

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS VINICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DEL VALLE DE CASABLANCA (Chile)

*Isolation and characterization of wine strains Saccharomyces cerevisiae
 from the Valley of Casablanca (Chile)*

Antonio Said, N¹, Eduardo Loyola, M². y Carmen Prieto D².

(1) Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas,
 Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.
 Av. J. P. Alessandri 774, Santiago, Chile.

(2) Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias
 Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.
 Santa Rosa 11315, Santiago, Chile.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, cepas vinicas, Chile.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, wine strains, Chile.

RESUMEN

Se aislaron cepas vinicas nativas de uvas procedentes del valle de Casablanca, región productora de vinos de calidad, mediante fermentación natural del mosto en presencia de metabisulfito de potasio como agente selectivo.

Los análisis morfológicos y fisiológicos realizados, a partir de colonias aisladas obtenidas del mosto al término del proceso de fermentación, permitieron establecer que, aproximadamente, un 90% de ellas correspondían a cepas de levaduras ascospórogenas de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, al determinar el fenotipo «killer» de estas cepas, se encontró que un 40% de ellas eran productoras de toxina «killer».

Las evaluaciones enológicas practicadas a un subconjunto de estas cepas, presentaron propiedades similares a cepas vinicas comerciales de *S. cerevisiae*.

La caracterización molecular de éstas, mediante electroforesis de campo pulsado, permitió establecer la presencia de, al menos, cuatro diferentes cariotipos electroforéticos, con un tamaño estimado del genoma nuclear entre los 13.000 a los 21.000 kb.

INTRODUCCION

La transformación del jugo de uva en vino, es esencialmente un proceso microbiano. La fermentación alcohólica, la conversión de los principales azúcares de la uva,

SUMMARY

Wild wine strains of grapes coming from the valley of Casablanca a region that produces fine wines, were isolated through the natural must fermentation and using potassium metabisulfite as a selective agent.

The morphological and physiological analysis accomplished, based on the colonies obtained from the must at the end of fermentation process, showed that, approximately, 90% of them corresponded to ascosporegenous strain yeast belonging to *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, upon determining the killer phenotype of these yeasts, it was found that 40% of them produced this killer toxin.

The enological evaluations made on a subset of these isolated strains, showed that they presented enological properties, similar to commercial yeasts of *S. cerevisiae*.

The molecular characterization of these strains through pulse field gel electrophoresis (PFGE), allowed to establish the presence of, at least, four different electrophoretic karyotypes, having a nuclear genome with a 13.000 to 21.000 kb.

glucosa y fructosa a etanol y dióxido de carbono, es realizada principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversos estudios indican que la microbiota presente en la superficie del grano de uva y en la pruina, es

muy diversa, y que la presencia de levaduras del tipo *S. cerevisiae* es reducida (1).

Se ha estimado que la densidad y diversidad poblacional de las levaduras nativas en los frutos sanos es limitada, encontrándose entre a 10^2 a 10^4 unidades formadoras de colonias/grano de uva.

Se han identificado, a lo menos, 18 géneros de levaduras relacionadas con el vino (levaduras nativas presentes, principalmente en la superficie de los granos de uvas, en los viñedos y en la planta procesadora). Las especies, que con mayor frecuencia se encuentran, son levaduras fermentativas pertenecientes a 7 géneros diferentes (*Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida pulcherrima*, *Hansenula anomala*, *Pichia membranaefaciens*, y *Rhodotorula minuta*) (2). Estas levaduras pueden participar, al inicio del proceso fermentativo, pero su número disminuye drásticamente una vez iniciada la fermentación. Las especies vínicas, fuertemente fermentativas, como *S. cerevisiae*, se encuentran en número reducido en la etapa inicial de la fermentación, sin embargo, cuando entran en contacto con los azúcares del mosto aumentan considerablemente la población, siendo la especie que prevalece hasta el término del proceso fermentativo (3). Estas levaduras, además, participan en la calidad organoléptica del producto terminado. En consecuencia, las levaduras nativas de una región podrían participar en las características distintivas del vino y cooperar al uso de denominaciones de origen en la industria vitivinícola (4).

En países productores de vinos de calidad exportable (España, Francia, Italia y otros), se han desarrollado programas de selección de levaduras de distintas zonas vitícolas. Por esta vía, han llegado a disponer de cepas que presentan características enológicas particulares, empleándose en la elaboración de vinos de distintos tipos de calidad (5, 6). En nuestro país sólo se han emprendido actividades de investigación en esta área en forma esporádica. Los estudios realizados han permitido conocer que la microbiota nacional, es similar a la que se encuentra en otros ecosistemas. La selección de levaduras, solo ha tenido éxito en casos aislados, más bien, relacionados con levaduras destinadas a la industria de destilados vínicos (Loyola, comunicación personal).

En este estudio se pretende aislar e identificar cepas vínicas nativas de *S. cerevisiae*, de uvas procedentes de una zona productora de vinos de calidad, mediante análisis morfológico, fisiológico y molecular.

MATERIALES Y METODOS

I.- Materiales

1.- **Cepas de levaduras control:** se dispuso de las

siguientes cepas de levaduras: *S. cerevisiae* AB1380, *S. cerevisiae* AH22 (Lab. de Genética, Fac. de Ciencias, U. de Chile), *S. cerevisiae* EC1118, y *S. cerevisiae* ALG509 (Lab. de Enología, Dpto. de Agroindustria, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, Univ. De Chile).

2.- **Medios de cultivo:** agar extracto de malta (extracto de malta 6%, peptona 0,6% y agar-agar 1,5%), para la mantención y el crecimiento activo de las cepas; agar y caldo extracto de levadura-peptona-glucosa (glucosa 2%, peptona 1%, extracto de levadura 0,5% y agar-agar 2%, para medio sólido) (caldo y agar YPG), para dilución de las muestras y el crecimiento activo de las cepas; agar DIFCO para el análisis de la morfología celular; base carbonada para levaduras (DIFCO) para el test de asimilación de fuentes nitrogenadas.

II.- Métodos

1.- **Muestreo y procesamiento de las uvas:** se realizó un muestreo durante los meses de marzo y abril d 1997, de seis sectores diferentes del valle de Casablanca que pertenecen a las viñas Concha y Toro (C y T) y Santa Emiliana (SE). Las muestras tomadas fueron de aproximadamente 15 kg de uva de la variedad Chardonnay. Las muestras fueron prensadas manualmente tratando de interferir, lo menos posible, con la microbiota nativa presente en la uva, y bajo condiciones asépticas. La vinificación se realizó en recipientes de vidrio de 5 litros, en presencia del orujo producto del prensado, y adicionado de metabisulfito de potasio (100 mg/l). La fermentación se realizó en condiciones controladas de temperatura (20°C a 22°C) y se determinó la densidad y el grado alcohólico.

2.- **Aislamiento de las levaduras:** se tomaron muestras de mosto al término de la fermentación cuando la densidad había alcanzado valores entre 0,992 a 0,996. Las muestras fueron sembradas en agar extracto malta e incubadas durante 2 días a 28°C. Se seleccionaron las placas que contenían entre 100 a 150 colonias para su caracterización posterior.

3.- **Pruebas morfológicas y fisiológicas.-** Las distintas cepas aisladas se sometieron a pruebas de clasificación utilizando las claves taxonómicas descritas por Kreger-van Rij (1987) (5) y por Fulgesang (1997) (2). Los ensayos se realizaron en duplicado para cada una de las colonias en estudio.

3.1.- **Morfología de colonias:** se analizó su morfología (textura, color, superficie y elevación) en agar extracto de malta, después de un periodo de incubación de 2 a 3 días a 25°C.

3.2.- Morfología de las células vegetativas: a partir de un cultivo de levadura en crecimiento activo, se inoculó caldo YPG y se incubó 2 a 3 días a 28°C. Se analizó la forma y modalidad de reproducción de las células vegetativas. la presencia de células aisladas o de agregados celulares, y el tamaño celular promedio de, al menos, 20 células aisladas para cada cepa.

3.3.- Formación de ascosporas: a partir de un cultivo en crecimiento activo, se sembró en agar de morfología (medio de preesporulación) y se incubó durante 1 a 2 días a 28°C. A partir de este cultivo se sembró un agar acetato (glucosa 0,1%, cloruro de potasio 0,18%, extracto de levadura 0,25%, acetato de sodio trihidratado 0,82%, y agar-agar 1,5%) (medio de esporulación), y se incubó durante 3 días a 25°C. Se analizó la formación de ascosporas mediante observación microscópica de muestras teñidas con verde de malaquita. En el caso de no observarse formación de esporas al cabo de este tiempo, se dejó el cultivo a temperatura ambiente y se analizó la formación de ascosporas durante 3 a 4 semanas, a intervalos de una semana.

3.4.- Producción de ácido acético: se realizó en medio conteniendo glucosa al 5%, carbonato de calcio 0,5%, y agar-agar al 2%. Se inoculó la superficie del medio a partir de una cepa en crecimiento activo, y se incubó durante 1 a 3 días a 28°C. Se determinó la producción de ácido mediante la formación de una zona o anillo translúcido alrededor del inóculo.

3.5.- Fermentación de azúcares: se ensayó la capacidad fermentativa de las cepas para seis azúcares (glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa, a una concentración del 2%, y rafinosa al 4%). Se prepararon soluciones stock para cada uno de los azúcares, y se esterilizaron mediante filtración por membrana. Se colocaron 4 ml de caldo extracto de levadura (0,5%) en tubos de ensayo y se incorporó una campana Durham. Después de autoclavar, se adicionó a cada tubo 2 ml de la solución stock de azúcar, y se inoculó densamente con la cepa a ensayar. Después de incubar a 25°C, se examinó la formación de gas durante 2 a 3 días, y al cabo de una semana.

3.6.- Asimilación de compuestos carbonados: se determinó la asimilación a 19 diferentes compuestos carbonados mediante el sistema de identificación API-20C AUX (bioMérieux System), modificado por Cunier et al. (1979) (8). Después de estandarizar los cultivos en crecimiento activo, se inocularon las cúpulas y se registró la turbidez en cada una de ellas después de 1 día y de 2 días de incubación a 30°C. El perfil numérico (bionúmero) obtenido, permitió la identificación de la cepa con la ayuda de la

tabla de identificación, catálogo analítico y disquette APILAB.

3.7.- Asimilación de compuestos nitrogenados: se preparó una solución stock 10x de base carbonada para levadura, y una solución de nitrato de potasio al 0,078%, de L-lisina al 0,08% y cadaverina dihidrocloruro al 0,068%, las cuales se esterilizaron mediante filtración por membrana. Se mezclaron 0,5 ml de la solución 10x con 4,5 ml de la solución de nitrato de potasio o de solución de L-lisina, y se inocularon las cepas a ensayar. Se incubó durante 7 días a 25°C. Seguidamente, se tomó una alícuota de cada tubo y se volvió a inocular una serie similar de tubos de ensayo. Después de un período de incubación de 7 días a 25°C, se registró la turbidez en cada uno de los tubos experimentales.

3.8.- Resistencia a cicloheximida: se preparó una solución conteniendo base nitrogenada de levadura al 6,7% y glucosa al 10% en 100 ml de agua desmineralizada. Luego, se adicionó 2,5 ml de una solución de acetona conteniendo 0,1 g de cicloheximida, y se esterilizó por filtración en membrana. Se mezclaron 0,5 ml de esta solución con 4,5 ml de agua desmineralizada estéril, y se inoculó con la cepa de levadura en crecimiento activo. Los cultivos se incubaron durante 3 semanas a 25°C, con agitación. Se determinó el crecimiento de la cepa por la aparición de turbidez en los tubos.

3.9.- Actividad «killer»: se preparó una solución de tampón citrato-fosfato (fosfato monoácido de potasio al 8,4%, ácido cítrico al 6,3%) conteniendo azul de metileno al 0,4%. Después de autoclavar y dejar enfriar, se adicionó una alícuota de un cultivo de *S.cerevisiae* AH22 (cepa sensible al factor «killer»). Se mezclaron 2,3 ml de la mezcla anterior con 17,7 ml del agar YPG fundido y se vertió en placas de Petri. Se dejó 2 a 3 h a temperatura ambiente, se refrigeró durante 30 min. y se sembró en superficie las cepas de levadura a ensayar. Se incubó durante 2 a 3 días a 28°C, y se determinó la actividad «killer» mediante la formación de una zona clara alrededor del inóculo, la cual presentó un borde azul oscuro en su parte externa (9).

4.- Ensayos enológicos: se realizaron ensayos de fermentación controlados a escala de laboratorio, y se determinó la acidez volátil (test de Blarez), los azúcares reductores (test de Fehling), y el grado alcohólico (método densimétrico) (10).

5.- Polimorfismo de longitud del ADN cromosomal: se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Chu et al., 1986 (11). La electroforesis se realizó en un equipo Pulsaphor Plus LKB. Se preparó un gel de agarosa al 1% en

tampón TBE 0,5x (Tris-HCl 49,5 mM, ácido bórico 49,5 mM, y EDTA 1 mM, pH 8,0). Se colocaron los moldes de agarosa conteniendo el ADN cromosomal, y se realizó la electroforesis en los tiempos de pulso de 90, 120 y 180 seg., con un tiempo de corrida equivalente para cada pulso de 8 h a 180 volts. El gel se tiñó con solución de bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml durante 30 min. Se dejó desteñir el gel en agua destilada durante 8 h y se fotografió usando cámara Polaroid 55 con filtro amarillo. El número de bandas y el tamaño relativo del genoma nuclear, fue calculado tomando en consideración la intensidad relativa de cada banda de ADN tipo cromosomal (12) mediante el Programa Bioimage Intelligent Quantifier (B. I. Systems Corporation).

RESULTADOS

El proceso de fermentación alcohólica espontánea, bajo las condiciones experimentales ensayadas, se prolongó entre 8 y 9 días para el mosto de uva de la viña C y T y entre 9 a 10 días para SE. El recuento viable promedio de colonias durante la fase inicial y final de la fermentación en la viña C y T, fue de $4,3 \times 10^9$ células/ml y de $1,8 \times 10^8$ célula/ml respectivamente. En cambio, para el mosto de uva de la viña SE, fue de 4×10^7 célula/ml para la fase inicial y de $2,5 \times 10^8$ células/ml para la fase final del proceso fermentativo (Tabla 1).

Para cada una de las fases de la fermentación se observó, aproximadamente, un 98% de colonias de morfología similar a las de *S. cerevisiae* EC1118 (una de las cepas control).

El análisis morfológico realizado a un total de 180 colonias seleccionadas de ambas viñas, mostró que la gran mayoría de ellas (178 colonias), fueron similares en su morfología externa: colonias de forma redonda, superficie convexa, lisa, de borde liso y de color crema suave a amarillo pardo.

El análisis de la forma y tamaño celular de las colonias seleccionadas fue similar a lo establecido para cepas de *S. cerevisiae* (forma globosa a subglobosa de $(5-10) \times (5-12)$ µm, a elipsoidal a cilíndrica de $(3-9,5) \times (4,5-21)$ µm) (5), como asimismo, el tipo de yemación observada (multilateral, con formación de yemas preferentemente en el polo de la célula), característica de las cepas pertenecientes a *S. cerevisiae*.

De acuerdo a un criterio de predominio de identidad de morfología de las colonias, se seleccionó un total de 80 de ellas (40 de la viña C y T, y 40 de la viña SE) para los estudios de morfología celular. Se encontraron células de forma oval-redonda a forma oval-alargada, con presencia de algunas células cilíndricas, y con un tamaño celular estimado de $3,8-9,3 \times 4,8-16,8$ µm.

En relación a la reproducción asexual, la totalidad de las muestras presentaban células con formación de yemas en posición multilateral (Fig. 1). Al determinarse el estado sexual para cada una de las cepas se encontró que un total de 74/80 cepas formaban ascos. Estos, contenían de 1 a 4 ascosporas de forma redonda a ovalada (Fig. 2).

Para la totalidad de las 74 cepas productoras de ascosporas se determinaron algunas propiedades fisiológicas. Los estudios de producción de ácido acético y de sensibilidad al antibiótico cicloheximida, mostró que las 74 cepas ascosporógenas no eran productoras de ácido acético, y mostraron sensibilidad a la cicloheximida a una concentración de 100 µg/l. Respecto a la capacidad de asimilación de una fuente nitrogenada, la totalidad de las cepas en estudio, no asimilaban el nitrato y la L-lisina, siendo por tanto consideradas nitrato (-), L-lisina (-) y cadaverina (-).

Teniendo en consideración la similitud de las 74 cepas en relación a las propiedades morfológicas y fisiológicas que presentaban, se seleccionó un total de 50 cepas (25 de la viña C y T, y 25 de la viña SE) para los ensayos de fermentación de azúcares y de asimilación de compuestos carbonados. En los ensayos de fermentación para 6 azúcares diferentes, se encontró que la totalidad de las cepas fermentaban en forma rápida los azúcares (1 a 3 días): glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. Ninguna de las cepas ensayadas fermentó la lactosa.

En relación a los test de asimilación para 19 fuentes carbonadas, la totalidad de las cepas asimiló la glucosa y, ninguna de éstas, la lactosa. Para los azúcares restantes, un total de 45 cepas (90%) asimiló los azúcares galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa (Fig. 3), en cambio, un 10% de las cepas no asimiló alguno de estos cuatro azúcares. De acuerdo a la tabla de identificación de levaduras del sistema API-20C (bioMérieux System), se puede establecer que las 45 cepas seleccionadas son levaduras del tipo *S. cerevisiae*, con un 94,3% de identidad de acuerdo a dicho programa de identificación.

Los ensayos para determinar la actividad «killer» en las 45 cepas, seleccionadas de acuerdo a los resultados de asimilación de fuentes carbonadas, mostraron que 18 cepas (40%) presentaban el fenotipo «killer» (12 cepas de la viña C y T, y 6 cepas de la viña SE) (Fig. 4).

Para evaluar las propiedades enológicas de las cepas, se realizaron ensayos de vinificación controlados para un total de 22 cepas de levaduras, entre las cuales habían cepas con actividad «killer» y cepas sin dicha actividad, de las viñas C y T, y SE. De acuerdo a los resultados obtenidos del proceso de segunda fermentación (Tabla 2.) las cepas presentaron valores similares de grado alcohólico, de acidez volátil, y de azúcares residuales, entre ellas.

La caracterización del genoma nuclear mediante electroforesis de campo pulsado (Fig.5). de cuatro cepas seleccionadas de acuerdo a sus propiedades enológicas y a la presencia o ausencia de actividad «killer», muestra diferencias entre las cepas en cuanto a n° de bandas y a la posición e intensidad relativa de algunas de las bandas de ADN cromosomal y de estas respecto a las cepas controles de *S.cerevisiae* AB1380 y YNN295. El análisis densitométrico muestra la presencia de 11 a 13 bandas de ADN cromosomal en las cepas nativas de *S. cerevisiae* con un tamaño estimado del genoma entre 1300 a 2100 kb.

DISCUSION

La producción de vinos finos depende de diversos factores, tales como, la variedad de la vid, tipo - condiciones del suelo y factores climáticos de la región. En los últimos años diversos estudios destacan, además, el rol fundamental que desempeña el tipo de levadura en las características organolépticas del vino (4,13,14).

Se han desarrollado programas de aislamiento y selección de levaduras de distintas zonas vinícolas en otros países (5, 6). Estas levaduras se han comercializado y en Chile, aproximadamente, un 80% de las elaboraciones de vinos finos se realizan por fermentación inducida con levaduras seleccionadas importadas (Loyola, com. pers.)

El aislamiento y caracterización de levaduras vínicas nativas de algunos ecosistemas productores de vinos finos en Chile y su potencial industrialización, permitiría acercarnos a la producción de vinos finos que satisfagan en mayor proporción la noción de «terroir», es decir, vinos con características propias, proporcionadas por el entorno ecológico en el que se elaboran.

La adición de metabisulfito de potasio, al mosto de uva, permitió seleccionar cepas de *S. cerevisiae*, resistente a dicho compuesto (15), impidiendo el desarrollo de levaduras nativas distintas de *Saccharomyces*, de bacterias nativas del ácido láctico, y de bacterias nativas del ácido acético (16).

Durante la primera fase del proceso de fermentación espontánea, se pueden desarrollar diferentes géneros de levaduras ascosporógenas relacionadas con el vino, las cuales al igual que *Saccharomyces*, forman ascas persistentes (*Torulaspóra*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*) (13). Nuestros resultados experimentales obtenidos de las cepas seleccionadas de este estudio (asimilación de cadaverina y L lisina(-), asimilación de sacarosa (+) y la ausencia de formación de un film o película superficial en medio líquido, nos permitieron confirmar que las 45 cepas seleccionadas pertenecían al género *Saccharomyces*.

En relación a la clave de identificación taxonómica a nivel de especie, Kreger-van Rij, 1984 (7), propone para *S.cerevisiae*, determinar la capacidad de asimilación de maltosa, etilamina, cadaverina y la sensibilidad a cicloheximida (100 µg/ml). Al respecto, Fugelsang 1997 (2), propone que la clave de identificación para el género *Saccharomyces* permite también determinar la especie, siendo ésta, *S.cerevisiae* o *S.exiguus*.

Los resultados experimentales obtenidos para las 45 cepas seleccionadas, en relación a las propiedades señaladas, nos permitieron clasificar a las cepas en estudio como *S. cerevisiae*.

Se ha encontrado que algunos géneros de levaduras, tales como, *Saccharomyces*, *Candida* y *Hansenula*, secretan al medio extracelular una toxina «killer», la cual elimina las células de levadura sensibles a ésta (17). Estudios recientes han demostrado que el fenómeno de antagonismo microbiano es un factor importante como causa de la detención del proceso de fermentación industrial del vino (18). Una de las causas de este fenómeno es la producción de esta toxina por levaduras silvestres distintas de *Saccharomyces*, la cual puede disminuir la población inicial de una levadura comercial sensible a la toxina que ha sido empleada como partidor en una fermentación (19).

La propiedad «killer», se encuentra ampliamente distribuida en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, cepas de levaduras cerveceras, vínicas y en levaduras contaminantes en la industria de alimentos (20). Al respecto, en un estudio realizado en cepas de *S.cerevisiae* aisladas de mostos en fermentación espontánea en una planta vitivinícola de Bordeaux (Francia), durante 2 años consecutivos, se encontró un alto porcentaje de cepas «killer» en 2 razas fisiológicas, *S.cerevisiae* y *S.bayanus* (21).

La evaluación enológica, a escala de laboratorio, de las cepas seleccionadas de ambas viñas con y sin actividad «killer», mostró de manera general, un comportamiento similar entre las cepas en cuanto al grado alcohólico, acidez volátil y azúcar residual.

El Reglamento Ley N° 18.455 de Julio de 1986, que norma la producción de vinos en Chile, establece que el valor mínimo aceptable de grado alcohólico en el vino es de 11,2°, con un valor máximo de acidez volátil de 1,4 g/l, y un valor inferior a 2 g/l de azúcar residual.

La electroforesis de campo pulsado de las cepas ensayadas, muestra diferencias en el número de bandas observables en el gel (11 a 13 bandas), y en el patrón de bandeo electroforético entre las cepas ensayadas. De acuerdo a estos resultados preliminares, no se evidencian cariotipos electroforéticos específicos para cepas con actividad «killer», como tampoco, para cepas sin actividad «killer».

Estudios de polimorfismo de longitud de ADN

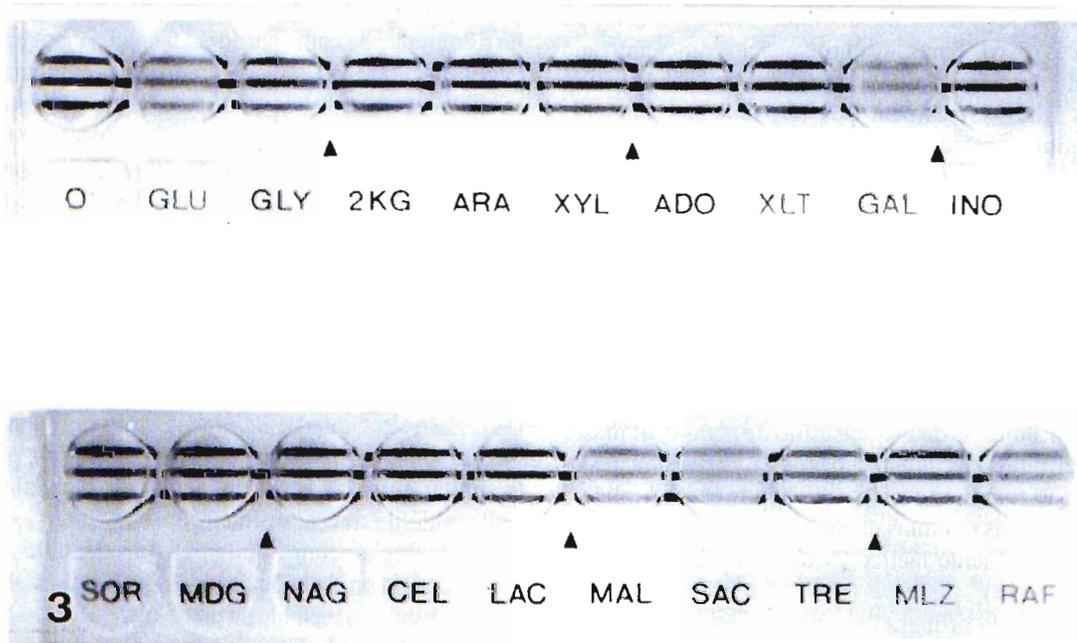
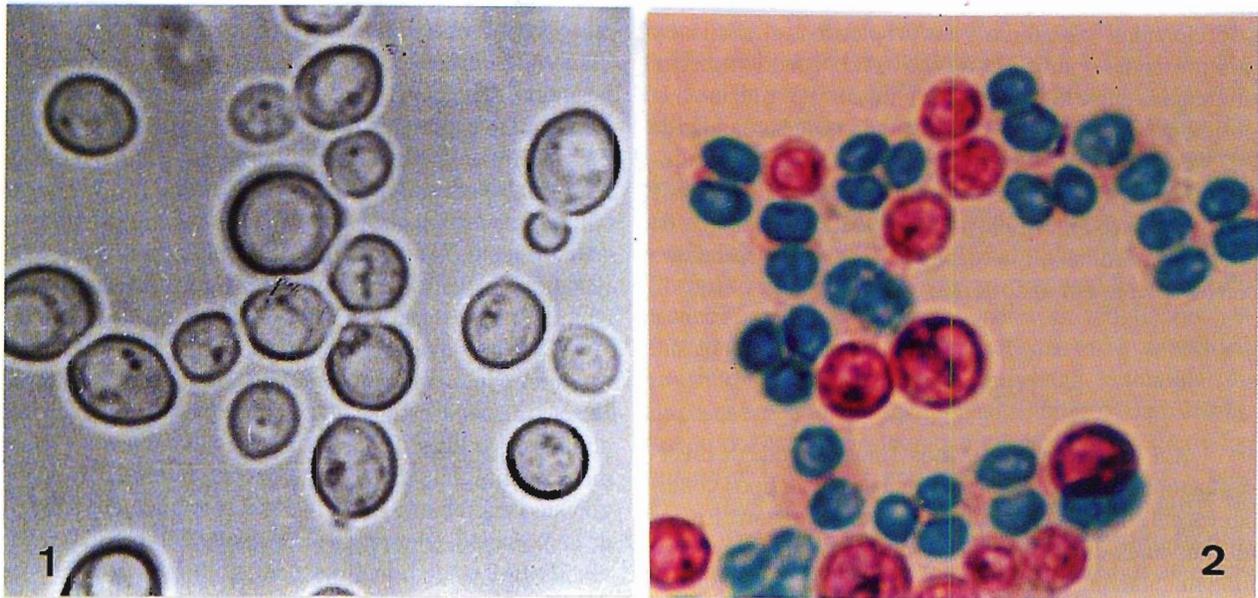


Fig. 1. Reproducción asexual mediante la formación de yemas en posición multilateral de células de levaduras aisladas de las viñas Concha y Toro y Santa Emilianita, del valle de Casablanca (Aumento de 1000x). **Fig. 2.** Reproducción sexual mediante la formación de ascosporas de células de levaduras aisladas de las viñas Concha y Toro y Santa Emilianita, del valle de Casablanca. (Tinción de Verde Malaquita. Aumento de 1000x). **Fig. 3.** Test de asimilación de compuestos carbonados de levaduras aisladas de las viñas Concha y Toro y Santa Emilianita, del valle de Casablanca. La galería API-20C contiene 19 fuentes carbonadas. La turbidez en las cúpulas indica asimilación de la fuente carbonada por la cepa de levadura. (GLU = Glucosa; GLY = Glicerol; 2-KG = α -ceto-D-Gluconato; ARA = L-Arabinosa; XYL = D-Xilosa; ADO = Adonitol; XLT = Xilitol; GAL = Galactosa; INO = Inositol; SOR = Sorbitol; MDG = α -Metil D-Glucósido; NAG = N-Acetil-D-Glucosamina; CEL = Celobiosa; LAC = Lactosa; MAL = Maltosa; SAC = Sacarosa; TRE = Trehalosa; MLZ = Melesitosa; RAF = Rafínosa)

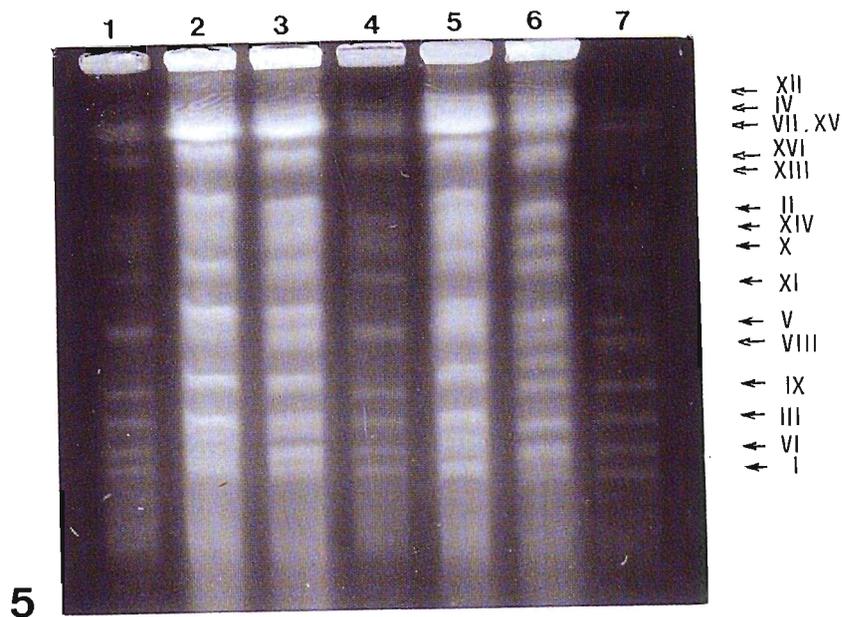
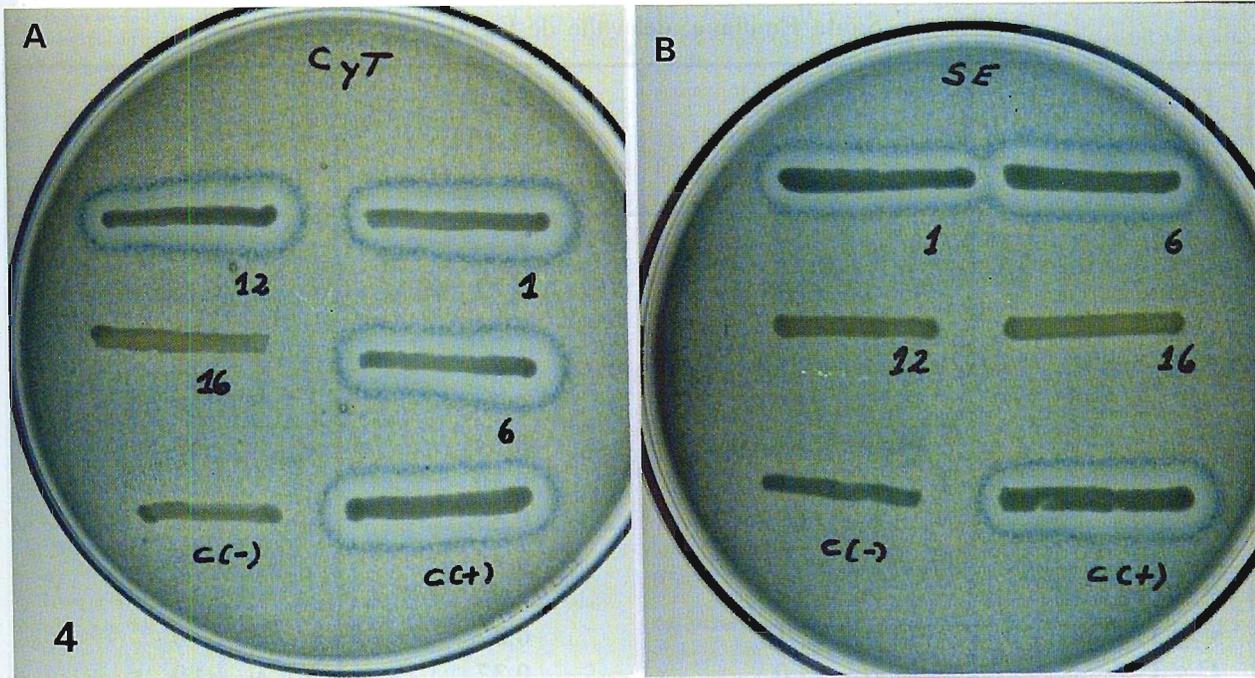


Fig. 4. Determinación de la actividad «killer» de levaduras seleccionadas de las viñas Concha y Toro (A) y Santa Emiliana (B), del valle de Casablanca. La producción de la toxina «killer» se demuestra por la formación de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del inóculo, y por la formación de un área azul oscuro en el borde externo del área de inhibición. Control (-) = *Saccharomyces cerevisiae* AB1380; control (+) = *Saccharomyces cerevisiae* ALG509.

Fig. 5. Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de ADN cromosomal de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Carril 1 y 4: *S. cerevisiae* AB1380. Carril 2 y 3: *S. cerevisiae* aisladas de la viña Concha y Toro con y sin actividad «killer», respectivamente. Carril 5 y 6: *S. cerevisiae* aisladas de la viña Santa Emiliana con y sin actividad «killer», respectivamente. Carril 7: *S. cerevisiae* YNN295.

TABLA 1

Cuantificación del grado alcohólico, de la acidez volátil y, azúcar residual en mostos naturales inoculados con cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de las viñas Concha y Toro y Santa Emiliana, del valle de Casablanca.

CEPA	GRADO ALCOHOLICO	ACIDEZ VOLATIL (g/L ácido acético)	AZUCAR RESIDUAL (g/L de glucosa)
S.E. 1	13,2	0,44	1,64
S.E. 2	13,4	0,44	1,70
S.E. 3	13,0	0,31	1,65
S.E. 4	13,2	0,45	2,88
S.E. 5	12,9	0,40	1,66
S.E. 6	13,2	0,37	1,58
S.E. 7	13,0	0,40	1,51
S.E. 8	13,1	0,55	2,34
S.E. 9	13,2	0,43	1,68
S.E. 10	12,9	0,38	2,34
C y T 1	13,1	0,37	1,70
C y T 2	13,0	0,37	1,89
C y T 3	12,9	0,38	1,93
C y T 4	12,9	0,38	1,93
C y T 5	13,2	0,43	1,70
C y T 6	13,4	0,42	1,69
C y T 7	13,3	0,37	1,89
C y T 8	13,0	0,30	1,69
C y T 9	13,0	0,42	1,72
C y T 10	13,2	0,36	1,76
C y T 11	13,0	0,43	1,66
C y T 12	13,0	0,25	1,78

cromosomal realizados con 77 cepas vnicas comerciales, mostraron una amplia variación del patrón electroforético entre ellas (22), similar a los resultados obtenidos con las cepas aisladas de los viñedos del valle de Casablanca. El polimorfismo de longitud del ADN cromosomal permite distinguir diferentes cariotipos electroforéticos de las cepas aisladas del valle de Casablanca, observándose en ellas un patrón electroforético similar a la cepa control *S. cerevisiae* YNN295, en cuanto al número y posición de las bandas. Por tanto, esta técnica molecular permite la diferenciación de cepas de levaduras, y permite establecer que las 5 cepas aisladas del valle de Casablanca corresponden a biotipos diferentes entre ellos, pero pertene-

cientes a *S. cerevisiae*.

CONCLUSIONES

La caracterización de cepas vitivinícolas zonales mediante análisis morfológico, fisiológico y molecular, permite seleccionar biotipos específicos de *S. cerevisiae*.

La evaluación enológica comparativa de algunas cepas aisladas en zonas de viñedos, con cepas comerciales permite aportar sus características distintivas al vino de esa zona.

REFERENCIAS

- 1.- Riberau-Gayon, J. & Peynaud, E. (1960). Traité d'Oenologie. Maturation du raisin. fermentation alcoolique. vinification. Tomo I. Berénger. Paris
- 2.- Fugelsang, K. C. (1997). Wine Microbiology. The Chapman & Hall. New York
- 3.- Martini, A. & Martini, A. (1990). Grape must fermentation-past and present. Yeast Technology. J.F.T. Spencer and D.M. Spencer. Springer-Berlag. Berlin.
- 4.- Seguin, A. & Dulau, D. (1994). Influence de la souche de levure sur la qualité aromatique des vins doux naturels muscats. Microbiologie 46:27-31
- 5.- Cuinier, C. (1980). Origine des levures assurant l'elaboration d'un vin blanc de Touraine. Identification des espèces. Connais. Vigne Vin 14:111-126
- 6.- Querol, A.; Huerta, T.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992). Strain for use as dry yeast in fermentation of Alicante winws: Selection and DNA patterns. J. Food Sci. 57:183-185
- 7.- Kreger-van Rij, N.J.W. (1987). The yeasts a taxonomic study. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam
- 8.- Cuinier, C. & Leveau, J.Y. (1979). L'identification des vignobles et des vins: méthode rapide a l'aide de la galerie API20C. Vignes et Vins. 283:44-49
- 9.- Rose, M.D.; Winston, F. & Hieter, P. (1990). Methods in Yeast Genetics. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- 10.- Office International de la vigne et du vin (OIV) (1989). Recueil des Méthodes Internationaux d'Analyses des Vins. Paris
- 11.- Chu, G.; Vollrath, D. & Davis, R.W. (1986). Separations of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234:1582-1585
- 12.- Doi, M.; Homma, M.; Chinpamporn, A. & Tanaka, K. (1992). Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. Journal of General Microbiology 138:2243-2251
- 13.- Boulton, R.; Singleton, V.; Bisson, L.; Kunkee, R. (1996). Principles and Practices of winemaking. Chapman & Hall. USA
- 14.- Zeeman, W.; Snyman, J.P. & Van Wik, J.C. (1982). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. Proceedings of the grape and wine. Centennial Symposium p. 79. University of California Press. Davis.
- 15.- Poulard, A.; Simón, L. & Cuinier, C. (1981). Caracters de la microflore levurienne du vignoble Nantais. Vignes et Vins 300:14
- 16.- Suárez, L. & Iñigo, L. (1990). Microbiologia Enológica. Fundamentos de vinificación. Edic. Mundi-Prensa
- 17.- Rogers, D. & Bevan, E.A. (1978). Group classification of killer yeasts based on cross reactions between strains of different species and origin. J. Gen. Microbiol. 105:199-202
- 18.- Ribereau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic. 36:1-10
- 19.- Heard, G.M. & Fleet, G.H. (1987). Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 51:539-545
- 20.- Van Vuuren, J. & Jacobs, J. (1992). Killer yeast in the wine industry: A review. Am. J. Enol. Vitic. 43:2
- 21.- Frezier, V. & Dubordieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Sacharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. Am. J. Enol. Vitic. 43:4
- 22.- Yamamoto, N.; Yamamoto, N.; Amemiya, H.; Yokomori, Y.; Shimizu, K.; Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wineyeasts. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 42:358-363