, también presentó valores variables y cercanos a la media (Figura 2.14.B).

De igual manera que se procedió para los factores de estrés mencionados previamente, se realizó un diagrama de dispersión comparativo entre las concentraciones de etanol más contrastantes (0 y 8% v/v). El diagrama se realizó individualmente para cada uno de los dos parámetros analizados y utilizando los valores no estandarizados, por lo que pueden apreciarse los datos reales (Figura 2.15). Con este análisis se observó que, en términos generales, y como era de esperarse, la velocidad de crecimiento de las diferentes cepas siempre fue mayor en la condición sin etanol, mientras que las fases de latencia siempre fueron menores, demostrándose que el etanol representa una condición de estrés para la levadura.

No se observó un comportamiento diferencial por origen al analizar el parámetro velocidad de crecimiento, aunque sí se pudo apreciar a partir de esta Figura que las cepas aisladas de ambientes naturales de la Patagonia mostraron valores superiores a la media (línea continua) en ausencia de etanol (Figura 2.15.A).

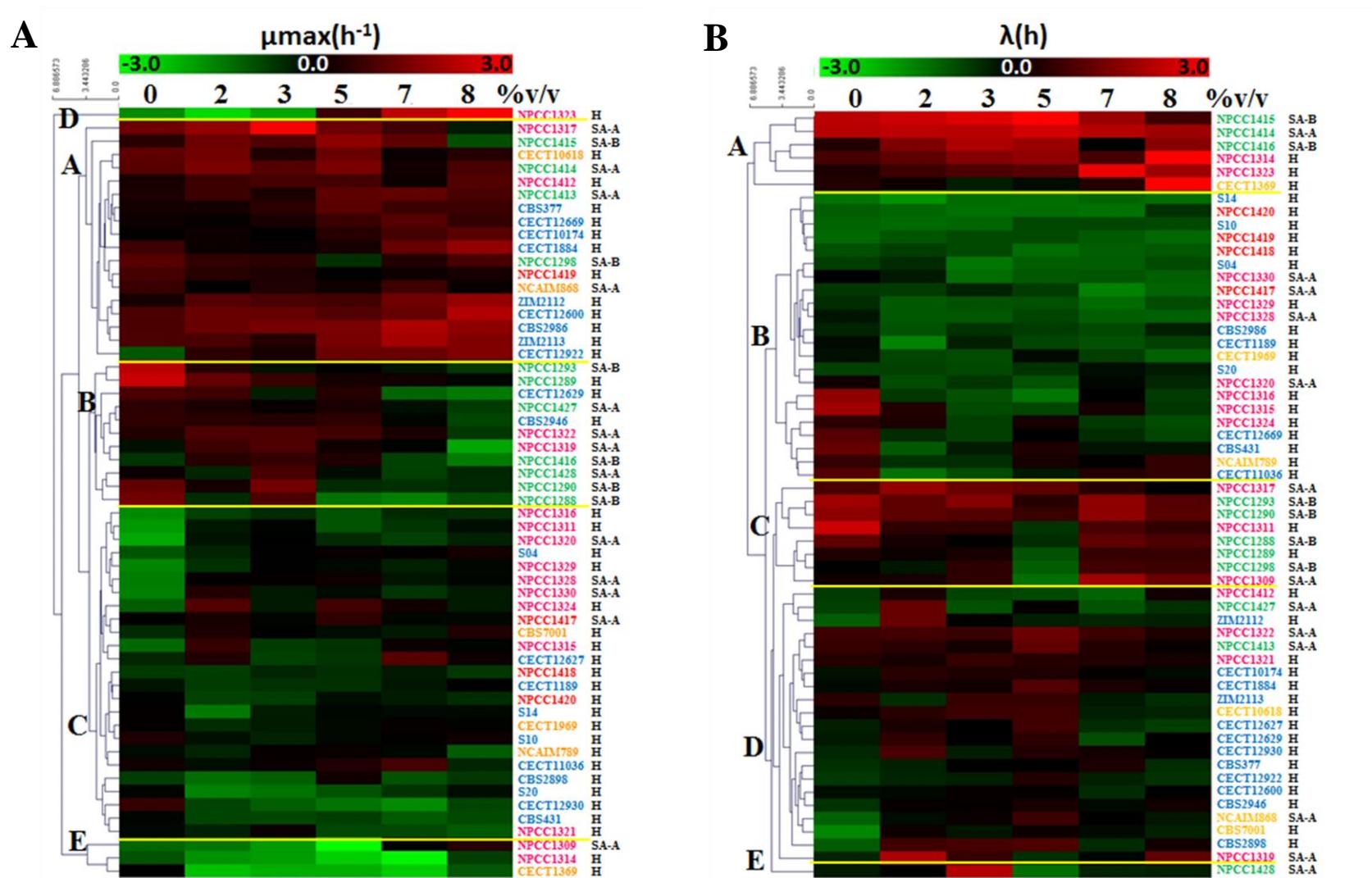


Figura 2.14: Representación mediante mapa de calor de los parámetros de crecimiento: velocidad máxima de crecimiento μ_{max} y fase lag λ de las cepas analizadas a concentraciones crecientes de etanol (% v/v). Cada línea corresponde a una cepa y cada columna a una concentración determinada (indicada en la columna superior). La barra de color superior indica los valores de μ_{max} (A) y λ estandarizados (B) que van de -3.0 a 3.0. Valores negativos (verde) indican una velocidad de crecimiento y fase lag menor a la media. Mientras que valores positivos (en rojo) indican una μ_{max} y λ mayor a la media. En el lado izquierdo se muestra un agrupamiento jerárquico UPGMA y las letras en el árbol A-E indican los grupos generados en este análisis. En la columna derecha se encuentran las 58 cepas analizadas diferenciadas por color según el origen: Azul cepas europeas aisladas de ambiente fermentativos; Naranja cepas europeas aisladas de ambientes naturales; Verde cepas Patagónicas aisladas de ambientes naturales; Fucsia cepas Patagónicas aisladas de Chicha y Rojo cepas Patagónicas aisladas de Sidras. H, SA-A y SA-B hace referencia a la subpoblación genómica a la que pertenece cada cepa; holártica, Sudamérica A y Sudamérica B respectivamente.

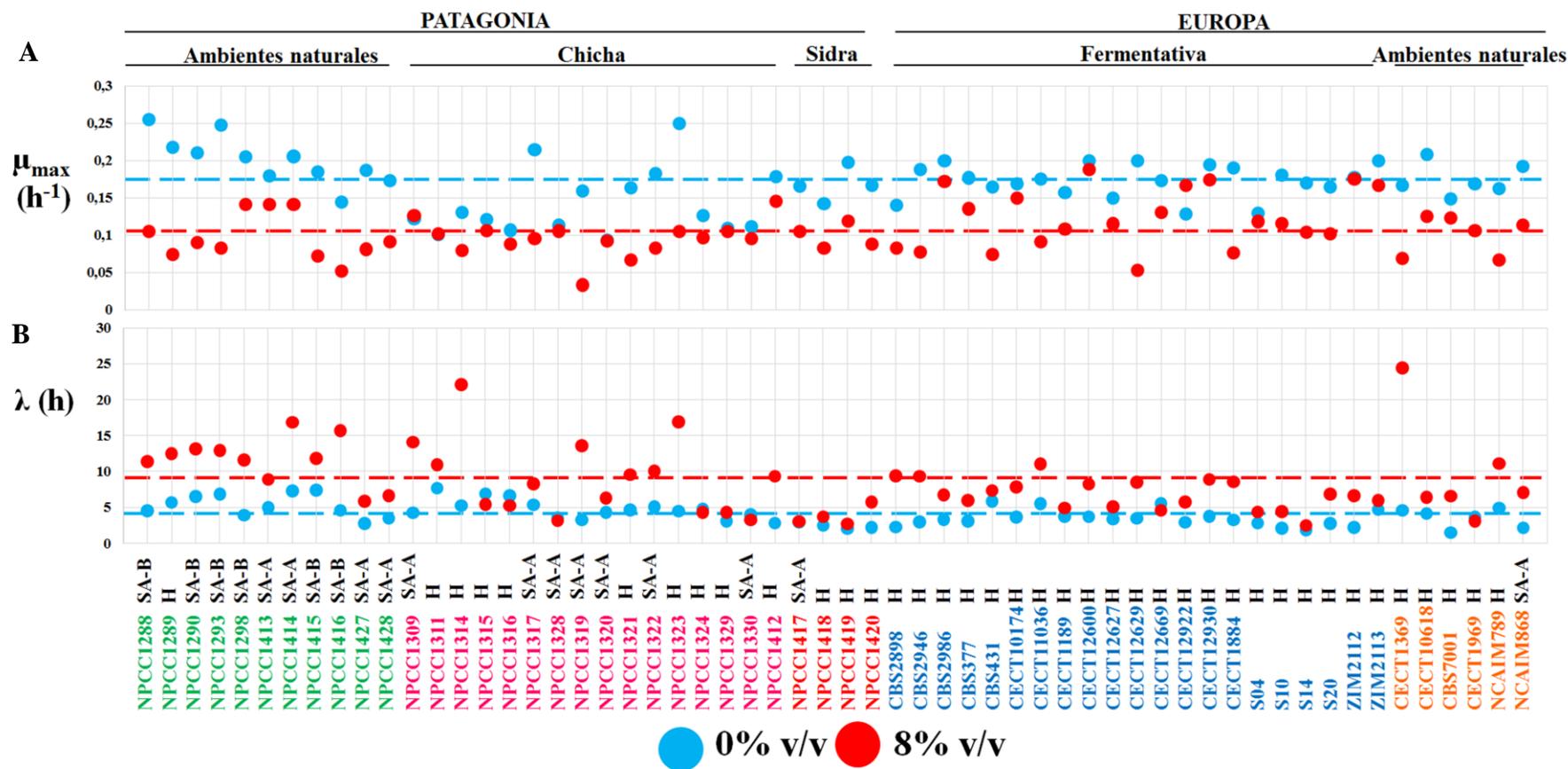


Figura 2.15: Gráfico de dispersión de los parámetros cinéticos modelados. A: velocidad de crecimiento μ_{\max} (h^{-1}). B: fase lag λ (h). Líneas celestes y rojas representan el valor medio (para todas las cepas) del parámetro correspondiente en la condición 0% y 8% v/v respectivamente. Las 58 cepas analizadas se diferenciaron por color según el origen: Azul cepas europeas aisladas de ambiente fermentativos; Naranja cepas europeas aisladas de ambientes naturales; Verde cepas Patagónicas aisladas de ambientes naturales; Fucsia cepas Patagónicas aisladas de Chicha y Rojo cepas Patagónicas aisladas de Sidras. H, SA-A y SA-B hace referencia a la subpoblación genómica a la que pertenece cada cepa; holártica, Sudamérica A y Sudamérica B respectivamente.

Con respecto a la fase de latencia (λ), se volvió a observar una mayor relación con el origen de las cepas. Las cepas aisladas de ambientes naturales en la Patagonia y la mayor parte de las cepas de chichas de la misma procedencia geográfica presentaron un tiempo de latencia mayor en ambas condiciones. Por otro lado, las cepas patagónicas aisladas de sidra y las cepas europeas (de ambos orígenes) presentaron tiempos de latencia inferiores a la media en ambas condiciones (Figura 2.15.B).

2.3.2. Ensayos de competencias

En función de los resultados obtenidos previamente, y con fines comparativos, se seleccionaron las mismas cepas utilizadas en las competencias anteriores. Los ensayos se realizaron de manera similar a los llevados a cabo para los factores de estrés evaluados anteriormente, pero utilizado una condición con 0% v/v de etanol y la contrastante con 8% v/v de etanol.

Al finalizar el ensayo de competencia en ausencia de etanol, las tres cepas fueron detectadas en similar proporción. Contrariamente, en el ensayo con 8% v/v de etanol, se observó una implantación del 55% de la cepa Holártica CECT12600, mientras que las dos cepas patagónicas NPCC1414 y NPCC1298 (subpoblaciones SA-A y SA-B, respectivamente) se detectaron en porcentajes minoritarios: 25 y 20% respectivamente (Figura 2.16).

2.4. Respuesta de levaduras al SO₂

2.4.1. Ensayos en placa

El último factor de estrés analizado para las 58 cepas de *S. uvarum* fue la tolerancia al sulfito (dióxido de azufre molecular SO₂). Para ello se realizó un ensayo en medio sólido con 8 condiciones crecientes de Metabisulfito de Sodio (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4mM) en placas con medios YEDP-TA que fueron inoculadas con diluciones seriadas de las cepas a analizar. Se registró la capacidad de crecer en las placas con las distintas concentraciones de SO₂ y la dilución hasta la cual se observó crecimiento (Tabla 2.7).

A partir de este análisis se observó que la mayor tolerancia al SO₂ fue exhibida por seis cepas Holárticas aisladas de ambientes fermentativos: cepas CECT12627, ZIM2113, CECT12600, CECT12922, CECT1884 y CECT12930. Las tres primeras fueron incluso

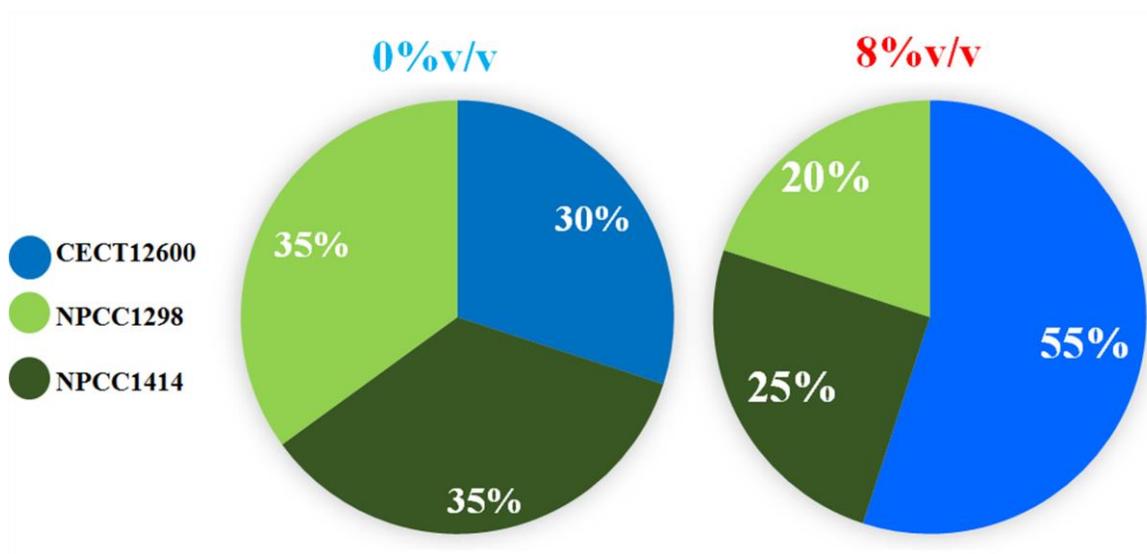


Figura 2.16. Competencia entre tres cepas de *S. uvarum* en presencia de etanol. Porcentaje de implantación calculado a partir de 20 perfiles mtDNA-RFLP de colonias tomadas en el estadio final de fermentación por duplicado para la condición 0% y 8% respectivamente.

capaces de crecer en medios conteniendo la máxima cantidad de metabisulfito de sodio evaluada (4 mM). A este grupo altamente tolerante, le siguen otras nueve cepas con tolerancia intermedia (entre 1,5 y 2,5mM de Metabisulfito de Sodio), también todas incluidas en la subpoblación Holártica de acuerdo al análisis de estructura poblacional realizado en esta Tesis. Interesantemente, este grupo de tolerancia intermedia incluyó las cepas de ambientes fermentativos CECT12629, CECT12638 y CECT12669, las cepas de ambientes naturales CECT1969 y CBS7001, las cepas aisladas específicamente de sidras irlandesas S4, S10 y S20 y las cepas aisladas de sidras patagónicas NPCC1417, NPCC1418, NPCC1419 y NPCC1420. Las cepas aisladas de ambientes naturales y de chichas de la Patagonia (subpoblaciones SA-A y SA-B y un pequeño grupo de Holárticas) presentaron una resistencia baja (entre 0,5 y 1mM), mientras que las aisladas de ambientes naturales de Europa (Holárticas) mostraron un comportamiento más heterogéneo, presentando algunas, resistencia intermedia, mientras que otras, baja.

En la Figura 2.17 se muestra a modo ilustrativo el crecimiento en placas de seis cepas representativas, dos con alta resistencia (CECT12627 y ZIM2113), dos con resistencia intermedia (S20 y CECT1969) y dos con baja resistencia (CBS431 y NPCC1323).

Tabla 2.7: Resistencia al SO₂ de diferentes cepas de *S. uvarum*

Pob	Cepas	Concentración de Na ₂ S ₂ O ₅ (mM)									
		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	
H	CECT12627	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	ZIM2113	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	CECT12600	6	6	6	6	6	3	2	1	1	
H	CECT12922	6	6	6	6	6	6	5	5	-	
H	CETC1884	6	6	6	6	6	6	6	5	-	
H	CECT12930	6	6	6	6	6	6	6	4	-	
H	NPCC1418	6	6	6	6	3	2	-	-	-	
H	NPCC1419	6	6	6	6	2	1	-	-	-	
H	S04	6	6	6	6	6	-	-	-	-	
H	NPCC1420	6	6	6	6	5	-	-	-	-	
H	CECT12629	6	6	6	6	4	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1417	6	6	6	6	4	-	-	-	-	
H	CECT12638	6	6	6	6	4	-	-	-	-	
H	CETC1969	6	6	6	3	3	-	-	-	-	
H	S10	6	6	6	6	3	-	-	-	-	
H	S20	6	6	6	3	3	-	-	-	-	
H	CECT12669	6	6	6	6	2	-	-	-	-	
H	CBS7001	6	6	6	6	1	-	-	-	-	
H	CECT10174	6	6	6	5	-	-	-	-	-	
H	CBS2986	6	6	6	4	-	-	-	-	-	
H	CBS2898	6	6	6	4	-	-	-	-	-	
H	CBS377	6	6	6	4	-	-	-	-	-	
H	CECT11036	6	6	6	4	-	-	-	-	-	
H	ZIM2122	6	6	6	1	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1298	6	6	6	1	-	-	-	-	-	
H	CECT10618	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NCAIM789	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NCAIM868	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	S14	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	CECT1189	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	CBS431	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1309	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1311	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1314	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1315	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1317	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1321	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1322	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1323	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1324	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1329	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1330	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1293	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1290	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1413	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1414	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1416	6	6	6	-	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1415	6	6	4	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1412	6	6	3	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1289	6	6	3	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1323	6	5	2	-	-	-	-	-	-	
H	NPCC1316	6	6	2	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1328	6	6	-	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1319	6	6	-	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1320	6	6	-	-	-	-	-	-	-	
SA-B	NPCC1288	6	6	-	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1427	6	5	-	-	-	-	-	-	-	
SA-A	NPCC1428	6	4	-	-	-	-	-	-	-	

Los números representan la dilución hasta la que crecieron los inóculos de cada cepa. En azul y naranja cepas europeas de ambiente fermentativo y natural respectivamente, en rojo, rosa y verde cepas patagónicas de sidra, chicha y ambiente natural. H: Holártica; SA-A y SA-B: Sudamérica A y B.

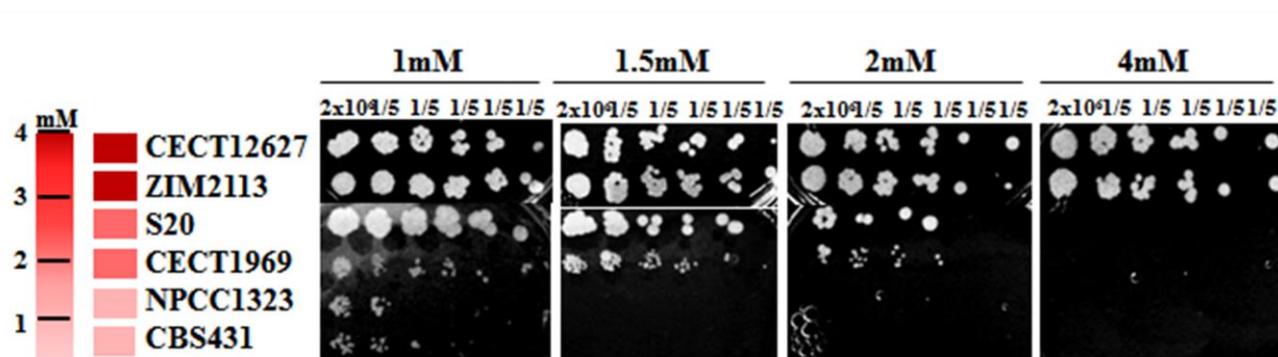


Figura 2.17: Resistencia al Metabisulfito de Sodio de seis cepas de *S. uvarum* en medio YEDP-TA ensayo por goteo. Los recuadros a la izquierda de cada cepa representan la concentración que resisten las cepas.

2.4.2. Ensayos de competencia

Se realizaron los ensayos de competencia utilizando las mismas cepas seleccionadas para los ensayos anteriores y las concentraciones extremas de Metabisulfito de Sodio (0 mM y 4 mM). Este ensayo evidenció que el 100% de las cepas detectadas en el medio con la máxima concentración correspondió a la cepa Holártica CECT12600, mientras que en ausencia de este compuesto se detectaron las tres cepas (CECT12600, NPCC1414 y NPCC1298) en porcentajes similares (Figura 2.18).

2.4.3. Análisis genómico

Debido al fuerte efecto selectivo demostrado por el SO_2 en los ensayos previos, se profundizó el estudio del efecto de este factor de estrés en cepas de diferente origen. En este caso y a fin de detectar posibles cambios en el genoma que pudieran explicar estas diferencias observadas a nivel fenotípico se seleccionaron cepas para las cuales se dispusiera de los genomas completos y anotados. Se seleccionaron tres cepas representativas, una europea fermentativa (subpoblación Holártica) con alta resistencia al sulfito (cepa CECT12600) y dos cepas patagónicas con resistencia baja: una aislada de ambientes naturales (NPCC1290) y una de chicha (NPCC1314). Con fines comparativos se utilizó la secuencia de la cepa de referencia CBS7001 (Scannell et al., 2011).

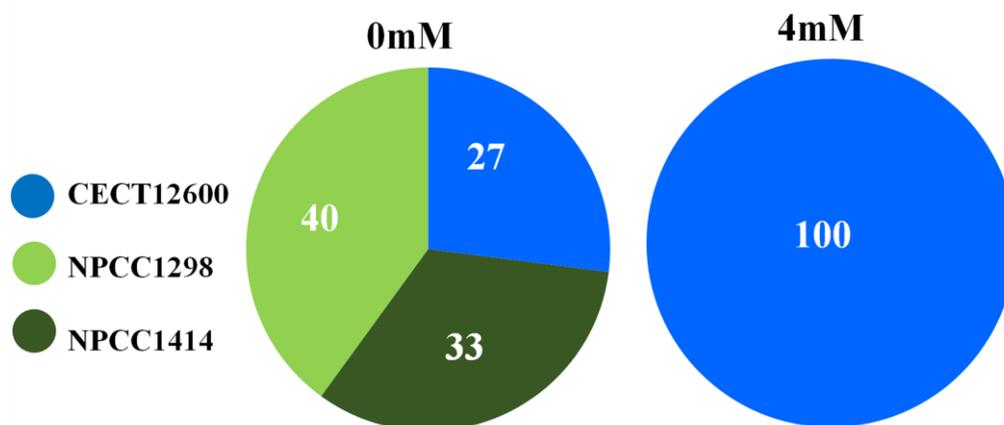


Figura 2.18. Competencia entre tres cepas de *S. uvarum* en presencia de metabisulfito de sodio (en mM). Porcentaje de implantación calculado a partir de 20 perfiles mtDNA-RFLP de colonias tomadas en el estadio final de fermentación por duplicado para la condición sin sulfito y con 4mM del mismo.

En primera instancia se realizó una búsqueda del gen *SSU1*, que codifica para el transportador de sulfito, en los genomas completos.

Al comparar los genomas con el de la cepa de referencia CBS7001 se localizó una traslocación recíproca entre el cromosoma XVI y el VII, que involucra al gen *SSU1* y a su promotor *FZFI* en la cepa europea CECT12600, mientras que las dos cepas patagónicas evaluadas no se observó esta traslocación.

En la Figura 2.19.A se representaron los 16 cromosomas alineados de la cepa CECT12600 y de la cepa de referencia CBS7001. En la misma, se indicó el sitio donde se encuentra la traslocación entre los cromosomas VII y XVI. Además, en la Figura 2.19.B se realizó una representación esquemática de estos dos cromosomas y los sitios donde se localizó la traslocación en la cepa europea CECT12600 y del genotipo *wild type* (sin la traslocación) que presentaron la cepa europea de ambiente natural CBS7001 y las cepas patagónicas de ambiente natural NPCC1290 y de chicha NPCC1314.

Debido a este hallazgo resultó interesante evaluar si la traslocación estaba presente además en otras cepas de *S. uvarum*. Para ello, y en base a las secuencias completas disponibles, se diseñaron cuatro cebadores que incluyeron el sitio donde se localizó la traslocación para los dos cromosomas, los cuales fueron identificados como XVI-F (GCTGGCTAAACGCGTGAT), XV-R (ACTCGTGTGACTGGGGTC), VII-F (GTGACGTAAACGACTTTTGCGC) y VII-R (GAACGTCCATTGCGTACGAG). Estos

cebadores fueron utilizados para amplificar por PCR la región de interés en las 58 cepas de estudio, con la siguiente combinación: XVI-F/XVI-R y VII-F/VII-R representando la condición *wild-type* y XVI-F/VII-R y XVI-R/VII-F representando la condición traslocada. El sitio de localización de los cebadores se representó esquemáticamente en la Figura 2.20.A. La amplificación fue exitosa con los cebadores diseñados y se observaron cepas con y sin translocación. En la Figura 2.20.B se pueden observar los amplicones obtenidos para dos cepas que tienen la traslocación (CECT12627 y CECT12600) y dos que no la tienen (NPCC1290 y NPCC1314) mencionada como genotipo *wild type*. Las primeras amplificaron en la combinación XVI-F/VII-R y XVI-R/VII-F y las segundas en la combinación VII-F/VII-R y XVI-F/XVI-R.

De todas las cepas analizadas se pudo detectar la misma traslocación en 10 cepas (CECT12600, CECT12627, CECT12922, CECT12930, CECT1884, CECT12629 Y ZIM 2113), todas ellas aisladas de ambientes fermentativos. Tres de ellas (NPCC1417, NPCC1418, NPCC1419) fueron aisladas de sidra en la Patagonia, las demás fueron cepas europeas aisladas de diferentes bebidas fermentadas. Además, todas pertenecieron a la subpoblación Holártica con la excepción de la cepa NPCC1417 que pertenece a la subpoblación SA-A. Interesantemente, las cepas que presentaron la traslocación fueron las que mayor resistencia al Metabisulfito de Sodio tuvieron, soportando concentraciones desde 2 mM a 4 mM de este compuesto. La cepa con la recombinación que presentó la menor resistencia fue la cepa CECT12629. Sin embargo, esta cepa mostró una condición heterocigota, presentando la traslocación en un cromosoma y no en su homólogo. Esto se detectó debido a que hubo amplificación en las cuatro combinaciones de cebadores mencionadas previamente.

Por último, en la Figura 2.21 se resume, utilizando el árbol filogenético obtenido con los siete genes nucleares evaluados en la primera parte de este Capítulo, la información en forma de mapa de calor sobre la resistencia al Metabisulfito de Sodio de cada una de las cepas y las cepas que poseen la traslocación entre el cromosoma XVI y el VII.

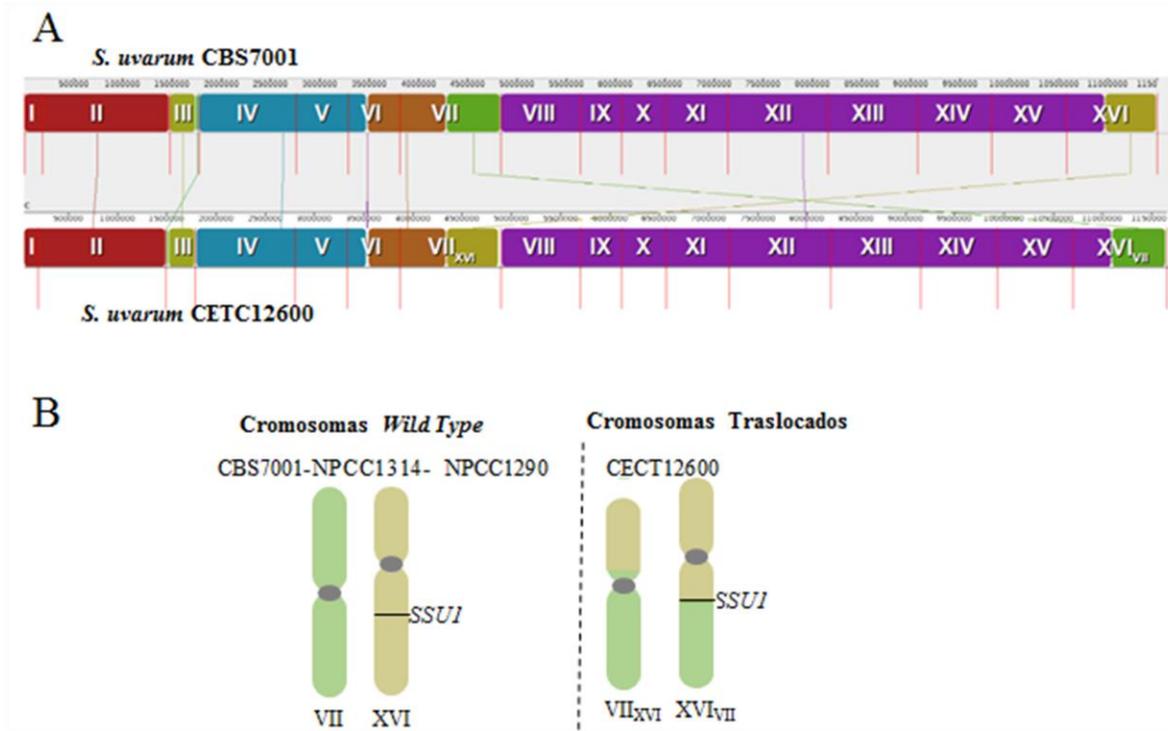


Figura 2.19. **A:** Alineamiento entre la cepa de referencia CBS7001 con la cepa traslocada CECT12600 donde se observa el sitio donde ocurre la traslocación. **B:** Representación esquemática de la traslocación encontrada entre el cromosoma XVI y el VII que involucra al gen *SSUI*.

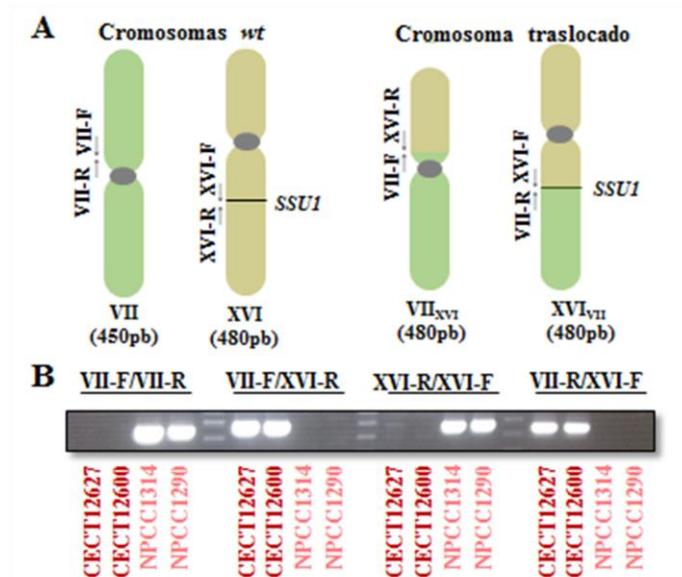


Figura 2.20. Traslocación recíproca entre el cromosoma XVI y el cromosoma VII que involucra al gen de resistencia al sulfito *SSUI*. **A:** Representación esquemática del sitio de amplificación para la combinación de los cuatro primers: VII-F, VII-R, XVI-F, y XVI-R. **B:** geles de agarosa 1,5% que muestran la amplificación para las cuatro combinaciones de primers. La combinación VII-F/XVI-R y VII-R/XVI-F indica presencia de la traslocación, mientras que la amplificación en la combinación VII-F/VII-R y VII-F/XVI-R implica genotipo *wild type* (*wt*). Las letras en color rojo indican las cepas traslocadas, mientras que las cepas en rosa indican el genotipo *wt*.

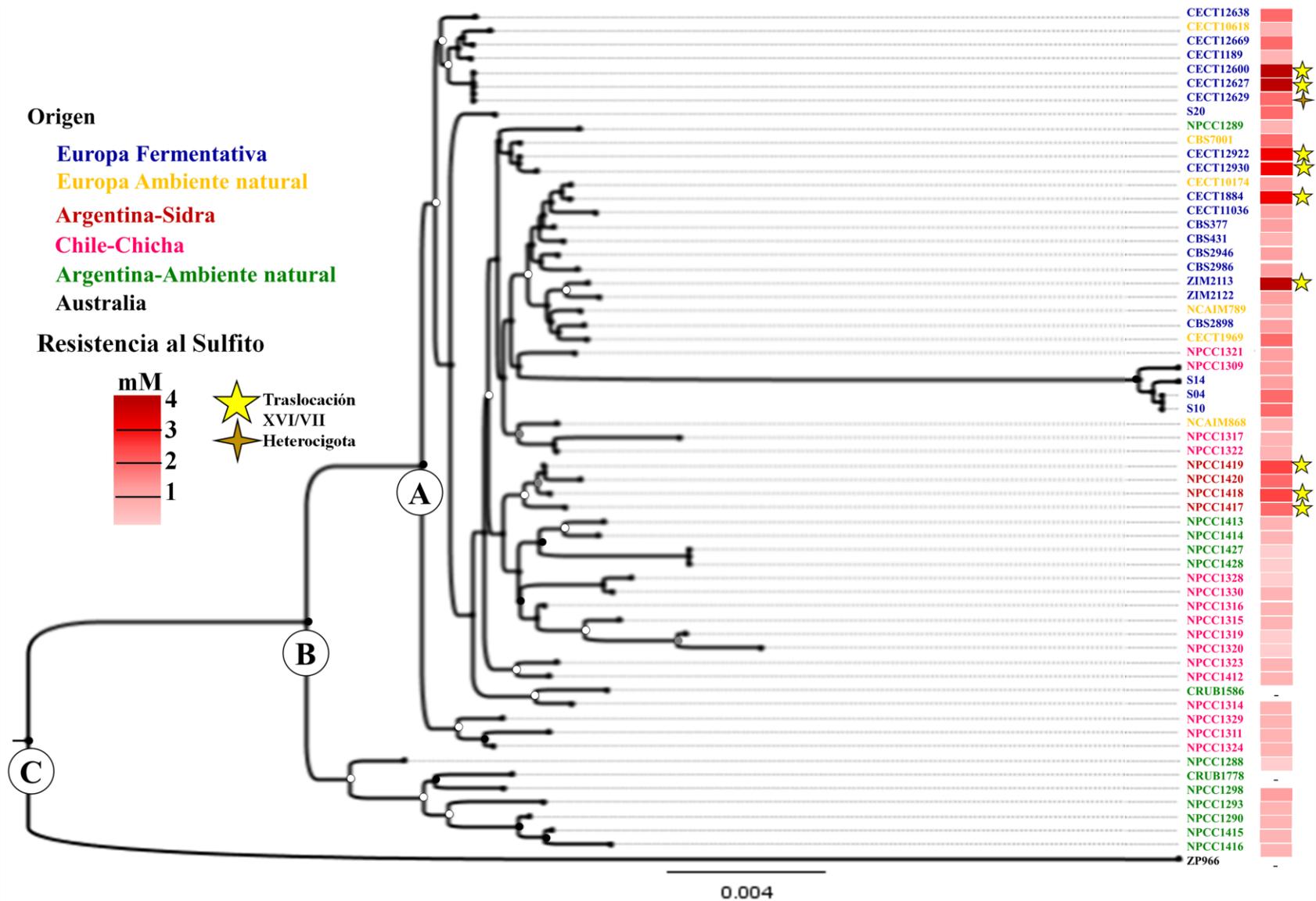


Figura 2.21: Árbol Filogenético (NJ) de *S. uvarum* para siete genes nucleares. Los recuadros laterales derechos representan la concentración de metabisulfito de sodio hasta la que crecen cada una de las cepas, la barra a la izquierda representa la escala de 0 a 4 mM. La estrella representa las cepas que poseen la traslocación entre el cromosoma XVI y el VII. La estrella de cuatro puntas representa la cepa heterocigota.

2.4.4. Ensayos de expresión del gen *SSUI*

Por último, se utilizaron las tres cepas analizadas en el estudio genómico y que presentaron resistencia diferencial al SO₂: la cepa europea CECT12600 y las cepas patagónicas NPCC1290 y NPCC1314 para evaluar la expresión del gen *SSUI* durante el proceso de fermentación con y sin el agregado de Metabisulfito de Sodio. Para ello se realizaron fermentaciones individuales en mosto sintético MS300 con agregado de 1mM de SO₂ libre (concentración subletal para las cepas de baja resistencia) y sin el compuesto. Todas las fermentaciones se realizaron en frascos de 100 mL conteniendo 90mL de mosto. La incubación se realizó a 25°C sin agitación y por triplicado y la cinética se siguió por pérdida de peso.

En función de los datos cinéticos se tomaron cuatro muestras correspondientes a los primeros cuatro días de fermentación para realizar la extracción de RNA. En lo referente a las cinéticas de fermentación, todas las cepas tuvieron un comportamiento similar en ausencia de Metabisulfito de Sodio. Respecto de las fermentaciones con Metabisulfito de Sodio, la cepa resistente CECT12600 tuvo un comportamiento superior a las demás (Figura 2.22.A). Los datos obtenidos de expresión del gen *SSUI* estandarizado por los respectivos controles de expresión constitutiva en las dos condiciones (ausencia y presencia de metabisulfito de Sodio) y para las tres cepas analizadas se representaron en la Figura 2.22.B. La cepa que presentó menor expresión de este gen en todos los tiempos analizados fue la cepa aislada de chicha NPCC1314, la cual se utilizó para calcular la expresión relativa de las demás. Independientemente de la presencia de Metabisulfito de Sodio, se observó una sobreexpresión del gen *SSUI* significativamente mayor en la cepa tolerante CECT12600 que en las cepas patagónicas (Figura 2.22.B). Sin embargo, en las fermentaciones sin agregado del agente antimicrobiano la diferencia relativa fue menor que en presencia de este compuesto. Se observó además, que en las fermentaciones sin antimicrobiano la mayor diferencia de expresión entre cepas ocurrió a los cuatro días de comenzada la fermentación (correspondiente ya a un estadio medio de la fermentación), mientras que en las fermentaciones con Metabisulfito de Sodio la mayor diferencia relativa se observó en el estadio inicial. De hecho, en el primer día de fermentación la sobreexpresión del gen *SSUI* en cepa europea CECT12600 resultó 10 veces mayor a la observada en las dos cepas patagónicas (Figura 2.22.B).

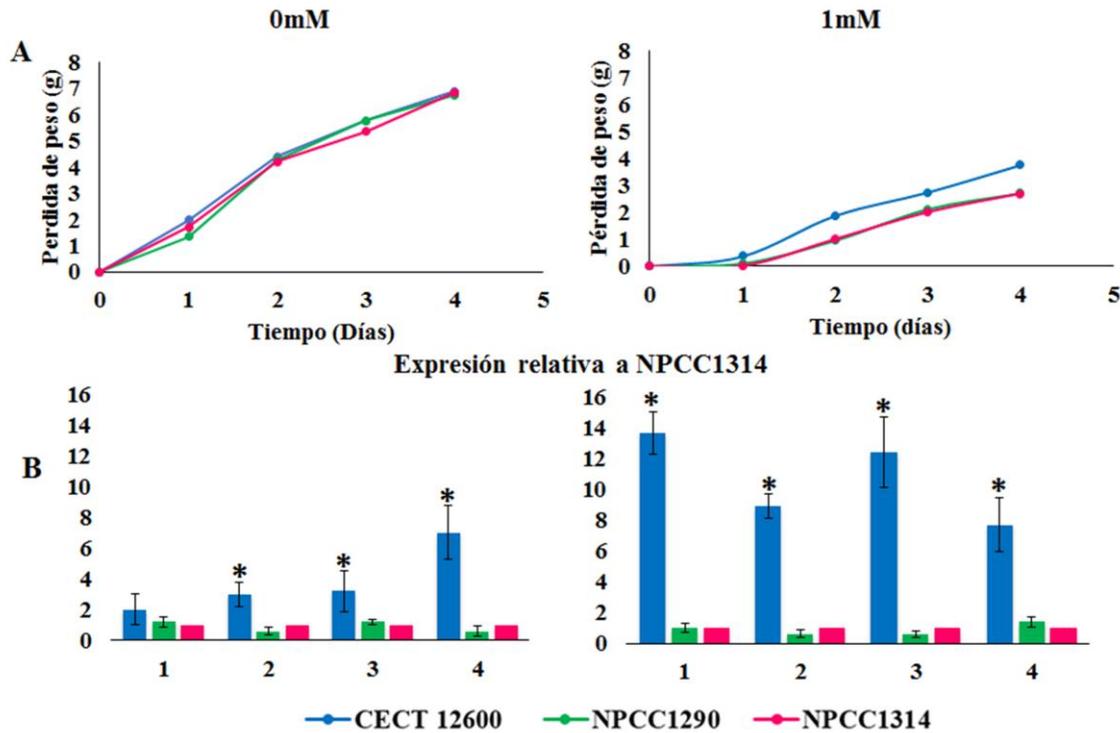


Figura 2.22: **A:** Cinética de fermentaciones en mosto sintético MS300 con y sin agregado de Metabisulfito de Sodio para cepas de *S. uvarum* con elevada (CECT12600) y baja (NPCC1290 y NPCC1314) tolerancia. **B:** Expresión diferencial relativa a la cepa NPCC1314 del gen *SSU1* en fermentaciones con y sin Metabisulfito de Sodio. *: diferencias significativas ANOVA Test de Tuckey=2.

DISCUSIÓN

Al someter a los organismos a condiciones estresantes (definida como una condición en donde se ve afectado el crecimiento del microorganismo) e inclusive limitante (que lleva a la muerte del mismo) se pone en evidencia la plasticidad de los mismos. Esta plasticidad, íntimamente relacionada tanto con aspectos genotípicos y/o fenotípicos, representan la capacidad de adaptación de los organismos a las nuevas condiciones ambientales (Sato et al., 2003). En la parte anterior de este capítulo ya se ha profundizado sobre los genotípicos de esta especie, particularmente en la Patagonia, y su relación con los diferentes nichos ecológicos asociados a ambientes naturales y fermentaciones tradicionales e industriales. En esta parte, y a través del estudio de diferentes factores de estrés relacionados con los procesos fermentativos, se pretende realizar aportes sobre las diferencias fisiológicas que quizás

tuvieron relación con (o quizás son el resultado de) la adaptación de las diferentes cepas a los diversos ambientes analizados. Muchos autores han demostrado que el ambiente fermentativo promueve una variedad de mecanismos genéticos y fisiológicos en las levaduras que les permiten adaptarse a estas condiciones en las que coexisten varios factores de estrés simultáneamente y de forma cambiante en el tiempo (Ansanay-galeote et al., 2001; Auesukaree, 2017; Belloch et al., 2008; Galeote et al., 2010; Ramos et al., 2013). Spor et al., (2009), estudiando cepas de *S. cerevisiae* observaron que las distintas poblaciones presentan estrategias diferentes dependiendo de sus nichos ecológicos. Los autores evidenciaron que cepas de laboratorio y de ambientes naturales logran un mayor número de células en la población y presentan células de tamaños más pequeños en condiciones de fermentación que cepas industriales. En condiciones de respiración, sin embargo, estas mismas cepas presentan una menor tasa de reproducción y producen menor cantidad de etanol. Hasta el momento no se han llevado a cabo trabajos similares con cepas de *S. uvarum* de diferentes ambientes.

De acuerdo a estos mismos autores, la variación en la calidad, cantidad y disponibilidad en la fuente nutricional son factores claves en las estrategias evolutivas de la historia de vida de las levaduras (Spor et al., 2009). En particular, las fuentes de nitrógeno (calidad y cantidad) son el factor nutricional más importante en las fermentaciones, en las que por lo general existe un exceso de fuente carbonada (azúcares) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Tanto el mosto de uva como el mosto de manzana contienen diferentes fuentes de nitrógeno que pueden ser asimiladas por las levaduras (mayormente sales de amonio y aminoácidos) y que constituyen lo que se conoce como FAN o nitrógeno fácilmente asimilable (FAN) (Fleet y Heard 1993). Existen diferentes factores que influyen en la concentración de esta fuente nutricional como la variedad de uva o manzana, el origen geográfico, las condiciones climáticas y algunos procesos tecnológicos (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010; Swiegers y Pretorius, 2005). Cuando las concentraciones de FAN son limitantes, la cinética de fermentación se ve afectada, lo que en muchos casos pueden ocurrir las denominadas “paradas de fermentación” (Buzke et al., 1998; Dubois et al., 1996; Nicolini et al., 2004). Múltiples trabajos relacionados con el proceso de vinificación manifiestan el gran problema que constituyen las paradas de fermentación directamente relacionadas con la escasez de nitrógeno (Ivorra et al., 1999; Larue et al., 1984; Muñoz y Ingledew 1989). No obstante, no se observa lo mismo en sidras. Esta diferencia puede deberse a que aun cuando la

concentración de nitrógeno en diferentes mostos de manzana es muy variada (desde 50 a 200 mg/L FAN) (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010) las concentraciones de azúcares (glucosa y fructosa) son inferiores (100-130g/L) a la mayoría de los mostos de uva (200-250g/L), esto se traduce en una menor relación carbono/nitrógeno en sidras (1:1 g de azúcares por cada mg de FAN) que en el vino (2:1), es decir en las sidras el nitrógeno no parecería constituir un recurso tan escaso.

Los resultados observados en esta Tesis realizados en microplacas, evidenciaron un mejor crecimiento de las levaduras fermentativas europeas (también algunas de ambientes naturales de Europa) en altas concentraciones de nitrógeno (a partir de 140 mg/L en adelante), superando significativamente la performance de las cepas aisladas de la Patagonia (ambiente natural, chicha y sidra). Es decir, que las cepas provenientes de Europa (mayormente vónicas) mejoraron significativamente sus parámetros cinéticos de crecimiento (aumentaron los valores de μ_{max} y disminuyeron los valores de λ) a medida que se incrementaron las concentraciones de nitrógeno en el medio. A bajas concentraciones de nitrógeno ocurrió el fenómeno inverso, las cepas Patagónicas presentaron un mejor comportamiento que las europeas, sugiriendo que las cepas europeas exhiben un mayor requerimiento de nitrógeno. Como se mencionó previamente, el nitrógeno parecería no ser una limitante del crecimiento en sidras (ni en chichas, un sustrato similar), y sería esperable que las cepas aisladas de estos ambientes presenten un alto requerimiento de este nutriente, mientras que en las fermentaciones vónicas podríamos esperar que se seleccionen cepas con bajo requerimiento que puedan competir por este recurso limitante. Sin embargo, los resultados evidencian lo contrario. Una posible explicación para esto podría relacionarse con una de las prácticas tecnológicas propias del proceso de vinificación, que consta en agregar a los mostos de uva grandes concentraciones de nitrógeno a fin de evitar las paradas de fermentación debidas a su escasez. Este hecho pudo haber provocado una selección de aquellas levaduras que crezcan mejor en estas condiciones artificiales. En nuestro ensayo las principales levaduras que incrementaron su cinética fueron las cepas vónicas de la subpoblación Hol (no disponemos de cepas vónicas patagónicas).

El agregado de nitrógeno no es una práctica tan difundida en la elaboración de sidras y por supuesto tampoco en chichas de manzana, esto podría explicar por qué las cepas de estos orígenes no se ven afectadas por el incremento en la concentración de este nutriente. En la

industria sidrera en nuestro país el agregado de nutriente no es una práctica ampliamente difundida, algunos productores utilizan esta estrategia mientras que otros sostienen que no es necesaria, evidenciando que esta práctica de adición de nitrógeno no es tan frecuente en la industria de la sidra como en la del vino. Con estos antecedentes se pretende contextualizar como practicas realizadas por el hombre impactan en la selección de ciertas levaduras. En este contexto, algo interesante que vale la pena remarcar, es que las cuatro cepas aisladas de sidra de Irlanda (S04, S10, S14 y S20) tuvieron un comportamiento muy similar al observado en la Patagonia aun cuando corresponden a cepas europeas de la subpoblación Hol. Sorprendentemente tres de estas cepas son las que comparten la misma introgresión con una de las cepas aislada de chicha (que además era un perfil molecular mayoritario en las chichas como se demostró en el primer capítulo) lo cual pone en evidencia además de la relación filogenética observada anteriormente, una relación fisiológica por lo menos en lo que al consumo de nitrógeno se refiere.

Claramente nuestros resultados evidencian que la respuesta al nitrógeno en las condiciones ensayadas no se asocia con las relaciones filogenéticas, sino que debe haber otro factor en juego que esté relacionado con el ambiente de origen. El caso más contrastante lo evidencian las cepas patagónicas incluidas en las subpoblaciones SA-A y SA-B que, aunque poseen una gran distancia genética y poco flujo génico, muestran un comportamiento fisiológico fue similar. Los ambientes naturales son pobres en nitrógeno por ende probablemente son seleccionadas aquí aquellas levaduras con bajos requerimientos nutricionales. Un resultado similar fue observado por Origone, (2017), quien evidenció una mayor tasa de crecimiento a bajas concentraciones de nitrógeno en cepas de *S. eubayanus* respecto *S. uvarum* (cabe recordar que *S. eubayanus* sólo ha sido asociada a ambientes naturales). Posiblemente patrones diferenciales en la expresión a nivel intraespecífico estén involucrados en la adaptación a estos procesos. Treu et al., (2014) evaluaron el patrón de expresión global de diferentes cepas de *S. cerevisiae* distanciadas filogenéticamente y de orígenes diversos en respuesta al nitrógeno. Los autores observaron que en concentraciones bajas de nitrógeno todas las cepas presentaron un perfil de expresión similar (aun las más alejadas filogenéticamente), pero a concentraciones altas la cepa industrial sobreexpresaba varios genes involucrados en el metabolismo y transporte de compuestos nitrogenados. Similares eventos podrían estar ocurriendo en *S. uvarum* en respuesta al nitrógeno; sin

embargo, se requiere de estudios adicionales que permitan confirmar esta hipótesis y/o entender estas diferencias.

En el ensayo de competencias realizado en este capítulo entre una cepa vínica de la sobpoblación Hol y dos cepas de ambientes naturales incluidas en las subpoblaciones SA-A y SA-B se confirmó que ambas cepas aisladas de ambientes naturales lograron implantarse mejor que la cepa vínica en concentraciones bajas de nitrógeno, mientras que esta situación se revirtió completamente a concentraciones elevadas de nitrógeno, donde se implantó mejor la cepa vínica Hol. Algo interesante de observar es que la cepa de ambiente natural SA-A (NPCC1414) se encontró representada en una buena proporción en ambas condiciones, mientras que la cepa más asociada a ambientes naturales de la subpoblación SA-B (cepa NPCC1298) no fue detectada al finalizar el ensayo a elevada concentración de nitrógeno. Esto implicaría que la cepa de la subpoblación SA-A se logró adaptar bien en bajas y altas concentraciones de nitrógeno (lo cual no se observó en ensayos en microplacas) y podría representar una situación intermedia.

Por otro lado, la estimación del rango de temperatura en el cual los microorganismos son capaces de crecer resulta también un factor importante, tanto para los estudios en fermentaciones la industria como para estudios ecológicos y taxonómicos (Salvadó et al., 2011). Son muchos los trabajos que demuestran la importancia de la temperatura en comportamiento de las levaduras en fermentaciones (Arroyo-Lopez et al., 2006; Charoenchai et al., 1998; Serra et al., 2005; Sorensen et al., 1997) así como en la distribución natural de las especies en la naturaleza (Lachance et al., 2003; Libkind et al., 2011; Lopes et al., 2010; Rodriguez et al., 2014; Sampaio y Goncalves, 2008; Sniegowski et al., 2002; Sweeney et al., 2004).

En los ensayos realizado en microplacas con cepas de *S. uvarum*, nuevamente se volvió a observar un comportamiento diferenciado por origen más que por las relaciones filogenéticas existentes entre cepas. Mientras a bajas temperaturas no se observa diferencia en los valores obtenidos de los parámetros μ_{\max} y λ , a temperaturas más elevadas (20°C y 30°C) las cepas europeas (subpoblación Hol) y las cepas de sidra de la Patagonia (subpoblaciones Hol y SA-A) mostraron valores específicamente del parámetro λ significativamente superiores (requirieron más tiempo para comenzar el crecimiento exponencial) que los evidenciados para el resto de las cepas patagónicas (de ambientes

naturales y de chicha). En los ensayos de competencia, sin embargo, este efecto entre cepas se evidenció a baja temperatura, donde la cepa europea dominó las fermentaciones mientras que a 30°C se observaron proporciones similares de las tres cepas inoculadas.

Debido a que todas estas levaduras fueron aisladas de zonas geográficas caracterizadas por las bajas temperaturas, parece poco probable que la temperatura ambiental sea el factor determinante para el comportamiento diferencial que se observó entre las cepas. Una posible explicación a nuestro resultado podría estar relacionada con el nicho ecológico que ocupan estas cepas en los diferentes sitios geográficos de los cuales fueron aisladas. Para ello cabe mencionar que la teoría de la biodiversidad propone dos tipos de hipótesis para explicar la composición de una comunidad determinada: i) el primero engloba factores geográficos e históricos (factores externos, abióticos) base de la biogeografía (Avice, 1998) y ii) el segundo tipo, denominado reglas de ocupación de nicho, se refiere a las propiedades intrínsecas de la población que afectan su interacción con otros miembros de la comunidad (Vandermeer, 1972). Un ejemplo para este último caso, quizás menos evidente, lo representa el efecto Crabtree descubierto en la especie *S. cerevisiae* (de Deken, 1966). Por este mecanismo la levadura produce etanol en presencia de oxígeno (lo cual energéticamente es menos eficiente y contradice lo estipulado en el efecto Pasteur) cuando las concentraciones de azúcares son altas. Goddard, (2008) propone que este mecanismo es un ejemplo de modificación de nicho (una estrategia de invasión) que provoca que las especies que coexisten adquieran habilidades como la resistencia al etanol. En relación con lo observado en esta Tesis, se podría suponer que aquellas levaduras que tuvieron que compartir nicho ecológico con la especie *S. cerevisiae*, altamente invasiva y nómada como la describió Goddard, (2008), tuvieron que diferenciarse de ella a fin de garantizar su subsistencia. Este podría ser el caso observado en las cepas de *S. uvarum* de ambientes fermentativos (cepas de Europa y cepas de sidra de la Patagonia), debido a que una de las pocas adaptaciones que no ha adquirido hasta el momento la especie *S. cerevisiae* es la capacidad de crecer a bajas temperaturas. Como estrategia para crecer a bajas temperaturas esta especie ha recurrido principalmente a mecanismos como la hibridización con levaduras criotolerantes como *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* y *S. eubayanus* (Bradbury et al., 2005; Masneuf et al., 1998; Peris et al., 2012). Este efecto de la temperatura también fue observado en el capítulo anterior, donde únicamente bajando las temperaturas de fermentación (a 13°C) se logró recuperar las cepas de sidra en la Patagonia.

En ambientes naturales de la Patagonia la situación es diferente ya que no existen reportes de la presencia de cepas naturales (no introducidas) de *S. cerevisiae* en los mismos aun cuando se han muestreado zonas muy variadas. Sin embargo, en estos ambientes *S. uvarum* comparte nicho con su especie hermana, también criotolerante, *S. eubayanus*; siendo la Patagonia hasta el momento el único sitio donde se ha reportado la coexistencia de dos especies criotolerantes tan frecuentemente (Libkind et al., 2011; Rodriguez et al., 2014). La presencia de esta especie criotolerante podría impactar de modo opuesto a como lo hace *S. cerevisiae* en las poblaciones de *S. uvarum* europeas. Aunque los únicos estudios en los que se evaluó el crecimiento de cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* a diferentes temperaturas no parecen demostrar una preferencia de una u otra por temperaturas elevadas (Libkind et al., 2011; Origone et al., 2017), este fenómeno podría estar ocurriendo en ambientes naturales donde estas especies no encuentran otra especie del género que compita a temperaturas superiores. Un fenómeno similar al propuesto aquí ha sido observado por Sampaio y Goncalves (2008) entre las especies simpátricas *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* en Portugal. Estos autores observan que, aun cuando las dos especies comparten la preferencia por la temperatura, *S. cerevisiae* es capaz de crecer hasta temperaturas levemente superiores a *S. paradoxus*. Estas dos especies han sido encontradas en simpatria también en sitios de Norteamérica (Sniegowski et al., 2002) Croacia (Redzepovic et al., 2002) y Nueva Zelanda (Zhang et al., 2010), por lo que quizás existan, además de diferencias de temperatura, otras diferencias fisiológicas que permitan explicar la coexistencia de las dos especies. Algo similar podría estar relacionado con las dos especies criotolerantes en la Patagonia.

Aun cuando las explicaciones expuestas anteriormente resultan lógicas y explicarían por que las cepas patagónicas de *S. uvarum* de ambientes naturales crecen mejor que las europeas a temperaturas más elevadas, mientras que las europeas (mayormente vínicas) son más competitivas a temperaturas bajas, no explican del todo el caso de las cepas de chicha. Muchas de las cepas de chicha fueron aisladas de fermentaciones en las que también se encontró *S. cerevisiae*, por lo que se esperaba encontrar un comportamiento similar al de las cepas de *S. uvarum* europeas o de sidras de la Patagonia; de hecho, sus relaciones filogenéticas las asocian más a éstas dado que se han caracterizado como de las subpoblaciones SA-A o Hol. Sin embargo, su comportamiento es más parecido al de las cepas de ambientes naturales de la Patagonia, tanto en cultivos puros en los ensayos en microplaca

como en los cultivos mixtos en los ensayos de competencia. Algo que podría justificar este comportamiento es el hecho que las chichas en las que *S. uvarum* coexiste como especie minoritaria con *S. cerevisiae* fueron realizadas a 20°C en condiciones de laboratorio, es decir las muestras de mosto se transportaron y fueron fermentadas en el laboratorio (Rodríguez et al., 2017). Por el contrario, las chichas donde se observó dominancia de *S. uvarum* (y en algún caso no se detectó *S. cerevisiae*) y un mayor número de cepas fueron fermentadas totalmente por las familias Mapuches locales, probablemente a temperaturas inferiores ya que las manzanas se colectan en otoño cuando las temperaturas de esas zonas de la Patagonia son muy bajas. Esta es probablemente la situación común en las chichas. Probablemente el contacto y el flujo génico que existe entre estas cepas y las aisladas de ambientes naturales (SA-A y SA-B) les han otorgado a las cepas de chicha una mejor adaptación a temperaturas más altas.

Con todos estos antecedentes se vuelve a poner en evidencia un marcado efecto en cuanto a adaptaciones en otro nivel que no es el genético (al menos con los genes estudiados), siendo para este ensayo las poblaciones SA-A y SA-B indistinguibles a nivel fenotípico.

Uno de los factores de estrés más importantes relacionados con la adaptación de las levaduras durante los procesos fermentativos es la tolerancia al etanol. El efecto del etanol en el crecimiento de la célula está íntimamente relacionado con el aumento de la permeabilidad y con cambios en la fluidez de la membrana plasmática (Alexander et al., 1994; Sales et al., 2000; Stanley et al., 2010). Para este factor de estrés nuevamente se evidenció un marcado efecto por origen en los ensayos en microplaca, siendo las cepas aisladas de ambientes fermentativos (en Europa y sidra en la Patagonia) las que mayor resistencia a este compuesto presentaron. Contrariamente, las cepas aisladas de ambientes naturales de la Patagonia (independientemente de la subpoblación a la que corresponden, subpoblación SA-B o SA-A) fueron las que menor resistencia presentaron a concentraciones de etanol elevadas, es decir vieron más afectado su crecimiento en medios con elevado contenido de este compuesto. Estos resultados se confirmaron posteriormente en los ensayos de competencia donde predominó la cepa Holártica de ambientes fermentativos a concentración de etanol elevada (8%). Es lógico esperar que las cepas que han estado en contacto con concentraciones elevadas de este compuesto por generaciones (en un ambiente fermentativo como el vino o la sidra) puedan haber adquirido una mayor tolerancia a este

compuesto. Existen varios trabajos que han reportado la resistencia diferencial al etanol, de cepas fermentativas en relación a cepas de ambientes naturales (Ansanay-galeote et al., 2001; Stanley et al., 2010). También se ha reportado, mediante estudios de evolución dirigida, que la tolerancia al etanol puede mejorarse (Peris et al., 2017; Querol y Barrio, 2003). Los mecanismos por los que las levaduras logran adaptarse a las concentraciones elevadas de etanol involucran cambios en la ploidia, número de copias de ciertos genes, y alta frecuencia de mutación, lo que involucra a poblaciones con una alta interferencia clonal (Dunham et al., 2002; Gresham et al. 2008; Lang et al., 2013; Toprak et al., 2011; Voordeckers et al., 2015).

Nuevamente las cepas de chicha constituyen un caso especial, ya que su comportamiento fue muy heterogéneo en respuesta a este factor de estrés, es decir, algunas cepas se comportaron como las cepas fermentativas europeas y las otras como las de ambientes naturales de la Patagonia. Esto podría relacionarse también al hecho que entre las cepas de chicha se encontraron algunas identificadas como pertenecientes a la subpoblación SA-A y otras a la Hol. Aunque esto no se relacionó directamente con su tolerancia (no ocurrió que las Hol sean más tolerantes y las SA-A menos), esto sí explicaría su variabilidad. Origone et al., (2017) estudiaron este comportamiento previamente, utilizando un gran número de cepas de ambientes naturales y de chicha de las especies *S. eubayanus* y *S. uvarum* (en esta última se incluyeron algunas cepas también utilizadas en este trabajo). Los autores remarcan la gran homogeneidad fenotípica observada en las poblaciones aisladas de ambientes naturales (en las dos especies estudiadas) mientras que las cepas aisladas de chicha (solo de la especie *S. uvarum*) presentaron respuestas muy variadas. Como se sugirió previamente, las cepas de chichas parecen comportarse como si estuvieran en zonas de transición o de contacto entre dos subpoblaciones. Este hecho también se apoyaría en lo observado en la distribución alélica de estas cepas que correspondió al modelo bimodal, que evidencia que las presiones selectivas actuales favorecen la presencia de dos genotipos opuestos, y evidentemente tal como se observó en esta parte del capítulo también de dos fenotipos opuestos, algunos que podrían presentar mejores habilidades para desarrollarse en un ambiente natural (baja requerimiento nutricional, crecimiento a temperaturas mayores) y otros en ambientes fermentativos (tolerancia al etanol).

Un dato interesante es que las cepas aisladas de ambientes naturales de Europa (subpoblación Hol) presentaron un comportamiento similar que el resto de las cepas europeas

aisladas de ambientes fermentativos. Este hecho indicaría que no se trataría de cepas originarias del ambiente natural, sino que podrían ser cepas domesticadas (en bodega o ambientes similares) que se dispersaron desde los ambientes antrópicos donde adquirieron esta característica fisiológica hacia los ambientes naturales. Existen varios trabajos en los que se evidencia una circulación de levaduras desde la bodega hacia el viñedo, mediada mayormente por insectos (Goddard et al., 2010; Hyma y Fay, 2013; Quan y Eisen, 2018) por lo que nuestra hipótesis no resultaría descabellada. De hecho, como se mostró en la primera parte de este capítulo, las cepas de ambientes naturales de Europa comparten por ejemplo los mismos 3 haplotipos encontrados para el gen mitocondrial *COX2* detectados en las cepas vínicas del mismo continente, mientras que las cepas de ambientes naturales en Sudamérica son mucho más variadas genéticamente.

El último factor de estrés que se analizó en esta Tesis, y al que adjudicamos en principio durante el primer capítulo la baja implantación de la cepa de chicha NPCC1314 en los ensayos a escala semipiloto, fue la resistencia al sulfito (SO_2). Como ya se comentó en detalle en la introducción de esta Tesis, la adición de SO_2 es una práctica común en la industria de la sidra y el vino y es por eso que la resistencia a este compuesto antimicrobiano por parte de las levaduras resulta de particular relevancia en estas industrias (Ribéreau-Gayon et al., 2006). En el ensayo de resistencia al SO_2 realizado en placas se observó que un gran grupo de cepas fermentativas de Europa y la mayoría de las cepas de sidra de la Patagonia manifestaban una alta resistencia a este compuesto (de hasta 2-4 mM), mientras que la totalidad de las cepas aisladas de chicha y de ambientes naturales en la Patagonia, junto con un grupo de cepas aisladas de ambientes naturales de Europa presentaron una baja resistencia a este mismo compuesto (0-1 mM). Estos resultados evidencian nuevamente un comportamiento similar entre las cepas de sidra de la Patagonia y las fermentativas europeas, mientras que las cepas de chicha presentan un comportamiento similar a las cepas de ambientes naturales de la Patagonia. La resistencia diferencial a este compuesto entre cepas salvajes e industriales en *S. cerevisiae* ha sido descrita por numerosos autores (Nardi et al., 2010; Pérez-Ortín et al., 2002; Yuasa et al., 2004). No obstante, hasta el momento no se había realizado un ensayo similar en *S. uvarum*, comparando cepas de diferentes orígenes y áreas geográficas. Una de las causas asociadas a la resistencia de las levaduras a este compuesto ha sido relacionada con la expresión constitutiva del gen *SSUI* (transportador de sulfito) dado

por una traslocación recíproca entre los cromosomas XVI y VIII que modifica al promotor del gen, otorgándole una mayor resistencia a este compuesto (Pérez-Ortín et al., 2002). Esta traslocación se encuentra en subpoblaciones de *S. cerevisiae* vínicas, pero no en las naturales (Brion et al., 2012; Clowers et al., 2015; Nardi et al., 2010; Pérez-Torrado et al., 2017; Yuasa et al., 2004). La translocación XVI/VIII contribuye no solo a la diferenciación ecológica de las levaduras vínicas, sino también como una barrera genética que podría llevar al aislamiento reproductivo de las poblaciones vínicas y las de ambientes naturales dentro de la especie *S. cerevisiae* (Hue et al., 2014; Clowers et al., 2015). Zimmer et al., (2014), describieron posteriormente otra translocación entre los cromosomas XVI y XV que aumenta la expresión del gen *SSUI* en la misma especie *S. cerevisiae*.

El hecho de haber encontrado una resistencia diferencial entre cepas de *S. uvarum* de diferentes orígenes y los datos ya conocidos sobre el gen *SSUI* en *S. cerevisiae* motivaron a profundizar el estudio en este caso y por ello se procedió a la búsqueda de esta región particular en cepas de *S. uvarum*. Se analizaron en las secuencias completas disponibles de algunas cepas representantes de diferentes subpoblaciones estudiadas en esta Tesis y que presentaban marcada diferencia en cuanto a su resistencia. A partir de este análisis se identificó una nueva translocación entre los cromosomas XVI y VII que también afectan al promotor del gen *SSUI* en la cepa de *S. uvarum* europea (de la subpoblación Hol) CECT12600 vínica. Esta translocación no se encontraba presente en el genoma de dos cepas patagónicas (de la subpoblación SA-A y SA-B de chicha y ambiente natural respectivamente) de las que disponíamos también del genoma completo. El estudio de expresión demostró también que la cepa vínica presentó una expresión diferencial al menos 10 veces mayor del transportador que las no vínicas (independientemente de la presencia o ausencia de SO₂ en el medio), indicando que esta traslocación le confiere una mayor expresión y mayor resistencia al sulfito, de igual forma que se observó en *S. cerevisiae*. Liu et al., (2017) estudiando un gran número de genes relacionados con la tolerancia al sulfito en una cepa de *S. uvarum*, evidenció que sólo cuando se realizó transformación del gen *SSUI* evidenció cambios en la resistencia al sulfito, demostrando la importancia de este gen en la tolerancia al sulfito en esta especie.

Finalmente se evidenció que en total 10 de las cepas analizadas en esta Tesis presentaron esta recombinación todas aisladas de fermentaciones industriales.

Interesantemente de estas 10 cepas con la recombinación, siete correspondieron a cepas vínicas europeas y tres correspondieron a cepas aisladas de sidra de la Patagonia en esta Tesis. Este hecho, sumado a que la traslocación en todas las cepas evaluadas en este trabajo se produjo en el mismo sitio recombinante, aporta mayor evidencia de que la traslocación ocurrió en Europa y que las cepas de sidra, tan similares fisiológica y genéticamente a las europeas corresponden a una invasión (colonización) de cepas europeas en la Patagonia. Esta colonización, como se mencionó en la primera parte de este capítulo, pudo ser posterior a la que dio origen a las que ingresaron a la Patagonia por Chile y diseminadas por los Mapuches por el camino de las manzanas (Rodríguez et al., 2017). De hecho, podrían estar más asociadas a las levaduras vínicas (dentro de las cuales se encuentran las cepas con translocación en Europa), ya que la zona de Cipolletti de donde se aislaron las cepas de sidra es una zona donde además de las manzanas se encuentran grandes plantaciones de vid para la elaboración de vino (Instituto Nacional de Vitivinicultura, INV 2017).

Saccharomyces uvarum presenta una divergencia significativa dentro del género respecto de *S. cerevisiae* con solo ~ 80% de identidad en secuencias codificantes (Scannell et al., 2011), que es comparable a la distancia genética entre humanos y vacas (Elsik et al., 2009). En este contexto, los datos observados en relación al SO₂, demostrarían un caso de convergencia entre dos especies diferentes que se adaptan de una manera similar a un ambiente particular. Este fenómeno se denomina evolución convergente. En los últimos años, los estudios genómicos comparativos han sugerido que la evolución paralela puede ser más frecuente de lo esperado. Hay ejemplos de convergencia genética debido a mutaciones puntuales, duplicaciones de genes o hibridaciones de especies (Stern, 2013). En el caso de las levaduras, la evolución convergente por mutaciones puntuales ha sido descrita en ambientes naturales (Hittinger et al., 2004) y en estudios de evolución dirigida en laboratorio en *S. cerevisiae* (Segre et al., 2006). Hasta ahora, estos datos corresponden al primer ejemplo de convergencia genética producida por reordenamiento cromosómico en dos especies independientes y divergentes. El mecanismo más utilizado por estos organismos para generar variabilidad genética son los reordenamientos cromosómicos a gran escala (Selmecki et al., 2009) y ocurren tanto en la evolución experimental en el laboratorio (Gorter et al., 2017) como en poblaciones de levaduras de ambientes naturales. Uno de los casos más

sorprendentes de este tipo lo constituyen las levaduras aisladas de Evolution Canyon (Israel), adaptadas a niveles extremadamente altos de cobre (Chang et al., 2013).

Los resultados expuestos en esta parte de la Tesis aportan evidencia adicional sobre la fuerte presión de selección que ejerce el antimicrobiano SO₂ en las poblaciones de levaduras, promoviendo adaptaciones impulsadas por la actividad del hombre.

Por último, y retomando una hipótesis generada en el capítulo 1 sobre la implantación de la cepa NPCC1314 en sidras a escala semipiloto, los datos obtenidos de la baja resistencia al sulfito observada en la cepa de chicha NPCC1314 explicaría este fenómeno. La cepa de sidra NPCC1420, aun cuando no presentó translocación en el gen *SSUI*, mostró una gran tolerancia a este compuesto, lo cual garantizaría su implantación en las mismas condiciones. Estos resultados permiten plantear dos estrategias biotecnológicas i) utilizar para la elaboración de sidras cepas con alta resistencia al sulfito (como las aisladas de sidra en esta Tesis), que garanticen una buena implantación en las condiciones industriales o ii) elegir prácticas tecnológicas sin, o al menos con cantidades reducidas, de este antimicrobiano y que permitan obtener productos químicamente y aromáticamente diferentes por el uso de cepas de otros orígenes no adaptadas a las condiciones industriales. Actualmente, tanto en la industria del vino como en la industria de la sidra se están explorando las prácticas de reducción del SO₂, dado que concentraciones elevadas de este compuesto también ha generado problemas en la salud en personas sensibles (Blouin y Peunaud 2006), surgiendo y revalorizando lo que se conoce como bebidas orgánicas.

En resumen, en esta parte del capítulo se ha explorado a nivel fenotípico una gran cantidad de escenarios relacionados con factores de estrés típicos de los procesos de elaboración de bebidas fermentadas que pueden poner en evidencia diferentes grados de domesticación en las levaduras. Para ello se usó una amplia cantidad de cepas, con orígenes y características genéticas diferentes, constituyendo el trabajo más amplio en este sentido que se ha reportado hasta ahora, dado que los trabajos previos no contaban con cepas de ambientes fermentativos de la Patagonia. Se observó cómo el efecto del hombre sobre las levaduras trasciende las relaciones filogenéticas y se pusieron en evidencia fenómenos de convergencia evolutiva, expresión diferencial y adaptaciones influenciadas por el nicho ecológico y la coexistencia con otras especies, desde los ambientes naturales a los más

antrópicos. Se ha puesto en evidencia además que esta especie presenta estrategias similares con la nómada e invasiva especie *S. cerevisiae*.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Se observó un marcado comportamiento por origen y no por especie al comparar las características fisicoquímicas y cinéticas de las sidras obtenidas con las cepas de *S. uvarum* y *S. eubayanus* patagónicas.

Saccharomyces eubayanus y *Saccharomyces uvarum* producen concentraciones mayores de glicerol y menores de etanol y ácido acético que *S. cerevisiae* en fermentaciones de mosto de manzana.

La cepa de *S. uvarum* NPCC1314 aislada de chicha presentó la mayor combinación de características biotecnológicas, incluyendo mayor producción de glicerol, alcoholes superiores y esteres, y baja producción de ácido acético, por lo que fue seleccionada para ser evaluada en ensayos a escala semipiloto.

Se logró una mejor implantación de la cepa seleccionada *S. uvarum* NPCC1314 en fermentaciones a escala semipiloto realizadas a baja temperatura, mientras que la cepa control comercial no logró implantarse independientemente de la temperatura evaluada.

Se observó fermentación maloláctica espontánea únicamente en las bebidas fermentadas con *S. cerevisiae* durante el proceso de segunda fermentación en botella a las dos temperaturas evaluadas, lo que evidenciaría una posible inhibición de la fermentación maloláctica por parte de *S. uvarum*.

La temperatura de fermentación afectó el perfil fisicoquímico de las sidras, observándose mayores concentraciones de esteres en las sidras fermentadas a 20°C y de algunos alcoholes superiores en las sidras fermentadas a 13°C, independientemente de la especie de levadura utilizada.

La temperatura y la variedad de manzana utilizadas influyeron en la diversidad de levaduras observadas durante las fermentaciones espontáneas. Solamente se detectó *S. uvarum* en fermentaciones de mosto Red Delicious realizadas a 13°C, constituyendo el

primer hallazgo de esta especie relacionada a un proceso de fermentación industrial en todo el continente.

La variabilidad intraespecífica de la especie *S. uvarum* detectada en sidra fue significativamente menor que la observada en fermentaciones tradicionales (chicha) y en ambientes naturales en la Patagonia, lo que evidencia el efecto de influencia antrópica sobre la diversidad.

En ensayos a escala semipiloto comparando la cepa de chicha *S. uvarum* NPCC1314 y una cepa aislada de sidra NPCC1420 (seleccionada por sus propiedades biotecnológicas) se observó un mayor porcentaje de implantación y una cinética superior cuando se utilizó esta última levadura. Este hecho podría deberse a una mayor tolerancia al SO₂, lo que convierte a esta cepa en una interesante herramienta biotecnológica para la industria sidrera.

El análisis de genético de las cepas patagónicas permito poner en evidencia la existencia de tres subpoblaciones, Sudamérica-A, Sudamérica-B y Holárticas. La subpoblación SA-B, formada únicamente por cepas aisladas de ambientes naturales, fue la mas alejada filogenéticamente.

La subpoblación SA-A coexiste en ambientes naturales con la subpoblación SA-B, sin embargo, presentan un bajo flujo génico. En contraste, la subpoblación SA-A coexiste con la subpoblación Holártica en las chichas y en la sidra mostrando un gran flujo génico.

En el análisis del gen *COX2* mitocondrial reveló un mayor flujo génico que a nivel nuclear entre cepas de distintas subpoblaciones. La secuencia de este gen obtenida de cuatro cepas de chicha evidenció una porción de ADN correspondiente a la especie *S. cerevisiae*, evidenciando un posible evento de domesticación asociado a procesos fermentativos.

En el análisis de distribución alélica se observó un modelo multimodal en los ambientes naturales evidenciando un efecto de evolución en equilibrio. Por otra parte, en las cepas aisladas de chichas se observó un modelo de distribución bimodal que evidenciaría un efecto

de evolución disruptiva, favoreciendo la selección de dos genotipos opuestos. Finalmente, entre las cepas de sidras se observó un modelo unimodal evidenciando una reciente expansión poblacional y un efecto de selección estabilizadora favoreciendo un solo genotipo.

Las levaduras fermentativas europeas presentaron un mejor crecimiento que las patagónicas a elevadas concentraciones de nitrógeno mientras que a bajas concentraciones de nitrógeno ocurrió el fenómeno inverso sugiriendo que las cepas europeas (principalmente vínicas) exhiben un mayor requerimiento de este nutriente. Este fenómeno podría deberse a la adaptación de estas levaduras a la adición de nitrógeno en las fermentaciones vínicas.

Las cepas patagónicas incluidas en las subpoblaciones SA-A y SA-B (altamente divergentes) presentaron un comportamiento fisiológico similar en cuanto al requerimiento de nitrógeno evidenciándose un comportamiento directamente relacionado con el origen/sustrato de donde fueron aisladas.

Las cepas europeas y de sidra de la Patagonia presentaron un mejor comportamiento a bajas temperaturas que las cepas de aisladas de chicha y ambiente natural en la Patagonia.

Las cepas fermentativas europeas y las de sidra patagónicas presentaron una mayor tolerancia al etanol que las de ambientes naturales. Mientras que, las cepas de chicha presentaron un comportamiento heterogéneo evidenciando un comportamiento intermedio a los dos orígenes más extremos (ambiente natural/fermentativo industrial).

Las cepas patagónicas de ambiente natural y de chicha presentaron baja tolerancia al SO₂ en comparación a las cepas de sidra patagónicas y la mayoría de las cepas fermentativas europeas (principalmente vínicas).

Diez cepas de *S. uvarum* (7 europeas vínicas y 3 patagónicas de sidra) evidenciaron la traslocación recíproca entre el cromosoma XVI/VII. Este fenómeno induce la expresión constitutiva del gen *SSU1* otorgando a la cepa una mayor resistencia al SO₂. Este hallazgo evidenciaría un fenómeno de convergencia evolutiva con *S. cerevisiae*.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, J., Fisher, M., Amadó, R., 1992. Changes in sugar, acids, and aminoacids during ripening storage of apples (Cv Glockenapfel). *J. Agricultural Food Chemitry* 40: 1131-1134.
- Adams A.M., 1953. Studies on the storage of yeast. II. Wine yeast starter stored as moist yeast. Rept. Ontario Hort. Exp. Sta. and Products Lab. 98.
- Adams A.M., 1954. A simple continuous propagator for yeast. Rept. Ontario Hort. Exp. Sta. and Products Lab. 102-103.
- Alexandre, H., Rousseaux, I. and Charpentier, C., 1994. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* 20, 173–183.
- Albers, E., Liden, G., Larsson, C., Gustafsson, L., 1998. Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Res Dev Microbiol* 2, 253–279.
- Almeida, P., Goncalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masenuf-Pomarede, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Hittinger, C.T., Sampaio, J.P., 2014. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *S. uvarum*. *Nat. Commun.* 5, 4044.
- Alonso-del-real, J., Contreras-Ruiz, A., Castiglioni, G.L., Barrio, E., Querol, A., 2017a. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine : Limited Aeration , Inoculum Proportions , and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* 8, 1–8.
- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., Querol, A., 2017b. Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation : Competition , Physiological Fitness , and Influence in Final Wine Composition. *Front. Microbiol.* 8, 1–15.
- Anjos, J., Rodrigues de Sousa, H., Roca, C., Cássio, F., Luttk, M., Pronk, J.T., Salema-Oom, M., Gonçalves, P., 2013. Fsy1 , the sole hexose-proton transporter characterized in *Saccharomyces* yeasts , exhibits a variable fructose : H⁺ stoichiometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 201–207.
- Ansanay-galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., Sablayrolles, J., 2001. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*.

- Biotechnol. Lett. 23, 677–681.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A., 1999. Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1139–1144.
- Arias Garcia, J.A., 2008. Diversidad genética en las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* de fermentaciones tradicionales. Universitat de Valencia. Facultad de Ciències Biològiques.
- Arroyo-López, F. N., M. C. Durán Quintana, and A. Garrido Fernández. 2006. Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106:45–51.
- Arroyo-lópez, F.N., Pérez-torrado, R., Querol, A., Barrio, E., 2010. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiol.* 27, 628–637.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Barrio, E., 2009. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 663–669.
- Auesukaree, C., 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 133–142.
- Avisé, J.C., 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* 7, 371–379.
- Baleiras Couto, M.M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis, J.H.J., Van der Vossen, J.M.B.M., 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Appl Env. Microbiol* 62, 41–46.
- Bandieri S., 2005. Historia de la Patagonia. Buenos Aires: Sudamericana.
- Barbagelata R.J., 2010. Ecología de levaduras asociadas a la elaboración de sidras patagónicas. Tesis de Maestría. U.N.Comahue. Facultad de Ingeniería.
- Barrera, M.D., Frangi, J.L., Richter, L.L., Perdomo, M.H., Pinedo, L.B., 2000. Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *J. Veg. Sci.* 11, 179–188.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency : How

- to Survive the Making of Wine - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.
- Baumes, R., Moreno-Arribas, M., Polo, V., 2009. Wine Aroma Precursors: Wine Chemistry and Biochemistry. Springer New York (eds). 251-274 pp.
- Beech, W., 1972. Cider making and cider research: A review. *J. Inst. Brew* 78, 477–491.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 188–195.
- Beltrán, G., 2005. Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecnología, Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira I Virgili de Tarragona.
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J.M., Mas, A., Francois, J., Rozes, N., 2006. Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6, 1167–1183.
- Beltran, G., Rozés, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 809–815.
- Berbegal, C., Benavent-Gil, Y., Navascués, E., Calvo, A., Albors, C., Pardo, I., Ferrer, S., 2017. Lowering histamine formation in a red Ribera del Duero wine (Spain) by using an indigenous *O. oeni* strain as a malolactic starter. *Int. J. Food Microbiol.* 244, 11–18.
- Berthels, N.J., Otero, R.R.C., Bauer, F.F., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., 2008. Correlation between glucose / fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1083–1091.
- Bialeski, R. L., 1982. Sugar alcohols, In *Encyclopedia of Plant Physiology - Intracellular Carbohydrates*, Vol. 13A (eds Loewus, F. A. and Tanner, W.), Ch. 5, 158–192 (Springer-Verlag, Berlin, New York).
- Bing, J., Han, P.J., Liu, W.Q., Wang, Q.M., Bai, F.Y., 2014. Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. *Curr. Biol.* 24, 1–12.

- Blanco, D., Picinelli, A., Gutierrez, M.D., Mangas, J.J., 1990. Determination of aminoacids in apple extracts by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 29: 155-160.
- Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J., 2010. La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Asturias: PUBLICACIONES Serida.
- Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Dunbar, R., Gardner, R.C., 2005. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 27–37.
- Brion, C., Ambroset, C., Sanchez, I., Legras, J.L., Blondin, B., 2013. Differential adaptation to multi-stressed conditions of wine fermentation revealed by variations in yeast regulatory networks. *BMC Genomics* 14:681.
- Buescher, W. A., Siler, C. E., Morris, J. R., Threlfall, R. T., Mayn, G. R., Cone, G. C., 2001. High alcohol wine production from grape juice concentrates. *Am. J. Enol. Viticulture*, 52 (4), 345-351.
- Butzke, C.E., 1998. Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon and Washington. Research note. *Am J Enol Viticult* 49, 220-224.
- Cabranes, C., Blanco, D., Mangas, J.J., 1998. Characterisation of fermented apple products using data obtained from GC analysis. *Analyst* 123, 2175–2179.
- Cabranes, C., Moreno, J., Mangas, J.J., 1990. Dynamics of Yeast Populations during Cider Fermentation in the Asturian Region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3881–3884.
- Calvo, P., Carrera, A., Sánchez, E., Poverene, M., 2010. Genetic Diversity in Wild Apple (*Malus* sp.) Populations in Argentina. *Am. J. Plant Sci. Biotechnol.* 3, 99–105.
- Caridi, A., Corte, V., 1997. Inhibition of malolactic fermentation by cryotolerant yeasts. *Biotechnol. Lett.* 19, 723–726.
- Castellari, L., Ferruzzi, M., Magrini, A., Giudici, P., Passarelli, P., Zambonelli, C., 1994. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 33, 49–52.
- Castor J.G., 1953. Experimental development of compressed yeast fermentation starters. *Wines & Vines*, 34: 8-27.
- Chandon, J. A., 2003. *Faites votre cidre*. Ediciones D´utovie. Francia. 40 pp.

- Chang, S.L., Lai, H.Y., Tung, S.Y., Leu, J.Y., 2013. Dynamic Large-Scale Chromosomal Rearrangements Fuel Rapid Adaptation in Yeast Populations. *PLoS Genetics*, 9 (1) 1-24.
- Charoenchai, C., G. Fleet, and P. A. Henschke., 1998. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *Am. J. Enol. Viticult.* 49:283–288
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P., 2016. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation 7, 1–7.
- Clowers, K.J., Heilberger, J., Piotrowski, J.S., Will, J.L., Gasch, A.P., 2015. Ecological and Genetic Barriers Differentiate Natural Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Evol.* 32, 2317–2327.
- Coloretti, F., Zambonelli, C., Tini, V., 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23, 672–676.
- Combina, M., Pérez-torrado, R., Tronchoni, J., Belloch, C., Querol, A., 2012. International Journal of Food Microbiology Genome-wide gene expression of a natural hybrid between *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* under enological conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 340–345.
- Costantini, A., Doria, F., Saiz, J.C., Garcia-Moruno, E., 2017. Phage-host interactions analysis of newly characterized *Oenococcus oeni* bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 246, 12–19.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130–135.
- Coulon, A., Guillot, G., Cosson, J.F., Angibault, J.M.A., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M., Hewison, A.J.M., 2006. Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Mol. Ecol.* 15, 1669–1679.
- Cromie, G.A., Hyma, K.E., Ludlow, C.L., Garmendia-Torres, C., Gilbert, T.L., May, P., Huang, A.A., Dudley, A.M., Fay, J.C., 2013. Genomic Sequence Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Assessed by RAD-seq. *Genes, Genomes, Genetics* 3, 2163–2171.
- Cuinier, C., 1986. Le levadura spécifique. *Viticulture Tourangelle* 215: 15-18.

- de Deken, R.H., 1966. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156.
- de la Roza, C., Laca, A., García, L., and Díaz, M., 2003. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry* 38: 1451-1456.
- del Campo, G., Santos, J.I., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M.T. and Irastorza, A., 2003. Cider Produced by Two Types of Presses and Fermented in Stainless Steel and Wooden Vats. *Journal of Institute of Brewing* 109: 342-348.
- Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M., Bayonove, C.L., 1994. Glycosidase Activities of Three Enological Yeast Strains During Winemaking: Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 291–296.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J., Jeune, C. Le, 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation , for three consecutive years , in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1140–1148.
- Dietrich, H., Pour-Nikfardjam, S., 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and wine. (Ed) Springer. Chapter 17: Influence of phenolic compounds and tannins on Wine-related microorganisms, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*.
- Divol, B., Du Toit, M., Duckitt, E., 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–613.
- du Toit M, and Pretorius I.S., 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal: A review. *Am. J. Enol. Viticulture* 21: 74-96.
- Duan, S.F., Han, P.J., Wang, Q.M., Liu, W.Q., Shi, J.Y., Li, K., Zhang, X.L., Bai, F.Y., 2018. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nat. Commun.* 9, 1–13.
- Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M. y Barre, P., 1996. Effect of variety, year and grape maturity on the kinetics of alcoholic fermentation. *Am J Enol Vitic* 47, 363-368.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Fernandez, K., Bilbao, A., Huerta, A., 1994. Microbial Populations

- and Malolactic Fermentation of Apple Cider using Traditional and Modified Methods. *J. Food Sci.* 59, 1060–1064.
- Dunham, M.J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P.O., 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 99: 16144– 16149.
- Dunlop, P. C., Meyer, G. M., Ban, D. & Roon, R. J., 1978. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 253, 1297–1304.
- Dunn, B., Richter, C., Kvitek, D.J., Dunn, B., Richter, C., Kvitek, D.J., Pugh, T., Sherlock, G., 2012. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Res.* 22, 908–924.
- Durieux, A., Nicolay, X., Simon, J.-P., 2005. Application of Immobilisation Technology to Cider Production: A Review, in: V. Nedovic and R. Willaert (Eds.). pp. 275–284.
- Duvnjak, Z., Turcotte, G., Duan, Z., 1991. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem-artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 711–712.
- Eglinton, J.M., Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A. and de Barros Lopes, M., 2002. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* 19: 295-301.
- Eisele, T.A., Drake, S.R., 2005. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *J. Food Compositional Analysis.* 18: 213-221.
- Eizaguirre, J.I., Peris, D., Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., De Los Ríos, P., Hittinger, C.T., Libkind, D., 2018. Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environ. Microbiol.* 4, 1–29.
- Elsik, C., Tellan, R., Worley, K.C., 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A window to ruminant Biology and Evolution. *Science* (80). 324, 522–528.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distance among DNA Haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Fay, J.C., Benavides, J.A., 2005. Evidence for Domesticated and Wild Populations of

- Saccharomyces cerevisiae*. PLOS Genet. 1, 1–6.
- Fernandes-Salomão, T.M., Amorim, A.C.R., Chaves-Alves, V.M., Coelho, J.L.C., Silva, D.O. y Araújo, E.F., 1996. Isolation of pectinase Hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev Microbiol* 27, 15-18.
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 1, 1–17.
- Gadanhó, M., Almeida, J., and Sampaio, J.P., 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-Primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek* 84(3): 217-227.
- Galeote, V., Novo, M., Salema-oom, M., Brion, C., Valerio, E., Goncalves, P., Dequin, S., 2010. FSY1 , a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain , encodes a high-affinity fructose / H⁺ symporter. *Microbiology* 156, 3754–3761.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K.J., 2016. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* 166, 1397–1410.e16.
- Gamero, A., Hernandez-Orte, P., Querol, A., Ferreira, V., 2011. International Journal of Food Microbiology Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 33–44.
- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., Belloch, C., 2013. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1405–1414.
- Gancedo, C., and Serrano, R., 1989. Energy-yielding metabolism. In: *The yeast*, Volume 3, segunda edición. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds.). pp. 205-259, New York: Academic Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Ganga, M.A., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D., Querol, A., 1999. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 171–178.

- Gangl, H., Batusic, M., Tscheik, G., Tiefenbrunner, W., Hack, C., Lopandic, K., 2009. Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *N. Biotechnol.* 25, 244–251.
- Gayevskiy, V., Goddard, M.R., 2016. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environ. Microbiol.* 18, 1137–1147.
- Gibson, B., Liti, G., 2015. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast* 32, 17–27.
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Restuccia, C., 1999. Cryotolerant *Saccharomyces* strains and spoilage of refrigerated musts *. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 49, 155–161.
- Giudici, P., Zambonelli, C., Passarelli, P., Castellari, L., 1995. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 143–147.
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., De Vienne, D.M., Rodríguez De La Vega, R.C., Branco, S., Giraud, T., 2014. Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Mol. Ecol.* 23, 753–773.
- Goddard, M., 2008. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae* ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 89, 2392–2398.
- Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., Jun, C., 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand : evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ. Microbiol.* 12, 63–73.
- Goddard, M.R., Greig, D., 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Res.* 15, 1–6.
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, I., 2000. FSY1 , a Novel Gene Encoding a Specific Fructose /H⁺ Symporter in the Type Strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* 182, 5628–5630.
- Gonzalez, J.A., Gallardo, C.S., Pombar, A., Rego, P., Rodriguez, L.A., 2004. Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chemistry* 3, 743–750.
- Gonzalez, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces*

- cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae* , *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. FEMS Yeast Res. 6, 1221–1234.
- González, S.S., Gallo, L., Dolores, M., Barrio, E., Querol, A., 2007. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. Int. J. Food Microbiol. 116, 11–18.
- Gorter, F.A., Derks, M.F.L., Van Den Heuvel, J., Aarts, M.G.M., Zwaan, B.J., De Ridder, D., De Visser, J.A.G.M., 2017. Genomics of Adaptation Depends on the Rate of Environmental Change in Experimental Yeast Populations. Mol Biol Evol 34(10) 2613-2626.
- Gresham D, Desai MM, Tucker CM, Jenq HT, Pai DA, et al., 2008. The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. PLoS Genet 4:1-17.
- Groth, C., Hansen, J., Piskur, J., 1999. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1933–1938.
- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J., Claude, J., 2012. A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. Syst. Biol. 61, 897–911.
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C.L., Cordonner, R., 1988. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydr. Res. 184, 139–149.
- Hagler, A.N. and Ahearn, D.G., 1987. Ecology of aquatic yeasts. In: The Yeasts. Vol 1. Rose, H., y Harrison, J.S. (Eds.). Segunda edición, Cap 6, pp. 181-205. Academia Press Inc. (London) Ltd., Londres, Inglaterra.
- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, M.R.M., Hulster, E.A.F. De, Broek, M. Van Den, Pronk, J.T., Geertman, J., Daran, J., Daran-lapujade, P., Daran-lapujade, P., 2015. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid , the best of both worlds and beyond. FEMS Yeast Res. 1–14.
- Henick-Kling, T., Lee, T.H., Nicholas, D.J.D., 1986. Characterization of the lytic activity of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* isolated from wine. J. Appl. Bacteriol. 61, 525–534.
- Hernandez, L.F., Espinosa, J.C., Fernández-González, M., Briones, A., 2003a. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. Int. J. Food Microbiol. 80, 171–

- 176.
- Hernandez, L.F., Espinosa, J.C., Fernández-González, M., Briones, A., 2003b. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171–176.
- Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2006. Volatile Compounds in Cider : Inoculation Time and Fermentation Temperature Effects. *J. Inst. Brew* 112, 210–214.
- Herrero, M., Roza, C., García, L.A., and Díaz, M., 1999. Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. *Journal Industrial Microb Biotech* 22: 48-51.
- Hittinger, C.T., Rokas, A., Carroll, S.B., 2004. Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts. *PNAS* 101, 14144–14149.
- Hohmann, S., 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts *Osmotic. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.
- Hou J, Friedrich A, de Montigny J, Schacherer J., 2014. Chromosomal rearrangements as a major mechanism in the onset of reproductive isolation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol.* 24:1153–1159
- Hsu, J. C., Heatherbell, D.A., Yorgey, B.M., 1989. Effect of Fruit storage and processing on clarity, proteins and stability of Granny Smith Apple Juice. *J. Food Sci.* 54, 6–8.
- Huang, C.-J., Lee, S.-L., Chou, C.-C., 2001. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentas* L-5 under various culture conditions. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 277–282.
- Hulme, B.Y.A.C., 1958. Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits. *Industrial Research*, Larkfield England.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Hyma, K.E., Fay, J.C., 2013. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Mol. Ecol.* 22, 2917–2930.
- Ishikawa, T., Noble, A.C., 1995. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Qual. Prefer.* 6, 27–33.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., Del Olmo, M. lí, 1999. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol.*

- Bioeng. 64, 698–708.
- Izawa, S., Sato, M., Yokoigawa, K., 2004. Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae* : analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 108–114.
- Jiraneck, V., 2003. Yeast nutrition and fermentation kinetics. En: *Actas del IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*. Ed. Pszczólkowski. P., González, A.S., Prado, B., Sánchez, M.S., y Varas, M.E. (Eds.). pp. 129-136. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Johansen, B.K., 2000. Cider Production in England and France – and Denmark? *Brygmesteren* 1–15.
- Jordan, P., Choe, J., Boles, E., Oreb, M., 2016. Hxt13, Hx15, Hx16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters. *Sci. Rep.* 6, 1–10.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E.S., 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423, 241–254.
- Kodama, Y., Kielland-Brandt, M.C. y Hansen, J., 2006 Lager brewing yeast. *Top Curr Genet* 15, 145-164.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizomyces*. *FEMS Yeast Res.* 4, 233–245.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3, 417–432.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., 1998. *The yeast. A taxonomic study*. Eds Elsevier Science Publications. Amsterdam. Holanda.

- Lachance, M., Bowles, J.M., Starmer, W.T., 2003. Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast-insect-morning glory ecosystem of Kipuka Puauulu, Hawai'i. *FEMS Yeast Res.* 4, 105–111.
- Lambert, R.J.W., Pearson, J., 2000. Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J. Appl. Microbiol.* 88, 784–790.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Lang, G.I., Parsons, L., Gammie, A.E., 2013. Mutation rates, spectra, and genome-wide distribution of spontaneous mutations in mismatch repair deficient yeast. *G3 (Bethesda)* 3: 1453–1465.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., 1989. Survival factors in wine fermentation. In: Van Uden N, editor. *Alcohol toxicity in yeasts and bacteria*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 193–215
- Lawless, H.T. y Claassen, M.R., 1993. Application of the central dogma in sensory evaluation. Institute of Food Technologists.
- le Queré, J.M. and Drilleau, J.F., 1996. Trends in French Cider Microbiology Research, *Cerevisia Belg. J Brew Biotec* 21: 66-70.
- Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 177–214.
- Lea, A.G.H., 1995. Cider making. In: *Fermented Beverage Production*, pp. 81–82. (Eds.). Blackie Academic and Professional Press, London, UK.
- Leandro, M.J., Fonseca, C., Goncalves, P., 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res.* 9, 511–525.
- Leducq, J.B., Siniarsky, C., Gosset, C.C., Godé, C., Poiret, M., Blondel, C., Hautekèete, N.C., Piquot, Y., Poux, C., Valentin, B., Billiard, S., Vekemans, X., 2013. Intriguing small-scale spatial distribution of chloroplastic and nuclear diversity in the endangered plant *Biscutella neustriaca* (Brassicaceae). *Conserv. Genet.* 14, 65–77.
- Legras, J., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–2102.

- Legras, J.L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J.P., Dequin, S., 2018. Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1712–1727.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., Giraud, M., and Sampaio, J.P., 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 84(4): 313-322.
- Libkind, D., Todd, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS* 108, 1–6.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Liti, G., Barton, D.B.H., Louis, E.J., 2006. Sequence Diversity, Reproductive Isolation and Species Concepts in *Saccharomyces*. *Genetics* 174, 839–850.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., Kelly, M.J.T.O., Oudenaarden, A. Van, Barton, D.B.H., Bailes, E., Ba, A.N.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J., 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458, 337–341.
- Liu, S.Q. y Pílon, G., 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sc Technol* 35, 49-61.
- Liu, X.Z., Sang, M., Zhang, X.A., Zhang, T.K., Zhang, H.Y., He, X., Li, S.X., Sun, X.D., Zhang, Z.M., 2017. Enhancing expression of SSU1 genes in *Saccharomyces uvarum* leads to an increase in sulfite tolerance and a transcriptome profile change. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–8.
- Llauradó, J.M., Rozes, N., Constantí, M., Mas, A., 2005. Study of Some *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Winemaking after Preadaptation at Low Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1003–1011.
- Lonvaud-Funel, A., 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS*

- Microbiol. Lett. 199, 9–13.
- Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A., 2010. Natural hybrids of *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* share alleles with european wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*. FEMS Yeast Res. 10, 412–421.
- Lopes, C.A., Broock, M. Van, Querol, A., Caballero, A.C., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia . A study at different fermentation scales. J. Appl. Microbiol. 93, 608–615.
- Lopes, C.A., Lavalle, T.L., Querol, A., Caballero, A.C., 2005. Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. Antonie Van Leeuwenhoek 6, 1–10.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., Fernandez-Espinar, M.T., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. Int. J. Food Microbiol. 68, 75–81.
- López-Malo, M., Querol, A., Guillamon, J.M., 2013. Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. PLoS One 8, 1–14.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Zapparoli, G., 2018. Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method. Folia Microbiol. (Praha). 4, 1–8.
- Maechler, M., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., Studer, M., Roudier, P., Gonzalez, J., Kozłowski, K., 2018. Package “cluster”. Finding Group in Data: Cluster Analysis extended Rousseeuw. R Top. ducomented.
- Magalhães, F., Krogerus, K., Castillo, S., Ortiz-julien, A., Dequin, S., Gibson, B.R., 2017a. Exploring the potential of *Saccharomyces eubayanus* as a parent for new interspecies hybrid strains in winemaking. FEMS Yeast Res. 17, 1–29.
- Magalhães, F., Krogerus, K., Vidgren, V., Sandell, M., Gibson, B., 2017b. Improved cider fermentation performance and quality with newly generated *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 44, 1203–1213.
- Magyar, I., Tóth, T., 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata* , *Candida zemplinina* , *Saccharomyces uvarum* and

- Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28, 94–100.
- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., Ferrer, S., 2000. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. Food Res. Int. 32, 491–496.
- Mangas, J., Rodriguez, R., Moreno, J., Blanco, D., 1996. Changes in the Major Volatile Compounds of Cider Distillates During Maturation. LWT - Food Sci. Technol. 29, 357–364.
- Marjoram, P., Donnelly, P., 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. Genetics 136, 673–683.
- Markowski, J., Baron, A., Mieszczakowska, M., Plocharski, W., 2009. Chemical composition of French and Polish cloudy apple juices. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 68–74.
- Martín, M.C., Morata de Ambrosini, V.I., 2014. Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. Int. J. Food Sci. Technol. 1, 1–9.
- Martineau, B., Henick-Kling, T., 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. J. Appl. Bacteriol. 78, 526–536.
- Martini, A. and Martini A.V., 1990. Grape must fermentation. Past y Present. In: Yeast technology. Eds. Spencer J.F.T. and Spencer D. M., Springer Verlag, New York. pp 105- 123.
- Martini, A., 1992. Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodiversity and Conservation* 1: 324-333.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D., 1998. New Hybrids between *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3887–3892.
- Masneuf, I., Murat, M.L., Naumov, G.I., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2002. Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *vitis vinifera* sauvignon blanc wines. J. Int. des Sci. la Vigne du Vin 36, 205–212.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-funel, A., Dubourdieu, D., 2010. International Journal of Food Microbiology Reassessment of phenotypic traits for

- Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 79–86.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., Mendes-Faia, A., 2009. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 571–583.
- Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J.A., 2007. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 144–152.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 265–286.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W., 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 97, 647–655.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., and Polsinelli, M., 1994. Genome renewal - A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10: 1543- 1552
- Moskowitz, H.R., 1994. Product optimization: approaches and applications. En *Measurements of Food Preference* eds. Macfie, H.J.H. y Thomson, D.M.H. pp. 97-136. Londres: Blackie Academic and Professional.
- Muñoz, E., Ingledew, W.M., 1990. Effect of yeast hulls on stuck and sluggish fermentations: Importance of the lipid component. *Appl Environ Microbiol* 55:1560–1564.
- Nardi, T., Corich, V., Giacomini, A., Blondin, B., 2010. A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene SSU1 in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Microbiology* 156, 1686–1696.
- Naumov, G.I., 2017. Genetic Relationship and Biological Status of the Industrially Important Yeast *Saccharomyces bayanus* Sampaio et al. *Dokl. Biol. Sci.* 473, 622–625.
- Naumov, G.I., Masneuf, I., Naumova, E.S., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2000. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines : genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.* 151, 683–691.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Antunovics, Z., Sipiczki, M., 2002. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59,

- 727–730.
- Naumov, G.I., Nguyen, H., Naumova, E.S., Michel, A., Aigle, M., Gaillardin, C., 2001. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus var. uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 163–171.
- Nedovic, V.A., Durieux, A., Van Nedervele, L., Rosseels, P., Vandegans, J., Plaisant, A. M., and Simon, J.P., 2000. Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 834-839.
- Nei, J. and Kumar, I., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Ed Oxford University Press, Inc. 1-297 pp.
- Nei, M., Li, W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 5269–5273.
- Nevoigt, E., 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 379–412.
- Nevoigt, E., Stahl, U., 1997. Osmoregulation and glicerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb Review* 21: 231–241.
- Nguyen, H., Lepingle, A., Gaillardin, C., 2000. Molecular Typing Demonstrates Homogeneity of *Saccharomyces uvarum* Strains and Reveals the Existence of Hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, Including the *S. bayanus* Type Strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 71–85.
- Nicolini, G., Larcher, R. y Versini, G., 2004. Status of yeast assimilable nitrogen in italian grape musts and effects of variety, ripening and vintage. *Vitis* 43, 89-96.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S., 2009. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *PNAS* 106, 16333–16338.
- Novo, M.T., Beltran, G., Poblet, M., Rozes, N., Guillamón, J.M., Mas, A., Roze, N., 2003. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 153–161.
- Oliveira, B.M., Barrio, E., Querol, A., Perez-Torrado, R., 2014. Enhanced Enzymatic Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase from the Cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *PLoS One* 9, 1–12.

- Origone, A.C., 2017. Caracterización molecular y fisiológica de cepas patagónicas de *S. eubayanus*, *S. uvarum* e híbridos interesepecíficos para su uso en enología. Tesis Dr. Univ. Nac. del Comahue-Argentina:226pp.
- Origone, A.C., del Mónaco, S.M., Ávila, J.R., González Flores, M., Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., 2017. Tolerance to winemaking stress conditions of Patagonian strains of *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum*. *J. Appl. Microbiol.* 123, 450–463.
- Origone, A.C., Rodríguez, M.E., Oteiza, J.M., Querol, A., Lopes, C.A., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast* 35, 157–171.
- Orlic, S., Vojvoda, T., Huić-Babić, K., Arroyo-lópez, F.N., Comi, G., 2010. Diversity and oenological characterization of indigenous ilavka grapes *Saccharomyces cerevisiae* associated with Zilavka grapes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1483–1489.
- Paillard, N., 1990. The flavour of apples, pears and quinces. In: Norton, I., Macleod, A. (Eds.), *Food Flavours*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 1–4.
- Pando Bedriñana, R., Mangas Alonso, J.J., Suarez Valles, B., 2017. Evaluating of autochthonous *Saccharomyces bayanus* strains under stress conditions for making ice ciders. *LWT* 81, 217-225.
- Pando Bedriñana, R., Queipo, A.L., Suarez-Valles, B., 2012. Screening of enzymatic activities in non-*Saccharomyces* cider yeast. *J. Food Biochem.* 36, 683–689.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., Suárez Valles, B., 2010. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* 27, 503–508.
- Pardo, L.O., Pizarro, J.L., 2005. *La chicha en el Chile precolombino*. Santiago: Sociedad Editorial Mare Nostrum 155pp.
- Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., Barrio, E., 2002. Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains. *Genome Res.* 12, 1533–1539.
- Pérez-Torrado, R., Rantsiou, K., Perrone, B., Navarro-Tapia, E., Querol, A., Cocolin, L., 2017. Ecological interactions among *Saccharomyces cerevisiae* strains: insight into

- the dominance phenomenon. *Sci. Rep.* 7, 1–10.
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A., 2014. Stabilization process in *Saccharomyces* intra- and interspecific hybrids in fermentative conditions. *Int. Microbiol.* 17, 213–224.
- Peris, D., Arias, A., Orli, S., Belloch, C., Pérez-Través, L., Querol, A., Barrio, E., 2017a. Mitochondrial introgression suggest extensive ancestral hybridization events among *Saccharomyces* species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48, 49–60.
- Peris, D., Langdon, Q.K., Moriarty, R. V, Sylvester, K., Bontrager, M., Charron, G., Leducq, J., Landry, C.R., Libkind, D., Hittinger, C.T., 2016. Complex Ancestries of Lager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLOS Genet.* 12, 1–20.
- Peris, D., Lopes, C.A., Arias, A., Barrio, E., 2012. Reconstruction of the Evolutionary History of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. kudriavzevii* Hybrids Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS One* 7, 1–14.
- Peris, D., Moriarty, R. V, Alexander, W.G., Baker, E., Sylvester, K., Sardi, M., Langdon, Q.K., Libkind, D., Wang, Q.M., Bai, F.Y., Leducq, J.B., Charron, G., Landry, C.R., Sampaio, J.P., Gonçalves, P., Hyma, K.E., Fay, J.C., Sato, T.K., Hittinger, C.T., 2017b. Biotechnology for Biofuels Hybridization and adaptive evolution of diverse *Saccharomyces* species for cellulosic biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–19.
- Peris, D., Sylvester, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Alexander, W.G., Hittinger, C.T., 2014. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol. Ecol.* 23, 2031–2045.
- Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., Rantsiou, K., 2013. Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 156–162.
- Phaff, H.J. and Starmer, W.T., 1987. Yeast associated with plants, insects and soil. En: *The Yeasts*. Vol 1. Rose, H., y Harrison, J.S. (Eds.). Segunda edición, Cap. 5. pp. 123–180. Academic Press Inc. (London) Ltd., Londres, Inglaterra.
- Picinelli, A., Suárez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L.M., Mangas, J.J., 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3997–4002.

- Pimentel, M.S., Silva, M.H., Cortês, I., Faia, A.M., 1994. Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 42–48.
- Pina, C., Santos, C., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non- *Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* — influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21, 439–447.
- Pinheiro J., Bates D., Debroy S., 2009. Sarkar and the R Core Team. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-96. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186.
- Piyasena, P., Rayner, M., Bartlett, F.M., Lu X., and McKellar, R.C., 2002. Characterization of Apples and Apple Cider Produced by a Guelph Area Orchard. *Lebensm – Wiss. U. – Technology* 35: 622-627.
- Pretorius, I.S. and Høj, P.B., 2005. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Austr J G Wine Res* 11: 83–108.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Prior, B.A. and Hohmann, S., 1996. Glycerol production and osmoregulation. En *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications* eds Zimmerman, F.K. and Entian, K.D. pp 313-338.
- Pronk, J.T., Steensma, H., and van Dijken, A.J.P., 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1607-1633.
- Quan, A.S., Eisen, M.B., 2018. The ecology of the drosophila-yeast mutualism in wineries. *PLoS One* 13, 1–25.
- Querol, A. and Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sc Tech*, 7: 73-78.
- Querol, A., Barrio E., Ramón D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.
- Querol, A., Barrio, E., 2003. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Int. Microbiol.* 6, 201–205.

- R core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainieri, S., Pretorius, I., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50, 15–31.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J.E., Pulvirenti, A., Giudici, P., 1999. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 177–185.
- Ramos, C.L., Duarte, W.F., Freire, A.L., Dias, D.R., Cristina, E., Eleutherio, A., Schwan, R.F., 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 935–944.
- Ray, N., Currat, M., Excoffier, L., 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol. Biol. Evol.* 20, 76–86.
- Redzepovic, S., Orlić, S., Sikora, S., Majdak, A., Pretorius, I.S., 2002. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 305–310.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 1990. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 321–366.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud-Funel, A., 2006. *Handbook of Enology. Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications.*
- Rodriguez, M.E., Pérez-Tráves, L., Sangorrin, M.P., Barrio, E., Lopes, C.A., Lopes, 2014. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 14, 948–965.
- Rodriguez, M.E., Pérez-Tráves, L., Sangorrín, M.P., Barrio, E., Querol, A., Lopes, C.A., 2017. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–11.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 169-180.
- Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P., 1994. Characterization of β -Glucosidase activity in yeast of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519–527.

- Rous, C. V., Snow, R., 1983. Reduction of Higher Alcohols By Fermentation With a Leucine-Auxotrophic Mutant of Wine Yeast. *J. Inst. Brew.* 89, 274–278.
- Rowles, K., 2000. Processed apple product marketing analysis: Hard Cider & Apple Wine. College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, New York.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J.P., Broock, M.R. Van, 2008. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia , Argentina). *FEMS Yeast Res.* 1, 1–10.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J.P., Van Brook, M., 2006. Levaduras del Río Agrio y el lago Caviahue, un ambiente acuático ácido y de origen volcánico (Neuquén, Argentina) *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 41 (3-4): 167-175.
-
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechq* 34(2), 374-8.
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Dijck, P. Van, Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454–461.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo* 4, 406–425.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. and Lindsey, G., 2000. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* 1463, 267–278
- Salou, P., Loubiere, P., Pareilleux, A., 1994. Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1459–1466.
- Salvadó, Z., Arroyo-lópez, F.N., Guillamón, J.M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E., 2011. Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2292–2302.
- Sampaio, J.P., Goncalves, P., 2008. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae*. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 74, 2144–2152.
- Sánchez, A., Rodríguez, R., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2010. Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Res. Int.* 43, 2101–2107.
- Sangorin, M.P., Zajonskovsky, I., Broock, M. Van, Caballero, A., 2002. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old patagonian winery. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 115–120.
- Sato, K., Ito, Y., Yomo, T., Kaneko, K., 2003. On the relation between fluctuation and response in biological systems. *PNAS* 100, 14086–14090.
- Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M., Hittinger, C.T., 2011. The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics : New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *Genes, Genomes, Genet.* 1, 11–25.
- Schieber, A., Keller, P., Carle, R., 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 910, 265–273.
- Scott, J.A., O'Reilly, A.M., 1996. Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem.* 31, 111–117.
- Segre, A. V., Murray, A.W., Leu, J., 2006. High-resolution mutation ampping reveals parallel experimental evolution in yeast. *Plos Biol.* 4, 1372–1385.
- Selmecki, A.M., Dulmage, K., Cowen, L.E., Anderson, J.B., Berman, J., 2009. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genet* 5:1-14.
- Serra, A., P. Strehaiano, and P. Taillandier., 2005. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus var. uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int. J. Food Microbiol.* 104:257–265.
- Shannon, C., Weaver, W., 1964. *The mathematical Theory of communication.*
- Sicard, D., Legras, J., 2011. *Comptes Rendus Biologies Bread , beer and wine : Yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex.* *Comptes rendus - Biol.* 334, 229–236.

- Silva-Bedoya, L.M., Ramírez-Castrillón, M., Osorio-Cadavid, E., 2014. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazilian J. Microbiol.* 45, 135–142.
- Sipiczki, M., 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* 1, 1–12.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z., 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 97–105.
- Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 299–306.
- Soden A., Francis I. L., Gockowiak H., Lee T.H. and Henschke P.A., 1998. The use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. In *Proceedings Tenth Australian Wine Industry Technical Conference*. Ed. Blair R.J., Sas A.N., Hayes P.F. and Hoj P.B. Sydney, New South Wales, Australia. pp. 166-171.
- Solieri, L., 2010. Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends Microbiol.* 18, 521–530.
- Sørensen, B. J., and M. Jakobsen., 1997. The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 34:209–220.
- Spor, A., Nidelet, T., Simon, J., Bourgais, A., Vienne, D. De, Sicard, D., 2009. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Evol. Biol.* 9, 1–12.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J., Stanley, G.A., 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 13–24.
- Starovoytova, A.N., Sorokin, M.I., Sokolov, S.S., Severin, F.F., Knorre, D.A., 2013. Mitochondrial signaling in *Saccharomyces cerevisiae* pseudohyphae formation induced by butanol. *FEMS Yeast Res.* 13, 367–374.

- Stern, D.L., 2013. The genetic causes of convergent evolution. *Nature Reviews Genetics* 14: 751-764
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Rensburg, P. Van, 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-torrado, R., Querol, A., 2015. International Journal of Food Microbiology *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic prec. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 41–46.
- Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F., 2011. Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1145–1159.
- Suárez Lepe, J.A., 1997. En: *Levaduras vónicas. Funcionalidad y uso en bodega*. Capítulo III. Ediciones. Mundi Prensa. Madrid.
- Suárez Valles, B., Bedriñana, R. P, Fernández Tascón, N., Querol Simón, A., and Rodríguez Madrera, R., 2007a. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24: 25-31.
- Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Gonzalez Garcia, A., Querol, A., 2007b. A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 103, 778–786.
- Suarez-Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernandez-Tascón, N., Gonzalez-Garcia, A., Rodríguez Madrera, R., 2005. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 455–461.
- Sutherland, F.C.W., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A., Kilian, S.G., 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 7790–7795.
- Suzuki, R., Shimodaira, H., 2006. Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22, 1540–1542.
- Suzzi, G., Schirone, M., Sergi, M., Marianella, R.M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Tofalo, R., 2012. Multistarter from organic viticulture for red wine Montepulciano d' Abruzzo production 3, 1–10.

- Sweeney, J.Y., Kuehne, H.A., Sniegowski, P.D., 2004. Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast Res.* 4, 521–525.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Microb. Modul. wine aroma flavour* 11, 139–173.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2005. Yeast Modulation of Wine Flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 131–175.
- Tajima, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.B., Chait, R., Hartl, D.L., 2011. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44: 101–105.
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozés, N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 127–136.
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., Ancín, C., 2003. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control* 14, 565–571.
- Tosi, E., Azzolini, M., Guzzo, F., Zapparoli, G., 2009. Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. *J. Appl. Microbiol.* 107, 210–218.
- Treu, L., Campanaro, S., Nadai, C., Toniolo, C., Nardi, T., Giacomini, A., Valle, G., Blondin, B., Corich, V., 2014. Oxidative stress response and nitrogen utilization are strongly variable in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with different fermentation performances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4119–4135.

- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 237–243.
- Ugliano, M., 2009. Wine chemistry and biochemistry. Chapter 4. Enzymes in Winemaking. 103-121.
- Ulbrich, M. and Saller, W., 1951. Investigations of the practicality of aeration of pure cultures of commercial wine yeasts. *Rebe Wein, Ser. A. (Klosterneuburg)*, 1: 94-104.
- Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171–180.
- Valadi, Å., Granath, K., Gustafsson, L., Adler, L., 2004. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.* 279, 39677–39685.
- Vandermeer, J.H., 1972. Niche Theory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3, 107–132.
- Vendramini, C., Beltran, G., Nadai, C., Giacomini, A., Mas, A., Corich, V., 2017. The role of nitrogen uptake on the competition ability of three vineyard *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 258, 1–11.
- Vidrih, R., Hribar, J., 1999. Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chem.* 67, 287–294.
- Vishniac, H.S., and Onofri, S., 2003. *Cryptococcus antarcticus* var. *circumpolarensis* var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek* 83(3): 231-233.
- Voordeckers, K., Kominek, J., Das, A., Espinosa-Cantú, A., De Maeyer, D., Arslan, A., Van Pee, M., van der Zande, E., Meert, W., Yang, Y., Zhu, B., Marchal, K., DeLuna, A., Van Noort, V., Jelier, R., Verstrepen, K.J., 2015. Adaptation to High Ethanol Reveals Complex Evolutionary Pathways. *PLoS Genet.* 11, 1–31.
- Wang, S.A., Bai, F.Y., 2008. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 510–514.
- Warren, A., Maria, C., Pascal, D., Guichoux, E., Sherman, D.J., Marullo, P., 2017. Many

- interspecific chromosomal introgressions are highly prevalent in Holartic *Saccharomyces uvarum* strains found in human-related fermentations. *Yeast* 27, 1–31.
- Xu, Y., Zhao, G., Pan, H., and Li, J., 2005. Effects of Inhibitory Environmental Factors on Growth of *Oenococcus oeni* CCSYU2068 for Malolactic Fermentation of Cider Production. *Journal of Institute of Brewing* 11: 223-228.
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T., Yoshimoto, H., 2008. Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2787–2796.
- Yuasa, N., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y., 2004. Distribution of the sulfite resistance gene SSU1-R and the variation in its promoter region in wine yeasts. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 394–397.
- Zamora, F., 2009. Biochemistry of alcohol fermentation. En *Wine Chemistry and Biochemistry* eds. Moreno-Arribas, M.V. y Polo, M.C. pp 3-26. New York: Springer Science Business.
- Zhang, H., Richards, K.D., Wilson, S., Lee, S.A., Sheehan, H., Roncoroni, M., Gardner, R.C., 2015. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries. *Food Microbiol.* 46, 92–99.
- Zhang, H., Skelton, A., Gardner, R.C., Goddard, M.R., 2010. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids. *FEMS Yeast Res.* 10, 941–947.
- Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., 2014. QTL Dissection of Lag Phase in Wine Fermentation Reveals a New Translocation Responsible for *Saccharomyces cerevisiae* Adaptation to Sulfite. *PLoS One* 9, 1–11.
- Zoecklein, B.W., Marcy, J.E., Williams, J.M., Jasinski, Y., 1997. Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J. Food Compos. Anal.* 10, 55–65.

Citas WEB

- Empresa que comercializa levaduras para sidra en California: Gusmer Enterprice, Inc ®:** <https://www.gusmerenterprises.com/>
- Acceso a software PhyloGeo para análisis biogeográficos:** <http://phylogeoviz.org>
- Acceso a software Network:** <http://www.fluxus-engineering.com/>
- Noticias relacionadas a actividades por parte de productores regionales de sidra:**
https://www.clarin.com/entremujeres/bienestar/despues-cerveza-hora-sidra-artesanal_0_S1DbIzh2g.html
- <https://www.rionegro.com.ar/yo-como/bodegas/peer-la-sidra-patagonica-que-no-para-de-crecer-NK3927618>
- <https://www.cronista.com/negocios/La-sidra-se-reinvento-con-marcas-premium-para-ganar-mercado-durante-todo-el-ano-20161221-0046.html>
- Información sobre valor nutricional de la manzana: USDA (United Estate Department of Agriculture):**
https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2010/index.php
- Informe cadena de Valor de la Sidra en Argentina por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2016:**
https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf
- Secretaría de Fruticultura de Río Negro, Alimentos Argentinos, Informe 2010:**
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/AyB/bebidas/productos/Sidra_2011_09Sep.pdf
- ANMAT 2012:** http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/capitulo_xiii.pdf



Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking



Melisa González Flores^a, María Eugenia Rodríguez^{a,b}, Juan Martín Oteiza^c,
Raúl Jorge Barbagelata^a, Christian Ariel Lopes^{a,d,*}

^a Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, PROBIEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina – Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300), Neuquén, Argentina

^b Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

^c Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI) – CONICET, Argentina

^d Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2016

Received in revised form 9 February 2017

Accepted 28 February 2017

Available online 01 March 2017

Keywords:

Cryotolerant yeast
Cider
Aroma
Diversity

ABSTRACT

A diversity of yeast strains belonging to the cryotolerant fermentative species *S. uvarum* and *S. eubayanus* have been recovered from natural habitats and traditional fermentations in North Patagonia. The aim of this work was to evaluate the most relevant physiological features in a set of Patagonian strains belonging to *S. uvarum* and *S. eubayanus*, in order to analyze their potentiality to be used as starter cultures for cidermaking elaborated at low temperature.

We evidenced that *S. uvarum* strains isolated from natural habitats (*Araucaria araucana* bark) showed similar physiological features to *S. eubayanus* strains obtained from the same habitat, and different from *S. uvarum* strains from fermentative environments (apple *chichas*). We also confirm the capacity of *S. uvarum* to produce high glycerol levels, low acetic acid and elevated production of the higher alcohol 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate and demonstrated similar properties in *S. eubayanus*. Finally, we evidenced for the first time the antagonistic activity of *S. eubayanus* and selected three strains (two *S. uvarum* and one *S. eubayanus*) bearing the best combination of features to be used as a starter culture in cidermaking.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Apple (*Malus domestica* Borkh) is one of the most important fruit crops in temperate regions worldwide. Apple-based beverages such as ciders have been consumed for centuries by the peoples of Eurasia, even before the advent of the cultivated apple (Cornille et al., 2014). Cider is an alcoholic beverage typically produced in many European countries such as Germany, England, Scotland, France, Spain, Ireland and Slovenia. After colonization it was introduced in temperate regions of America and the earliest reports about cider elaboration in Argentina are associated with the Paraná River delta after 1900 a.C. Nowadays, the cider production is mainly concentrated in North Patagonia (86% of the

national production) and Cuyo, regions that concentrate the production of pears and apples (Barbagelata, 2010).

As most fermented beverages, the alcoholic fermentation responsible for cider elaboration can be carried out spontaneously, by making use of the naturally occurring indigenous yeast species (Morrissey et al., 2004), or conducted by a selected yeast starter culture.

The spontaneous or natural biological conversion of apple must into cider is known to involve a complex mixture of many different yeast species that can vary according to climatic conditions, apple varieties and applied technology (Cabranes et al., 1990; del Campo et al., 2003; Suárez-Valles et al., 2007). However, those species belonging to *Saccharomyces* genus – and particularly *Saccharomyces cerevisiae* – dominate the alcoholic fermentation from the middle stages until the finalization of the process (Morrissey et al., 2004; Pando Bedriñana et al., 2010; Suárez-Valles et al., 2007). Due to its excellent fermentative behavior, selected strains of this species have been the traditionally chosen microorganisms to perform starter cultures for ciders and wines (Pretorius, 2000; Suárez-Valles et al., 2005). The use of these pure cultures of yeasts, generally in the form of active dry yeast, provide a useful tool

* Corresponding author at: Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, PROBIEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina – Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300), Neuquén, Argentina.

E-mail address: clopes@conicet.gov.ar (C.A. Lopes).

for standardizing the product allowing the obtention of beverages with similar features year after year (Fleet and Heard, 1993).

Although *S. cerevisiae* has been isolated from most natural cider fermentations, another species of the genus known as *Saccharomyces uvarum* (in old publications is also referred as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*) has been obtained from ciders elaborated in specific regions, particularly from those conducted at low temperatures (Naumov et al., 2001; Suárez-Valles et al., 2007). This species has been also associated with certain wines as Tokaj (Hungary, Slovakia), Amaro (Italy) and Txakoli (Spain), as well as from French wines as Sauternes and the whites in Burgundy, Champagne, Val de Loire and Alsace (Demuyter et al., 2004; Naumov et al., 2000; Naumov et al., 2002; Rementeria et al., 2003; Sipiczki et al., 2001; Torriani et al., 1999).

S. uvarum has a particular fermentation profile characterized by, besides its preferences for low temperature fermentation, a lower acetic acid and ethanol but more glycerol and succinic acid concentrations than *S. cerevisiae*, while synthesizing malic acid without posterior degradation (Bertolini et al., 1996; Giudici et al., 1995; Kishimoto et al., 1993). Moreover, *S. uvarum* produces high concentrations of desirable volatile fermentative compounds such as phenylethanol and its acetate (Masneuf-Pomarède et al., 2010) as well as volatile thiols (Masneuf et al., 2002).

An appreciable number of strains belonging to *S. uvarum* species have been isolated from fermented beverages in Europe and only a few strains were obtained from natural environments in both Europe and North America. In South America the situation is different; a huge natural population of *S. uvarum* has been found in Patagonian forests together with its sibling species *Saccharomyces eubayanus* (Almeida et al., 2014; Libkind et al., 2011; Rodríguez et al., 2014), and only a few were obtained from traditional apple chicha fermentations (Rodríguez et al., 2017).

S. eubayanus has never been found in association with fermented beverages and, besides Patagonian strains, this species was only recovered from the Tibetan Plateau in West China (Bing et al., 2014), North America (Peris et al., 2014; Peris et al., 2016) and New Zealand (Gayevskiy and Goddard, 2016). However, this species has been proposed to constitute one of the parental species of the natural hybrids *S. pastorianus* and *S. bayanus* (Libkind et al., 2011), associated with the elaboration of diverse alcoholic fermented beverages including beer, cider and wine (Pérez-Través et al., 2014). Due to its recent discovering, no works about the potential use of *S. eubayanus* in the elaboration of fermented beverages have been published until now. However, due to its close phylogenetic relationship with *S. uvarum*, *S. bayanus* and *S. pastorianus*, this species could become a biotechnologically relevant microorganism for the fermented beverages industry.

In our laboratory, we possess a diversity of both *S. uvarum* and *S. eubayanus* strains recovered from natural habitats as well as from traditional fermentations that could exhibit interesting features for the development of starter cultures. The presence of *S. uvarum* in ciders and apple chichas make us to think about the potential of this two species in cidermaking. The aim of this work was to

evaluate the most relevant physiological features in a set of Patagonian strains belonging to *S. uvarum* and *S. eubayanus*, in order to evaluate their potentiality to be used as starter cultures for cidermaking.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains

Nineteen *S. uvarum* and thirteen *S. eubayanus* strains previously isolated, identified and molecularly characterized in our laboratory were used in this study. The strains were obtained from both *A. araucana* trees and traditionally produced apple chicha (Table 1). An indigenous *S. cerevisiae* strain obtained from North Patagonian natural Malbec wine fermentations was used with comparative purpose. All strains are deposited in the North Patagonian Culture Collection (NPCC), Neuquén, Argentina.

2.2. Laboratory scale fermentations

Laboratory scale fermentations were carried out in 50 mL flasks containing 35 mL of sterilized (120 °C, 15 min) Royal Gala apple juice from harvest 2012 (°Brix: 11.9, density: 1.056 g L⁻¹, total reducing sugars: 125.7 g L⁻¹; total acidity: 4.73 g L⁻¹; total SO₂: 112 mg L⁻¹; free SO₂: 70 mg L⁻¹; pH: 3.56). Fermentations were inoculated individually with 2 · 10⁶ CFU mL⁻¹ of the respective yeast strain and incubated at 25 °C without shaking. The fermentation evolution was daily followed by weight loss until constant weight during two consecutive measures. Experiments were carried out in triplicate.

Scaled up fermentations (1 L flasks containing 800 mL must) were carried out with a strain of each species and origin in two different apple juices: Granny Smith (°Brix: 12.5, density: 1.058 g L⁻¹, total reducing sugars: 132.3 g L⁻¹; total acidity: 5.58 g L⁻¹; total SO₂: 90 mg L⁻¹; free SO₂: 58 mg L⁻¹; pH: 3.54) and the same Royal Gala previously described. The fermentations were conducted at 25 °C and in this case, fermentation evolution was monitored by daily measuring °Brix. Fermentations were carried out in duplicate.

2.3. Enological parameters

Most general enological parameters were determined according to the methods proposed by Ribereau-Gayon et al. (2003). Ethanol concentration was determined by steam distillation and expressed as Gay Lussac degrees (°GL or % v/v). Volatile acidity was determined by steam distillation followed by titration with NaOH 0.1 N and it was expressed as acetic acid (g L⁻¹). Total acidity was determined by direct titration using NaOH 0.1 N at 20 °C and expressed as tartaric acid (g L⁻¹). Free SO₂ was determined by direct titration with iodine and total SO₂ was determined by sample treatment with KOH (1 N) followed by titration with iodine. Glucose, fructose and glycerol concentrations were determined enzymatically using Boehringer Mannheim commercial kits.

Table 1
List of yeast strains used in this study.

Species	Strain (NPCC number)	Origin ^a	Sources
<i>S. eubayanus</i>	1282–1287, 1291–1292, 1294, 1296–1297, 1301–1302	<i>Araucaria araucana</i>	Rodríguez et al. (2014)
<i>S. uvarum</i>	1288–1290, 1293, 1298	<i>Araucaria araucana</i>	Rodríguez et al. (2014)
	1309, 1311, 1314–1317, 1320–1324, 1328–1330	Apple chicha	Rodríguez et al. (2017)
<i>S. cerevisiae</i>	1178 (MMf9)	Wine	Lopes et al. (2002)

NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

^a *Araucaria araucana*: yeast strains were obtained from bark or seed samples collected from three different sampling areas in Northwestern Patagonia, Argentina: Caviahue (*S. eubayanus* NPCC 1282–1287), Tromen (*S. eubayanus* NPCC 1291, 1292, 1294, 1296, 1297, 1301, 1302; *S. uvarum* NPCC 1288, 1290, 1298) and Huechulafquen (*S. uvarum* NPCC 1289, 1293) during 2011 summer season. Apple chicha: yeast strains were isolated from musts obtained from feral apples collected in three different areas of Chile: Tirúa (*S. uvarum* NPCC 1315, 1316, 1320–1322), Villarrica (*S. uvarum* NPCC 1309, 1311, 1323, 1324) and Pucón (*S. uvarum* NPCC 1314, 1317) during 2011 summer season. Wine: *S. cerevisiae* NPCC 1178 was isolated from Malbec grape must in Cipolletti, Río Negro, Argentina, during 1999 autumn season.

2.4. Higher alcohols, esters, acetaldehyde and terpenes determinations

Aliquots of the fermented product were analyzed by headspace solid-phase-microextraction sampling (SPME) using 50/30 μm DVB/CAR/PDMS fibers (Sigma-Aldrich) and GC according to Rojas et al. (2001). Aliquots of 1.5 mL of the samples were placed in 15 mL vials and 0.3 g of NaCl and 15 μL of 0.1% (v/v) 2-octanol in ethanol were added as internal standard. The vials were closed with screwed caps and 3 mm thick teflon septa. Fibers were injected through the vial septum and exposed to the headspace for 30 min and then desorbed during 10 min in an HP 7890 series II gas chromatograph equipped with an HP Innowax column (Hewlett-Packard) (length, 60 m; inside diameter, 0.32 mm; film thickness, 0.50 μm). The injection block and detector (FID) temperatures were kept constant at 220 and 250 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 40 (7 min) to 180 $^{\circ}\text{C}$ at 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and 200 to 260 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and kept 15 min at 260 $^{\circ}\text{C}$. Total running time: 75 min.

The following standards were purchased from Sigma Aldrich: isobutyl alcohol, isoamyl alcohol, 1-hexanol, benzyl alcohol, 2-phenyl ethanol, ethyl acetate, isobutyl acetate, ethyl lactate, isoamyl acetate, hexyl acetate, diethyl succinate, benzyl acetate, ethyl caprylate, ethyl 3-hydroxybutanoate, 2-pentylethyl acetate, 4-terpineol, limonene, linalool, nerol and geraniol. All standards were of >99% purity. Values calculated for each different compound were the average of two independent assays.

2.5. Organic acids determinations

Organic acids were determined by HPLC using a Liquid Chromatograph with UV-visible detector (Shimadzu), according to Official Methods of Analysis AOAC International. The equipment also contained Bomb LC 20AT, Column oven CTO 6A, Controller CBM 20A, autoinjector SIL 10 A, Detector Diode Array SPD-M10A and a computer software data acquisition LC Solution. The samples were filtered through a 0.45 μm nylon filters and directly injected (10 μL) onto the chromatographic column. Standard solutions (malic acid, lactic acid, acetic acid and shikimic acid) were prepared by dilution of the individual compounds in ultra-pure water.

2.6. Enzyme screening methods

Qualitative assays of enzymatic activity detection were performed on solid media using fresh yeast cultures (24–48 h cultures in GPY).

2.6.1. Protease activity

Skim milk agar plates containing basic medium agar (w/v: 0.67% YNB, 0.2% glucose and 2% agar) were supplemented with 1% w/v skim milk powder, inoculated with fresh yeast cultures and incubated at 26 $^{\circ}\text{C}$ for 3 days. The appearance of clear halos around the yeast streak was indicative of proteolytic activity (González et al., 2004).

2.6.2. Pectinase activity

Pectinase activity was evaluated using basic medium supplemented with 1% w/v apple pectin (pH 4.5). Plates were incubated at 26 $^{\circ}\text{C}$ for 5 days. Enzyme activity was evidenced by the formation of a clear zone around the colonies against a purple-brown background on pectin plate after Lugol's solution addition (Fernandes-Salomão et al., 1996).

2.6.3. Glycosidase activities

Tubes (1.5 mL) containing 500 μL of basic medium agar added with 1 mM

p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) and *p*-nitrophenyl- β -D-xyloside (pNPX) to evaluate β -glucosidase (β Gl) and β -xylosidase (β Xy) activities, respectively (Rodríguez et al., 2004). Cultures were incubated at 26 $^{\circ}\text{C}$ for 5 days. Yeast strains showing enzymatic activities developed a yellow coloration in the culture medium after addition of

250 mM Na_2CO_3 buffer (100 μL). Agar esculin medium (w/v: 0.67% YNB, 0.5% esculin, 0.1% glucose, 0.02% ferric ammonium citrate, 2% agar; pH 5) was also tested to confirm β Gl activity. In this case, strains showing β Gl activity produced a dark brown halo around the colony (Hernández et al., 2003).

2.7. Antagonist activity

Antagonistic activity was evaluated using the seeded-agar-plate technique on YEPD-MB medium (w/v: 1% yeast extract, 2% glucose, 2% peptone, 2% agar, 0.0003% methylene blue) buffered at pH 4.6 with 0.5 M phosphate-citrate (Sangorrín et al., 2002). The collection strains *S. cerevisiae* P351 (PROIMI yeast collection) and *Candida glabrata* NCYC 388 were used as sensitive yeasts.

2.8. Statistical analysis

2.8.1. Kinetic parameters in microfermentations (50 mL)

Kinetic parameters were calculated from each fermentation individually using the amount of CO_2 lost daily by the system and the reparametrized Gompertz equation proposed by Zwietering et al. (1990):

$$y = A * \exp(- \exp(((\mu_{\max} * e)/A) * (\lambda - t) + 1))$$

where $y = \ln(N_t / N_0)$, N_0 is the initial weight of the system (g) and N_t weight at time t ; $A = \ln(N_{\infty}/N_0)$ is the maximum CO_2 production with N_{∞} as the asymptotic maximum, μ_{\max} is the maximum fermentation rate (h^{-1}), and λ the period of time needed to start the vigorous fermentation. Growth data from each treatment and yeast were fitted by a non-linear regression, minimizing the sum of squares of the difference between experimental data and the fitted model (observed – predicted)². This analysis was carried out using the non-linear module of the Statistica 7.0 software package and its Quasi-Newton option.

2.8.2. Kinetic parameters in 1 L fermentations

$^{\circ}\text{Brix}$ decrease during 1 L fermentations was fitted to the Exponential decay function previously used by Arroyo-López et al. (2008): $Y = D + S * e^{-K * t}$. Where Y is the final $^{\circ}\text{Brix}$ value, t is the time (h), D is a specific value when $t \rightarrow \infty$, S is the estimated value of change, and K is the kinetic constant (h^{-1}).

ANOVA and Tukey honest significant difference tests (HSD) with $\alpha = 0.05$ were performed by mean comparison of kinetic and physiological analysis. The data normality and variance homogeneity in the residuals were verified by Lilliefors and Bartlett tests respectively. Principal component analysis (PCA) and clusters analysis (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) were performed on kinetic and physicochemical variables using the NTSYS program (Numerical Taxonomic System version 2.11) (Rohlf, 2000). RStudio.Version (3.3.2) with pvclust statistical package was used for bootstrapping (R Core Team, 2016).

3. Results

3.1. Physiological characterization

3.1.1. Enological features in laboratory scale fermentations

All 32 *Saccharomyces* strains belonging to different cryotolerant yeast species (*S. uvarum* and *S. eubayanus*) and origin (*A. araucana* and *chicha*) were tested for their main enological properties in microfermentation trials (50 mL flasks) using Royal Gala apple juice. Kinetic and physicochemical parameters obtained from these fermentations are shown in Supplementary material Table 1. As a general rule, all strains completed the alcoholic fermentations, evidencing residual amounts of total reducing sugars (glucose + fructose) lesser than 0.6 g L^{-1} . Main differences among strains were observed in the kinetic

Table 2
Enzymatic and antagonist activities of *S. uvarum* and *S. eubayanus* strains.

Species	Origin	Strain (NPCC number) ^a	Enzymatic activities (substrate) ^b					Antagonist activity ^c	
			Protease (skim milk)	Pectinase (citric pectin)	βGI (pNPG)	βGI (esculin)	βXy (pNPX)	Cg	Sc
<i>S. eubayanus</i>	<i>A. araucana</i>	1282	–	+	+	+	+	–	–
		1283, 1284, 1286, 1287, 1296	–	+	+	–	+	–	–
		1285	–	+	+	–	+	–	+
		1291, 1292, 1294	–	+	+	+	+	–	+
		1297, 1302	–	+	+	–	+	+	+
		1301	–	–	+	+	+	–	–
<i>S. uvarum</i>	<i>Chicha</i>	1289	+	+	+	–	+	–	–
		1288, 1290	+	+	+	+	+	–	–
		1293, 1298	+	–	+	–	+	–	–
		1309	–	+	+	+	+	–	+
		1316	+	+	+	–	+	–	–
		1320, 1321, 1330	+	+	+	+	+	–	–
		1317, 1328, 1329	+	–	+	+	+	–	–
		1311, 1314, 1324	+	+	+	+	+	–	+
		1323	+	+	+	–	+	–	+
		1315	+	+	+	+	–	–	–
		1322	–	+	+	+	–	–	–

^a NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

^b βGI: β-glucosidase, βXy: β-xylosidase, pNPG: p-nitro-phenyl-glucoside, pNPX: p-nitro-phenyl-xyloside.

^c Cg: *Candida glabrata* sensitive control strain; Sc: *Saccharomyces cerevisiae* sensitive control strain.

two apple musts employed and the two strains evaluated) and *S. eubayanus* (only in RG juice) and the higher amount of ethanol produced by *S. cerevisiae* NPCC 1178 with regards to that produced by *S. uvarum* NPCC 1314 in GS must (Table 4).

The effect of the inoculated yeast strain was also evident in the composition of the organic acids in the base ciders obtained. Shikimic acid concentrations were always higher in RG ciders than in GS ones, independently from the strain used. Interestingly, both RG and GS musts juices fermented with the two *S. uvarum* strains evidenced the highest concentrations of this acid (Table 4).

Independently from the apple must evaluated, all non-*S. cerevisiae* yeast strains produced the highest concentrations of total higher alcohols in the ciders. These differences with regards to *S. cerevisiae* were particularly due to the elevated concentrations of isoamyl alcohol and 2-phenylethanol (Table 4). In particular, the amount of 2-phenylethanol produced by *S. eubayanus* and *S. uvarum* was at least twice than the amount produced by *S. cerevisiae*.

The highest amount of total esters was significantly detected in the ciders fermented by *S. uvarum* NPCC 1314, isolated from apple chicha. This difference was, in part, due to the elevated concentration of ethyl acetate produced by this strain (twice or more times higher than the rest). However, this strain also produced high concentrations of other esters as 2-phenylethyl acetate, isobutyl acetate, hexyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate. The last three esters were particularly abundant in RG cider (Table 4).

Among minor compounds including terpenes and volatile phenols, significant differences were only observed in the concentrations of geraniol and 4-ethylguaiaicol (Table 4).

4. Discussion

The yeast species *S. cerevisiae*, is a well-known microorganism in bread, wine and beer elaboration processes. Features like its capacity to survive and grow at high sugar and ethanol concentrations as well as its worldwide geographic distribution have been where the cause for the high number of investigations on this species and its status of model for biological studies in eukaryotes (Moreno Arribas and Polo, 2005).

Other lesser-known species in the *Saccharomyces* genus can also be found in fermentation processes. These species can possess similar or superior industrial characteristics than *S. cerevisiae* or, at least, they can be better adapted to processes with particular characteristics. This is the case of the species *S. uvarum* (Almeida et al., 2014; Sipiczki, 2008), generally associated with fermentation processes carried out at low temperatures (Sipiczki, 2002). Although several studies on this species have been carried out during the last 15 years, only a few of them have deepened its main metabolic particularities and biotechnological potential. The main reason for this phenomenon could be the relatively recent acceptance of *S. uvarum* as an individual species, separated from *S. eubayanus* and the group of hybrids *S. bayanus* (Rainieri et al., 1999,

Table 3
Kinetic parameters obtained for 1 L fermentations using the Exponential decay function (Arroyo-López et al., 2008) in two different apple musts.

Kinetic parameters	Royal Gala apple must				Granny Smith apple must			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
D (°Brix)	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.45 ± 0.07	0.16 ± 0.08	0.02 ± 0.01
mS	1.00 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.00	3.5 ± 0.34 ^a	7.01 ± 0.97 ^b	3.2 ± 0.98 ^a	2.47 ± 0.52 ^a
K (°Brix h ⁻¹)	7.83 ± 0.07	7.66 ± 0.17	7.91 ± 0.03	7.98 ± 0.01	7.44 ± 0.01 ^b	6.62 ± 0.30 ^{ab}	7.24 ± 0.01 ^{ab}	6.32 ± 0.44 ^a

D is a specific value when $t \rightarrow \infty$, S is the estimated value of change, and K is the kinetic constant (°Brix h⁻¹).

Fit of model with R2 between 99.2 and 99.8%. Significant coefficients (p-value ≤ 0.050) by apple must. Different superscript letters in the same row indicate significant differences between values obtained for the same apple must.

Table 4
Chemical composition of ciders (1 L) fermented using different yeast strains and apple musts.

COMPOUND	Royal Gala apple must				Granny Smith apple must			
	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314	<i>S. cerevisiae</i> NPCC 1178	<i>S. eubayanus</i> NPCC 1292	<i>S. uvarum</i> NPCC 1290	<i>S. uvarum</i> NPCC 1314
<i>General compounds</i>								
Glucose (g L ⁻¹)	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.45 ± 0.07	0.16 ± 0.08	0.02 ± 0.01
Fructose (g L ⁻¹)	1.00 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.00	3.5 ± 0.34 ^a	7.01 ± 0.97 ^b	3.2 ± 0.98 ^a	2.47 ± 0.52 ^a
Ethanol (% v/v)	7.83 ± 0.07	7.66 ± 0.17	7.91 ± 0.03	7.98 ± 0.01	7.44 ± 0.01 ^b	6.62 ± 0.30 ^{ab}	7.24 ± 0.01 ^{ab}	6.32 ± 0.44 ^a
Glycerol (g L ⁻¹)	3.73 ± 0.21 ^a	4.37 ± 0.39 ^{ab}	4.76 ± 0.05 ^c	4.15 ± 0.45 ^{bc}	3.48 ± 0.28	3.55 ± 0.33	4.17 ± 0.26	4.29 ± 0.39
Acetaldehyde (g L ⁻¹)	17.15 ± 2.05	9.85 ± 0.77	12.1 ± 6.08	12.05 ± 0.35	16.30 ± 2.26	15.15 ± 4.45	12.50 ± 0.71	8.80 ± 0.56
Free SO ₂	35.0 ± 4.2	45.0 ± 0.1	35.0 ± 0.2	43.0 ± 0.2	11.5 ± 2.1	13.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1	13.0 ± 0.01
Total SO ₂	73.5 ± 4.9 ^a	101.5 ± 2.1 ^b	80.0 ± 4.2 ^a	80.0 ± 4.2 ^a	38.0 ± 0.1	33.5 ± 2.1	30.5 ± 2.1	32.0 ± 0.1
pH	3.46 ± 0.01	3.33 ± 0.01	3.38 ± 0.05	3.44 ± 0.06	3.29 ± 0.38	3.14 ± 0.03	3.31 ± 0.09	3.21 ± 0.01
<i>Organic acids</i>								
Acetic acid (g L ⁻¹)	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.07
Lactic acid (g L ⁻¹)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.20 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
Malic acid (g L ⁻¹)	6.75 ± 0.07	6.5 ± 0.1	6.95 ± 0.21	6.85 ± 0.07	7.60 ± 0.42 ^a	9.50 ± 0.14 ^b	9.25 ± 0.07 ^b	8.85 ± 0.35 ^b
Shikimic acid (mg L ⁻¹)	9.05 ± 0.21 ^{ab}	5.7 ± 0.42 ^a	13.05 ± 0.07 ^b	13.30 ± 2.40 ^b	3.00 ± 0.01 ^a	3.00 ± 0.01 ^a	4.60 ± 0.56 ^b	6.35 ± 0.21 ^c
Total organic acids (g L ⁻¹)	7.06 ± 0.09	6.71 ± 0.11	7.36 ± 0.23	7.26 ± 0.10	7.70 ± 0.42 ^a	9.60 ± 0.16 ^b	9.35 ± 0.08 ^{ab}	9.00 ± 0.42 ^{ab}
<i>Higher alcohols</i>								
1-Propanol	12.28 ± 0.58	10.97 ± 0.15	14.71 ± 1.11	15.14 ± 1.86	10.62 ± 1.08	8.68 ± 0.44	10.03 ± 0.13	6.71 ± 4.16
1-Butanol	2.17 ± 0.22	2.14 ± 0.04	2.31 ± 0.13	2.29 ± 0.03	1.52 ± 0.68	1.23 ± 0.13	1.22 ± 0.07	1.11 ± 0.06
1-Hexanol	1.35 ± 0.07	1.26 ± 0.01	1.33 ± 0.15	1.39 ± 0.08	0.95 ± 0.09	1.39 ± 0.46	0.97 ± 0.07	1.27 ± 0.40
2-Phenylethanol	3.09 ± 0.31 ^a	9.31 ± 0.52 ^b	10.88 ± 1.83 ^b	7.97 ± 2.28 ^{ab}	4.07 ± 0.11 ^a	12.77 ± 0.27 ^b	15.91 ± 0.85 ^b	11.28 ± 0.26 ^b
Benzyl alcohol	0.17 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^{ab}	0.11 ± 0.03 ^{ab}	0.03 ± 6E ^{-3ab}	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 3E ^{-3ab}	0.03 ± 1E ^{-4b}
Isoamyl alcohol	91.2 ± 8.63 ^a	133.70 ± 4.24 ^{ab}	165.35 ± 17.46 ^b	119.05 ± 15.91 ^{ab}	108.05 ± 5.30 ^a	165.85 ± 7.28 ^b	163.50 ± 9.05 ^b	165.30 ± 14.28 ^b
Isobutyl alcohol	24.70 ± 1.13 ^a	20.3 ± 1.41 ^a	30.95 ± 1.34 ^b	23.75 ± 1.63 ^a	16.00 ± 0.01	19.81 ± 1.84	18.3 ± 0.14	22.45 ± 6.86
Total higher alcohols	134.96 ± 10.94 ^a	177.75 ± 5.33 ^b	225.67 ± 19.25 ^b	169.71 ± 18.05 ^{ab}	141.25 ± 3.33 ^a	209.75 ± 8.74 ^b	209.96 ± 10.33 ^b	208.17 ± 17.05 ^b
<i>Esters</i>								
Ethyl acetate	6.37 ± 1.51 ^a	6.00 ± 0.11 ^a	7.09 ± 0.71 ^a	14.11 ± 1.63 ^b	7.49 ± 0.36	7.32 ± 1.02	8.19 ± 0.10	29.63 ± 10.93
2-Phenylethyl acetate	0.041 ± 0.001	0.094 ± 0.005	0.084 ± 0.024	0.226 ± 0.095	0.013 ± 0.003 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.03 ^{ab}	0.40 ± 0.12 ^b
Benzyl acetate (μg L ⁻¹)	1.40 ± 0.01 ^{ab}	0.75 ± 0.03 ^a	0.86 ± 0.07 ^a	2.0 ± 0.2 ^b	2.0 ± 0.9	0.60 ± 0.07	0.40 ± 0.03	0.80 ± 0.07
Hexyl acetate (μg L ⁻¹)	13.0 ± 6.0	7.0 ± 0.7	4.5 ± 0.7	22.0 ± 6.0	4.0 ± 1.0	3.0 ± 0.7	10.0 ± 4.0	4.0 ± 1.9
Isoamyl acetate	0.095 ± 0.007 ^b	0.025 ± 0.001 ^a	0.025 ± 0.001 ^a	0.11 ± 0.014 ^b	0.060 ± 0.001	0.05 ± 0.007	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Isobutyl acetate (μg L ⁻¹)	5.0 ± 1.0 ^a	5.0 ± 0.7 ^a	5.0 ± 0.3 ^a	7.0 ± 0.5 ^b	4.0 ± 0.2	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.3	7.0 ± 2.0
Ethyl butyrate	0.041 ± 0.001	0.046 ± 0.002	0.048 ± 0.001	0.045 ± 0.005	0.028 ± 0.005 ^a	0.036 ± 0.002 ^b	0.042 ± 0.002 ^b	0.039 ± 0.008 ^b
Ethyl decanoate (μg L ⁻¹)	13.0 ± 3.0 ^{cd}	2.0 ± 0.1 ^a	7.0 ± 1.0 ^{ab}	21.0 ± 0.3 ^d	13.0 ± 0.8 ^b	3.0 ± 0.7 ^a	15.0 ± 0.8 ^b	10.0 ± 0.4 ^{ab}
Ethyl hexanoate	0.047 ± 0.006 ^{ab}	0.032 ± 0.001 ^a	0.045 ± 0.003 ^{ab}	0.056 ± 0.004 ^b	0.042 ± 0.003	0.019 ± 0.001	0.040 ± 0.012	0.039 ± 0.001
Ethyl lactate	1.41 ± 0.08 ^a	1.78 ± 0.08 ^{ab}	3.32 ± 0.45 ^b	2.41 ± 0.77 ^{ab}	1.11 ± 0.28	1.72 ± 0.65	1.49 ± 0.03	1.88 ± 0.02
Ethyl octanoate (μg L ⁻¹)	48.0 ± 14.0	14.0 ± 1.0	30.0 ± 12.0	73.0 ± 6.0	25.0 ± 3.0 ^c	2.0 ± 0.2 ^a	15.0 ± 0.6 ^b	12.0 ± 2.0 ^b
Diethyl succinate	0.015 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.036 ± 0.011	0.044 ± 0.009	0.018 ± 0.004	0.031 ± 0.001	0.047 ± 0.007	0.021 ± 0.024
Total esters	8.11 ± 1.54 ^a	8.03 ± 0.02 ^a	10.71 ± 1.09 ^a	17.13 ± 0.74 ^b	8.82 ± 0.07 ^a	9.30 ± 1.65 ^a	10.11 ± 0.09 ^a	32.11 ± 6.02 ^b
<i>Terpenes (μg L⁻¹)</i>								
4-Terpineol	0.70 ± 0.05	0.50 ± 0.05	0.70 ± 0.09	0.70 ± 0.10	0.70 ± 0.04	0.60 ± 0.10	3.00 ± 2.00	0.60 ± 0.04
Limonene	0.035 ± 0.003	0.018 ± 0.002	0.040 ± 0.009	ND	0.040 ± 0.002	0.188 ± 0.020	ND	0.018 ± 0.002
Linalool	11.0 ± 1.0	7.0 ± 1.0	8.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0	6.0 ± 0.7	4.0 ± 3.0	8.0 ± 1.0	4.0 ± 3.0
Nerol	ND	ND	ND	ND	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.8
Geraniol	10.0 ± 1.0 ^c	6.0 ± 0.3 ^b	3.0 ± 0.7 ^a	10.0 ± 1.0 ^c	10.0 ± 1.0	5.0 ± 1.0	9.0 ± 0.4	3.0 ± 1.0
Total terpenes	21.7 ± 2.0 ^b	13.5 ± 1.0 ^a	11.7 ± 1.0 ^a	21.7 ± 2.0 ^b	17.7 ± 1.0 ^b	10.3 ± 1.0 ^a	21.0 ± 1.0 ^b	8.6 ± 0.1 ^a
<i>Volatile phenols (μg L⁻¹)</i>								
4-Ethylphenol	6.0 ± 0.4	4.0 ± 1.0	5.0 ± 0.4	6.0 ± 0.8	5.0 ± 2.0	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
4-Ethylguaiaicol	5.0 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.3 ^a	4.0 ± 0.4 ^{ab}	5.0 ± 0.3 ^b	1.0 ± 0.7 ^b	0.4 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.2 ^a
Total volatile phenols	11.0 ± 0.5	7.0 ± 1.3	9.0 ± 0.8	11.0 ± 1.1	6.0 ± 2.7	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.2	2.4 ± 0.4

Values are expressed in mg L⁻¹ except in the indicated cases. ND: not detected.

Different superscript letters in the same row indicate significant differences between values obtained for the same apple juice (ANOVA and Tukey test, $n = 2$).

Nguyen et al., 2000; Libkind et al., 2011). With regards to *S. eubayanus* its recent discovery and the low number of strains available worldwide are the reason for the lack of studies. Only a few reports related mainly to its diversity and biogeography can be found (Bing et al., 2014; Gayevskiy and Goddard, 2016; Hittinger, 2013; Peris et al., 2014; Peris et al., 2016; Rodríguez et al., 2014), with almost no information available about its technologically relevant features.

In this work we evaluated the potentiality of a set of strains belonging to *S. uvarum* and *S. eubayanus* species isolated from different habitats (Table 1). From a geographic point of view, the sampling areas are

relatively close and show similar climatic features; however, the main differences are related to the specific ecological habitat from which the strains were obtained. This different origin clearly influenced the metabolic features of the strains, as it could be revealed in this work. Ciders obtained after fermentations (50 mL) with strains from natural habitats (both *S. uvarum* and *S. eubayanus*) cluster together in the PCA carried out on the basis of the kinetic features and the basic chemical composition analyzed. Besides, these features were different from those obtained in fermentations carried out with *S. cerevisiae*. Although several research publications have made emphasis on the fructophilic

capacity of *S. uvarum*, the concentration of residual fructose in the ciders elaborated with this species, and also with its sibling species *S. eubayanus*, were not different from that obtained with *S. cerevisiae*. Contrarily, in 1 L fermentations using GS apple must, the highest residual fructose concentrations were obtained with *S. eubayanus*. Nevertheless, the lower λ value in micro-fermentations conducted with *S. uvarum* and *S. eubayanus* with regard to *S. cerevisiae*, could be related to the need for the adaption of this last species to an initial higher amount of fructose than glucose typical in apple musts, but not in grape must. Different explanations for an improved fructose utilization have been mentioned for different *Saccharomyces* species. In *S. cerevisiae*, the high fructose utilization was proposed to be due to the presence of a mutated hexose transporter (Guillaume et al., 2007). In the species *S. bayanus* and *S. pastorianus*, the existence of fructose/H⁺ symport in coexistence with the facilitated diffusion system for hexoses was proposed as a cause of the good fructose transport (Gonçalves et al., 2000). Interestingly, Tronchoni et al. (2009) evidenced that *S. uvarum*, as well as *S. kudriavzevii*, showed a slight preference for fructose with regards to *S. cerevisiae*, at the beginning of fermentation. This preference could also be happening in our experiments, as a possible explanation for the lower λ of *S. uvarum* and *S. eubayanus*.

According to bibliographic reports in wine, *S. uvarum* produces lower ethanol and higher glycerol concentrations than *S. cerevisiae* (Castellari et al., 1994; Magyar and Tóth, 2011; Sipiczki, 2002). No information about *S. eubayanus* are reported but, assuming its genetic relationship with *S. uvarum*, *S. bayanus* (hybrid between *S. uvarum* and *S. eubayanus*) and *S. pastorianus* (hybrid between *S. eubayanus* and *S. cerevisiae*), it is likely to find similar metabolic features between *S. uvarum* and *S. eubayanus*. In this work, significant differences in ethanol concentration were found in both microfermentations (50 mL) and 1 L fermentations (GS must). In the case of microfermentations, *S. uvarum* strains from *chicha* produced the lowest levels of ethanol together with *S. cerevisiae*; however, in 1 L fermentations in GS must a lower production of this compound was observed for the three non-*S. cerevisiae* strains. Ethanol is an important flavour component and a product of the Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway whose main function is the production of energy. This pathway also gives rise to pyruvic acid, a precursor to acetic acid and a series of other molecules that are related to the aromatic complexity of fermented beverages. Glycerol is also a product derived from the glycolytic pathway and is primarily formed in the early phase of fermentation as a response to osmotic stress (Nevoigt and Stahl, 1997) and to maintain the redox balance in the cell altered due to an excess of cytoplasmic NADH typical from the fermentation process (Albers et al., 1998; Valadi et al., 2004). It has been also associated with a yeast adaptation to low-temperature growth (Izawa et al., 2004). In fermented beverages, this metabolite contributes positively to quality by providing slight sweetness, smoothness and fullness and reducing wine astringency (Ishikawa and Noble, 1995; Remize et al., 2000; Swiegers et al., 2005). The production of high levels of glycerol has been proposed as a typical feature of *S. uvarum* (Antonelli et al., 1999; Bertolini et al., 1996; Castellari et al., 1994; Gamero et al., 2013; Giudici et al., 1995; López-Malo et al., 2013; Rainieri et al., 1999). However, some authors have found that this property is highly variable among *S. uvarum* strains (Magyar and Tóth, 2011). Moreover, using synthetic medium, Masneuf-Pomarède et al. (2010) found high intraspecific variation of glycerol production within *S. uvarum*, with no significant interspecific difference compared to *S. cerevisiae*. Our results partially confirm these reports; evidencing a high variation in the production of this compound among strains, independently from their origin. A similar behaviour was observed here for the first time among strains of *S. eubayanus*, some of them producing the highest and other producing the lowest glycerol concentrations among analyzed ciders. Regarding the balance between ethanol and glycerol in the fermented products, the preselected *S. eubayanus* and *S. uvarum* strains produced higher amounts of glycerol than *S. cerevisiae*, making these strains enologically interesting. A potential explanation for a high glycerol production

without decrease of ethanol generation is the synthesis of low concentrations of acetic acid – as it can be experimentally evidenced in the lowest volatile acidity levels in non-*S. cerevisiae* fermentations at both 50 mL and 1 L volumes – in order to maintain the mass balance in the cell.

Pyruvic acid produced during glycolysis is also the substrate for the synthesis of higher keto acids, key compounds in the production of the majority of alcohols, acids and esters. Among esters, one of the most significant compounds that affect flavour in fermented beverages is ethyl acetate. As ethanol is the dominant alcohol in cider, ethyl acetate, produced from acetyl-CoA and ethanol, is the most abundant ester. Ethyl acetate together with acetic acid participates in the sensation of sourness and roughness this beverage and they are not desired compounds at high concentrations (Whiting, 1976). Although in this work the concentration of acetic acid was low particularly in fermentations carried out with *S. uvarum* and *S. eubayanus*, the production of ethyl acetate was always the highest (twice or three times higher than the rest for RG and GS musts, respectively) in ciders elaborated with *S. uvarum* NPCC 1314 isolated from fermentative environment. This strain was also the highest producer of other esters like 2-phenylethyl acetate, isobutyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate. All these esters have been related to desired fruity and flowery notes in fermented beverages: isobutyl acetate is associated with fruity flavor, ethyl octanoate with apple-like notes, ethyl decanoate with pear-like notes and 2-phenylethyl acetate with flowery flavor (Huang et al., 2001; Lambrechts and Pretorius, 2000). According to these characteristics, ciders obtained with *S. uvarum* 1314 showed the best combination of features.

The nature and concentration of organic acids are also important factors influencing the organoleptic characteristics of fruit and vegetables, i.e. their flavour. Besides, organic acids may have a protective role against various diseases due to their antioxidant activity (Silva et al., 2004). The major organic acid in apple ciders is L(–)-malic, but cider apple varieties commonly contain other acids like shikimic, quinic, chlorogenic and p-coumarylquinic acids (Beech, 1972). Quinic and shikimic acids are extremely important in the flavour balance of ciders, directly affecting the acidity and, as precursors, also affecting the phenolic fraction. Our results indicate that malic acid was the most abundant acids in the analyzed ciders; however, important differences in shikimic acid were also evidenced among treatments. Malic acid content was significantly higher in ciders fermented with both *S. uvarum* and *S. eubayanus* using GS apple must; this phenomenon could be related with the described capacity of *S. uvarum*, probably present in *S. eubayanus* too, for synthesizing malic acid instead of degrading it (Castellari et al., 1994; Giudici et al., 1995). Interestingly, the levels of shikimic acid were significantly higher only in fermentations carried out with *S. uvarum* independently from the origin (natural source or fermentation). It is known that shikimic acid, formed from phosphoenol pyruvate and erythrose-4-phosphate, is involved in the synthesis of the amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophan, and phenylalanine is the precursor for the synthesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate (Dietrich and Pour-Nikfardjam, 2009). Both the higher alcohol 2-phenylethanol and the ester 2-phenylethyl acetate were found, coincidentally, in the significantly highest concentrations in ciders elaborated with the cryotolerant strains. Previously reported data have indicated that the production of these compounds is a typical trait of *S. uvarum* (Antonelli et al., 1999; Gamero et al., 2013; Masneuf-Pomarède et al., 2010; Stribny et al., 2015). Altogether, our results could indicate that this metabolic pathway could be an important difference between the three species studied in this work.

Together with the 2-phenylethanol, the isoamyl alcohol - and consequently the total amount of higher alcohols - was present in significantly higher proportion in ciders fermented with the cryotolerant (both *S.*

eubayanus and *S. uvarum*) yeasts than in *S. cerevisiae* fermented ones. The higher alcohols are quantitatively the major volatile components in cider (Herrero et al., 2006). They are formed as by-products of both anabolic (Genevois and Lafon pathway) and catabolic metabolism (Ehrlich pathway) (Mangas et al., 1994), and together with the glycerol synthesis pathway, allow the re-equilibration of the redox balance involving NAD⁺/NADH cofactors. Some higher alcohols, particularly isoamyl alcohol, contribute to unpleasant flavour at elevated concentrations (Rous et al., 1983), but 2-phenylethanol is responsible for the aroma of rose petals and honey and is deemed one of the most important aromatic alcohols contributing to flavour in fermented beverages. It has been previously reported that one of the specific enological properties of *S. uvarum* is the high production of total higher alcohols and specifically 2-phenylethanol (Demuyter et al., 2004; Coloretto et al., 2006; Gangl et al., 2009; Masneuf-Pomarède et al., 2010); however, our work is the first report about the same capacity for *S. eubayanus*. The ability to produce high levels of 2-phenylethyl alcohol has been related to a higher capacity to utilize the assimilable nitrogen in must, a feature that could be related to the yeast species (Mendes-Ferreira et al., 2009; Torrea et al., 2003) and that is being currently studied in our laboratory.

Finally, we included in this analysis the evaluation of the analyzed yeasts to produce a set of enzymatic activities related to the improvement of aroma or stabilization of ciders including pectinases, proteases and glycosidases (Günata et al., 1988; Hsu et al., 1989; Paillard, 1990; Fleet, 2008; Ugliano, 2009; Pando Bedriñana et al., 2012; Martín and Morata de Ambrosini, 2014). It is known that *S. cerevisiae* is not a good producer of extracellular enzymes, however, only a few (*S. uvarum*) or none (*S. eubayanus*) bibliographic reports have evaluated these activities in the cryotolerant species studied here. Our qualitative enzymatic screening evidenced the four activities tested in these cryotolerant species with the only exception of the protease activity absent in *S. eubayanus*. On the other hand, it is interesting to highlight the importance of using at least two types of substrates for β GI screening studies in order to minimize the risk of obtaining false-negative results caused by the specific substrate selectivity of the enzyme as reported by Hernández et al. (2003). The antagonistic activity of a yeast that will be used as a starter culture is also considered a relevant technological attribute (Rainieri and Pretorius, 2000). Strains possessing this characteristic will be able to inhibit the growth of wild *S. cerevisiae* yeasts present during natural fermentations, improving their implantation capacity. In this work, antagonist activity particularly effective against *S. cerevisiae*, was observed for the first time for *S. eubayanus*, which constitute a relevant additional feature to be considered in cidermaking.

5. Conclusions

In this work, we evidenced for the first time that, regarding enological features of the *S. uvarum* and *S. eubayanus*, the source of the strains is as relevant as the phylogenetic relationships among them. *S. uvarum* and *S. eubayanus* from *A. araucana* showed similar physicochemical features and different from those showed by *S. uvarum* from fermented beverages, although they were isolated from close geographic areas in Patagonia. We confirm the proposed metabolic and enological features of *S. uvarum*, evidenced in strains from different origins and characterized by a high glycerol production, and high 2-phenylethanol and its acetate. Finally, we demonstrate that *S. eubayanus* shows similar physiological characteristics to *S. uvarum* and demonstrated for the first time the capacity of this species to ferment apple juices producing ciders without defects as well as to produce antagonist molecules active against *S. cerevisiae*. Three strains with an excellent combination of properties including two *S. uvarum* and one *S. eubayanus* were selected to be used in cidermaking.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.018>.

Acknowledgements

This work was supported by Grants PICT 2011–1738 from ANPCyT and PI04–A128 from Universidad Nacional del Comahue (Argentina) to C.L. Authors want to thank Lucía González for her technical assistance. MGF thanks to CONICET for her PhD fellowship.

References

- Albers, E., Liden, G., Larsson, C., Gustafsson, L., 1998. Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rec. Dev. Microbiol.* 2, 253–279.
- Almeida, P., Goncalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2014. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nat. Commun.* 5, 4044.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A., 1999. Yeast influence on volatile composition of wines. *Agric. Food Chem.* 47, 1139–1144.
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2008. Effects of ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium chloride on freshness retention and microbial growth during the storage of Manzanilla-Aloreaña cracked table olives. *LWT Food Sc. Technol.* 41, 551–560.
- Barbagelata, R.J., 2010. Ecología de levaduras asociadas a la elaboración de sidras patagónicas (MSc Thesis. U.N.Comahue).
- Beech, F.W., 1972. Cider making and cider research: a review. *J. Inst. Brew.* 78, 477–491.
- Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P., Castellari, L., 1996. Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 343–345.
- Bing, J., Han, P.J., Liu, W.Q., Wang, Q.M., Bai, F.Y., 2014. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr. Biol.* 24 (10), R380.
- Cabranes, C., Moreno, J., Mangas, J.A., 1990. Dynamics of yeast populations during cider fermentation in the Asturian region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3881–3884.
- Castellari, L., Ferruzzi, M., Magrini, A., Giudici, P., Passarelli, P., Zambonelli, C., 1994. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 33, 49–52.
- Coloretto, F., Zambonelli, C., Tini, V., 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23, 672–676.
- Cornille, A., Giraud, T., Smulders, M.J.M., Roldán-Ruiz, I., Gladieux, P., 2014. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends Genet.* 30 (2), 57–65.
- del Campo, G., Santos, J.L., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., 2003. Cider produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *J. Inst. Brew.* 109, 342–348.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1140–1148.
- Dietrich, H., Pour-Nikfardjam, M.S., 2009. Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 307–334.
- Fernandes-Salomão, T.M., Amorim, A.C.R., Chaves-Alves, V.M., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., Araújo, E.F., 1996. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.* 27, 15–18.
- Fleet, G., 2008. Wineyeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeast growth during fermentation. In: Fleet, G. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Suiza, pp. 27–54.
- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., Belloch, C., 2013. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1405–1414.
- Gangl, H., Batusic, M., Tschek, G., Tiefenbrunner, W., Hack, C., Lopandic, K., 2009. Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *New Biotechnol.* 25 (4), 244–251.
- Gayevskiy, V., Goddard, M.R., 2016. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environ. Microbiol.* 18 (4), 1137–1147.
- Giudici, P., Zambonelli, C., Passarelli, P., Castellari, L., 1995. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 143–147.
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, I., 2000. *Fsy1*, a novel gene encoding a specific fructose/h1 symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* 182 (19), 5628–5630.
- González, J.A., Gallardo, C.S., Pombar, A., Rego, P., Rodríguez, L.A., 2004. Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. *Elec. J. Env. Agricult. Food Chem.* 3, 743–750.
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M., Blondin, B., 2007. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated *HXT3* allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (8), 2432–2439.
- Günata, Y.Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C.L., Cordonnier, R.E., 1988. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 184, 139–149.
- Hernández, L.F., Espinosa, J.C., Fernández-González, M., Briones, A., 2003. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171–176.

- Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2006. Volatile compounds in cider: inoculation time and fermentation temperature effects. *J. Inst. Brew.* 112 (3), 210–214.
- Hittinger, C.T., 2013. *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. *Trends Genet.* 29 (5), 309–317.
- Hsu, J., Heartherbell, D., Yorgey, B., 1989. Effects of fruit storage and processing on clarity, proteins and stability of Granny Smith apple juice. *J. Food Sci.* 54, 660–662.
- Huang, C., Lee, S.L., Chou, C.C., 2001. Production of 2-phenylethanol, a flavour ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Res. Int.* 34, 277–282.
- Ishikawa, T., Noble, A.C., 1995. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Qual. Prefer.* 6, 27–33.
- Izawa, S., Sato, M., Yokoigawa, K., Inoue, I., 2004. Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 108–114.
- Kishimoto, M., Shinohara, T., Soma, E., Goto, S., 1993. Selection and fermentation properties of cryophilic wine yeasts. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 451–453.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma- a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 75–97.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valerio, E., Goncalves, C., Diver, J., Johnston, M., Goncalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS* 108, 1–6.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A., Caballero, A.C., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 93, 608–615.
- López-Malo, M., Querol, A., Guillamon, J.M., 2013. Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS ONE* 8 (3), 1–14.
- Magyar, I., Tóth, T., 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 94–100.
- Mangas, J.J., Cabranes, C., Moreno, J., Gomis, D.B., 1994. Influence of cider-making technology on cider taste. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 27, 583–586.
- Martín, M.C., Morata de Ambrosini, V.I., 2014. Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 1893–1901.
- Masneuf, I., Murat, M.L., Naumov, G.I., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2002. Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis vinifera* Sauvignon blanc wines. *J. Int. Sc. Vigne Vin.* 36, 205–212.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., 2010. Re-assessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 79–86.
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., Mendes-Faia, A., 2009. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 571–583.
- Moreno Arribas, M.V., Polo, M.C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food. Sci.* 45, 265–286.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W., 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 97, 647–655.
- Naumov, G.I., Masneuf, I., Naumova, E.S., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2000. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast population. *Res. Microbiol.* 151, 683–691.
- Naumov, G.I., Nguyen, H.V., Naumova, E.S., Michel, A., Aigle, M., Gaillardin, C., 2001. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 163–171.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Antunovics, Z., Sipiczki, M., 2002. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 727–730.
- Nevoigt, E., Stahl, U., 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 231–241.
- Nguyen, H.V., Lépingle, A., Gaillardin, C., 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *S. uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 71–85.
- Paillard, N., 1990. The flavour of apples, pears and quinces. In: Norton, I., Macleod, A. (Eds.), *Food Flavours*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 1–41.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., Suárez Valles, B., 2010. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* 27, 503–508.
- Pando Bedriñana, R., Lastra, Queipo A., Suárez, Valles B., 2012. Screening of enzymatic activities in non-*Saccharomyces* cider yeasts. *J. Food Biochem.* 36, 683–689.
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Querol, A., Barrio, E., 2014. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation. *PLoS ONE* 9 (4), e93729.
- Peris, D., Sylvestre, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Alexander, W.G., Hittinger, C.T., 2014. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol. Ecol.* 23, 2031–2045.
- Peris, D., Sylvestre, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Alexander, W.G., Hittinger, C.T., 2016. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol. Ecol.* 23 (8), 2031–2045.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J.E., Pulverini, A., Giudici, P., 1999. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 177–185.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50, 15–31.
- Rementeria, A., Rodríguez, J.A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J.R., Hernando, F.L., Sevilla, M.J., 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 86, 201–207.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2000. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 371–378.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2003. *Tratado de Enología: microbiología del vino vinificaciones*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez, M.E., Lopes, C., van Broock, M., Vallés, S., Ramón, D., Caballero, A., 2004. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activity. *J. Appl. Microbiol.* 96, 84–95.
- Rodríguez, M.E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M.P., Barrio, E., Lopes, C.A., 2014. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* sedes in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 1, 1–18.
- Rodríguez, M.E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M.P., Barrio, E., Querol, A., Lopes, C.A., 2017. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fow109>.
- Rohlf, F.J., 2000. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York.
- Rous, C.V., Snow, R., Kunkee, R.L., 1983. Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. *J. Inst. Brew.* 89, 274–278.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283–289.
- R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (URL <https://www.R-project.org/>).
- Sangorrín, M., Zajonskovsky, I., van Broock, M., Caballero, A., 2002. The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 115–120.
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H., 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 65–72.
- Sipiczki, M., 2002. In: Ciani, M. (Ed.), *Taxonomic and Physiological Diversity of Saccharomyces bayanus*. Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. Research Signpost, Kerala, pp. 53–69.
- Sipiczki, M., 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* 8, 996–1007.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z., 2001. Analysis of yeast derived from natural fermentation in Tokaj winery. *A. Van. Leeuw.* 79, 97–105.
- Stribny, J., Gámero, A., Pérez-Torrado, R., Querol, A., 2015. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acid precursors. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 41–46.
- Suárez-Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernández Tascón, N., Gonzalez García, A., Rodríguez Madrera, R., 2005. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. *LWT Food Sc. Technol.* 38, 455–461.
- Suárez-Valles, B., Bedriñana, R.P., Fernández Tascón, N., Querol, A., Rodríguez Madrera, R., 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* 24, 25–31.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma. *Aust. J. Grape Wine R.* 11, 139–173.
- Torrea, D., Frailé, P., Garde, T., Ancín, C., 2003. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control* 14, 565–571.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G., 1999. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amaron wine. Diversity of *Saccharomyces* strains from Amaron wine. *A. Van. Leeuw.* 75, 207–215.
- Tronchoni, J., Gámero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 237–243.
- Ugliano, M., 2009. Enzymes in winemaking. In: Moreno-Arribas, M., Polo, M. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Science + Business Media LLC, New York, USA, pp. 103–128.
- Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L., Adler, L., 2004. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.* 279, 39677–39685.
- Whiting, G.C., 1976. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—a review. *J. Inst. Brew.* 82, 84–92.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

