

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

Facultat d'Enologia

**QUANTIFICACIÓ, IDENTIFICACIÓ I TIPIFICACIÓ
DE LLEVATS VÍNICS
MITJANÇANT L'ÚS DE DIFERENTS
TÈCNiques MOLECULARS**

Memòria presentada per

NÚRIA HIERRO CRIVILLÉ

per optar al grau de Doctora en Bioquímica sota la direcció del

Dr. José Manuel Guillamón i el Dr. Albert Mas Baron

Tarragona, 2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

Els sotassignants, Dr José Manuel Guillamón Navarro, Professor Titular d'Universitat de Nutrició i Bromatologia del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, i

El Dr. Albert Mas Baron, Catedràtic d'Universitat de Nutrició i Bromatologia del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili

FAN CONSTAR,

Que el present treball, amb títol "Quantificació, identificació i tipificació de llevats vínics mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars" que presenta la Srta. Núria Hierro Crivillé, per optar al Grau de Doctora per la Universitat Rovira i Virgili ha estat realitzat sota la nostra direcció, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentada doctoranda.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

Dr. José Manuel Guillamón

Dr. Albert Mas Baron

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

“Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho;
sólo puedes ver lo que te queda por hacer”

Marie Curie

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair aquest treball als meus directors de tesi, Dr. José Manuel Guillamón i Dr. Albert Mas. Gràcies als seus coneixements, que tan generosament sempre han compartit amb mi i a la seva ajuda i consells, la realització d'aquest projecte ha estat possible. El seu entusiasme i dedicació, sempre presents durant aquests anys, han estat per mi un exemple a seguir, un referent. També els hi he d'agrair el suport i confiança que m'han donat sempre. A tots dos, gràcies.

He d'agrair també aquesta tesi a molta més gent que no m'atreveixo a nomenar per temor d'oblidar-me algú. A tots aquells amb qui he coincidit durant tots els anys de tesi, gràcies perquè tots vatos a part de compartir amb mi coneixement, idees i consells m'heu aportat molt més: diversió, alegria, companyerisme i amistat. Tots vatos i els moments viscuts, tant dins com fora del laboratori, han contribuït a l'elaboració d'aquesta tesi. Sense oblidar aquelles xerrades del replà del tercer pis del carrer Gasòmetre. Si parlés aquell replà...quants alts i baixos ha aguantat.

Gràcies a tots els amics de Tortosa, uns ja sabeu tot lo que significa fer la tesi perquè ho heu passat o esteu en ple procés i atres ho sabeu perquè heu tingut que aguantar-me. Simplement, gràcies per estar sempre allí. Núria i Sílvia, mereixeu una menció especial per ser les meues millors amigues. Vatos que heu estat al meu costat durant tots aquests anys de tesi; sempre escoltant-me, animant-me, fotent-me canya quan calia, aconsellant-me... us agraeixo de tot cor tot el que heu fet per mi, encara que no hem anat mai juntes de compres. Je, je, je!!! Ui, Joan, que m'oblidava de tu. Noo! ja saps que també et tinc en compte.

I per últim, agrair i dedicar aquesta tesi a tota la meua família. Als meus germans Magda, Marga i Edgar i als meus cunyats, Josep i Artur; per la seua ajuda, ànim, suport informàtic... i el que fes

falta. A les meues nebodes Laura, Neus i Paula; per les seues rialles i alegria. I a Xavi perquè la teua curiositat, admiració i interès en el meu treball m'han donat la força suficient per continuar. Gràcies pels teus consells i ànims, especialment durant l'etapa final de la tesi ja que ha sigut la que m'ha suposat més esforç i sacrifici. Gràcies per estar sempre al meu costat.

Però de manera molt especial vull dedicar i agrair aquesta tesi als meus pares, Juan i Magda, perquè si he pogut realitzar aquest treball ha sigut gràcies al seu esforç, sacrifici, suport i confiança.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

OBJECTIUS.....	9
INTRODUCCIÓ	
1. Llevats i fermentació alcohòlica.	
1.1 Taxonomia.....	19
1.2. Característiques generals dels llevats.....	21
1.3. Fermentació alcohòlica.....	22
1.4. Influència dels llevats no- <i>Saccharomyces</i> durant la fermentació alcohòlica.....	27
1.4.1. Síntesi de compostos aromàtics.....	27
1.4.2. Producció d'enzims.....	30
1.4.3. Alteracions físico-químiques.....	33
2. Tècniques d'identificació i quantificació de llevats.	
2.1 Mètodes clàssics d'identificació.....	35
2.2. Mètodes moleculars: identificació a nivell d'espècie	
2.2.1. Seqüenciació de gens ribosomals.....	36
2.2.2. Anàlisi dels perfils de restricció (RFLPs) del rDNA.....	37
2.2.3. PCR-DGGE.....	39
2.2.4. FISH.....	40
2.3. Mètodes moleculars: identificació a nivell de soca.	
2.3.1. Cariotip o separació de cromosomes en camp polsant.....	41
2.3.2. Anàlisi de restricció del mtDNA.....	43
2.3.3. RAPD-PCR.....	44
2.3.4. Microsatèl·lits.....	45
2.3.5. Seqüències δ	46
2.3.6. AFLP.....	47
2.3.7. PCR-ISS.....	48

2.3.8. ERIC-PCR i REP-PCR.....	49
2.4. Mètodes de quantificació	
2.4.1. Recompte en placa.....	50
2.4.2. Epifluorescència.....	51
2.4.3. Citometria de flux.....	52
2.4.4. Anàlisi d'impedància.....	53
2.4.5. PCR a temps real o QPCR.....	54
3. Diversitat microbiològica en la fermentació alcohòlica.	
3.1. Fermentació alcohòlica espontània.....	58
3.2. Fermentació alcohòlica inoculada.....	59
3.3. Estudis ecològics.....	60
3.4. Fermentacions mixtes.....	63
4. Bibliografia.....	67

CAPÍTOL 1.

New PCR-based methods for yeast identification

1. Introduction.....	96
2. Material and methods	
2.1. Strains.....	97
2.2. DNA extraction.....	99
2.3. PCR conditions.....	100
2.4. Restriction of amplified DNA.....	101
2.5. Agarose gel electrophoresis and microchip electrophoresis.....	101
2.6. Sequencing of the amplified fragments.....	102
3. Results	
3.1. Characterization of yeast collection strains.....	102

3.2. Sequence analysis of ERIC-PCR products.....	108
3.3. Identification of indigenous strains.....	109
4. Discussion.....	110
5. References.....	114

CAPÍTOL 2.

Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentations: Effect of grape ripeness and cold maceration

1. Introduction.....	121
2. Material and methods	
2.1. Yeast isolation.....	122
2.2. DNA extraction.....	124
2.3. PCR conditions.....	124
2.4. Restriction of amplified DNA.....	125
2.5. Agarose gel electrophoresis and microchip electrophoresis.....	125
2.6. Sequencing of the D1/D2 domain.....	125
3. Results	
3.1. Fermentation kinetics and yeast counts.....	126
3.2. Yeast species diversity.....	128
3.3. Identification methods used.....	129
3.4. Effect of ripeness on yeast population.....	132
3.5. Effect of cold maceration on yeast population.....	134
4. Discussion.....	134
5. References.....	138

CAPÍTOL 3.

Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription -QPCR (RT-QPCR) for detection and enumeration of total yeasts in wine

1. Introduction.....	146
2. Material and methods	
2.1. Yeast strain.....	147
2.2. Primer design.....	147
2.3. Specificity of PCR assays.....	148
2.4. DNA extraction for the QPCR assay.....	148
2.5. Standard curves.....	149
2.6. Artificial contaminated wine.....	149
2.7. Natural fermentation samples.....	150
2.8. Quantitative PCR assays.....	150
2.9. Heat inactivation of cultured <i>S. cerevisiae</i>	150
2.10 Statistical analysis.....	151
3. Results	
3.1. Primer design, specificity of PCR and sensitivity of QPCR.....	151
3.2. Quantification of total yeasts by QPCR.....	155
3.3. Quantification of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeasts by RT-QPCR.....	159
3.4. Stability of 26S rRNA and rDNA in heat-dead cells.....	162
4. Discussion.....	163
5. References.....	167

CAPÍTOL 4.

*Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR (QPCR).*

1. Introduction.....	174
2. Material and methods	
2.1. Yeast strain.....	176
2.2. Primer design.....	178
2.3. Specificity of PCR assays.....	179
2.4. DNA extraction for the QPCR assay.....	179
2.5. Standard curves.....	179
2.6. Artificial contaminated wine.....	180
2.7. Wine fermentations and sampling.....	180
2.8. Quantitative PCR assays.....	181
3. Results	
3.1. Primer design, specificity of PCR and sensitivity of QPCR.....	181
3.2. Quantification of <i>Hanseniaspora</i> and <i>Saccharomyces</i>	182
3.3. Monitoring wine fermentations.....	186
4. Discussion.....	189
5. References.....	194
DISCUSSIÓ GENERAL.....	201
CONCLUSIONS GENERALS.....	219
ANNEXES	
Annex 1. Material i mètodes.....	221
Annex 2. Abreviacions i nomenclatura.....	247

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

El grup d'investigació de Biotecnologia Enològica pertanyent al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de Tarragona, al que em vaig incorporar per realitzar la meua tesi doctoral, venia treballant en la caracterització i identificació de microorganismes d'interès enològic mitjançant l'ús de tècniques moleculars. Aquest grup ja havia realitzat diversos estudis sobre la dinàmica poblacional de llevats vínics (Constantí *et al.*, 1997; Torija *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002) i l'efecte de determinats factors tecnològics i enològics com: l'addició de SO₂ i inoculació de llevats comercials (Constantí *et al.*, 1998) i la temperatura de fermentació (Torija *et al.*, 2003). Per altra banda, s'havien desenvolupat i validat diversos mètodes moleculars de caracterització, identificació i enumeració de bacteries acètiques (Tesi Doctoral de Á. González, 2005). Es va voler aprofitar aquesta experiència adquirida durant anys i desenvolupar noves tècniques de caracterització, identificació i quantificació de llevats per a posteriorment aplicar-les en estudis ecològics i poder tenir així una major comprensió del procés de vinificació i d'aquesta manera, oferir a la indústria enològica tècniques de fàcil aplicació per poder controlar millor la fermentació alcohòlica i resoldre possibles problemes derivats de l'acció d'aquests llevats.

S.cerevisiae és el principal llevat responsable de la fermentació alcohòlica i és per això el llevat vínic més estudiat en el camp de l'Enologia. S'han desenvolupat gran quantitat de tècniques moleculars d'identificació, tant a nivell d'espècie com a nivell de soca, per aplicar-les posteriorment a estudis ecològics i així poder establir quina influència tenen aquests en l'aroma, color i gust del vi, és a dir, en les característiques organolèptiques del vi. Però, no podem oblidar que aquesta no és l'única espècie que contribueix en l'elaboració del vi. Fins la imposició de la soca de *S.cerevisiae* inoculada, transcorre un temps en què els llevats no-*Saccharomyces* són predominants i aquest és temps suficient per a què tinguin un important efecte en la qualitat organolèptica del vi ja que produeixen una sèrie de metabolits secundaris que poden afavorir o perjudicar qualitativament el producte final, el vi. És per aquest motiu que vam considerar important disposar de mètodes de discriminació per a aquests llevats no-*Saccharomyces* a nivell

d'espècie i també a nivell de soca, ja que hi ha poques tècniques desenvolupades que ens permetin distingir diferents soques d'una mateixa espècie no-*Saccharomyces*. Si tenim mètodes d'identificació ràpids i senzills, posteriorment podrem estudiar quines espècies i soques són majoritàries durant el procés de vinificació. Però no tan sols és important conèixer quines espècies són presents al llarg de la fermentació, sinó també poder determinar de la manera més exacta possible la seva població per així tenir un major control tant de la fermentació alcohòlica com del producte acabat. Per això, vam considerar interessant disposar d'un mètode de detecció i quantificació de llevats vínic que fos ràpid i fiable i que ens permetés aquest control sobre tot el procés d'elaboració del vi.

Per tot això, el nostre objectiu general va ser el desenvolupament de tècniques per caracteritzar, identificar i quantificar llevats d'interès vínic que ens permetés conèixer millor el desenvolupament de les diferents espècies de llevats durant la fermentació alcohòlica i la seva contribució al producte final. Aquest objectiu global es pot dividir en els següents objectius parcials :

1. Desenvolupar tècniques moleculars per a la caracterització, identificació i quantificació de llevats vínic.

1.1 Desenvolupar tècniques per a la caracterització i identificació de llevats no-*Saccharomyces* tant a nivell d'espècie com de soca.

Es van desenvolupar dues tècniques d'identificació ràpides i senzilles basades en l'amplificació a l'atzar fent servir oligonucleòtids basats en seqüències repetitives dels genomes bacterians (elements REP i ERIC).

1.2 Desenvolupar un mètode de detecció i quantificació de llevats vínic sense la necessitat de creixement en placa.

Per assolir aquest objectiu, hem posat a punt la tècnica de la PCR a temps real que ens permet quantificar microorganismes directament de la mostra. Es van dissenyar uns primers específics per tal de poder detectar i quantificar llevats totals, *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. Per a la detecció i enumeració vam utilitzar DNA (tècnica QPCR) i RNA (tècnica RT-QPCR) per quantificar viables.

2. Validar la utilitat de les tècniques desenvolupades en l'anàlisi de la dinàmica poblacional i l'efecte de diferents pràctiques vitícoles i enològiques.

Un cop posades a punt les tècniques de caracterització, identificació i quantificació, s'havia de comprovar la seva validesa en mostres reals. És per aquest motiu que es van aplicar aquestes tècniques desenvolupades al laboratori a l'estudi de l'evolució de les diferents soques i espècies de llevats al llarg de la fermentació alcohòlica. De manera més concreta volíem estudiar l'efecte de la maduració del raïm i l'efecte d'una tècnica molt actual com és la maceració pelicular en fred sobre aquestes poblacions de llevats. També es va utilitzar QPCR per determinar l'efecte de la temperatura de fermentació en la ratio *Saccharomyces* vs. no-*Saccharomyces* durant la fermentació alcohòlica.

Per tal d'assolir els objectius anteriors es va establir el següent disseny experimental:

1. Desenvolupament de les tècniques moleculars ERIC-PCR i REP-PCR per a la caracterització i identificació de llevats.

Aquestes tècniques han estat utilitzades amb èxit en la identificació de bacteris a nivell d'espècie i soca. Ens vam proposar adaptar aquestes tècniques per a la caracterització i identificació de llevats vínics i complementar aquest treball amb la utilització de la PCR-ISS (PCR-Intron Splice Sites), una tècnica ja emprada en la identificació de llevats a nivell de soca. Es va realitzar la caracterització de soques de referència pertanyents a diferents espècies de

llevats. I per tal de comprovar la validesa de les tres tècniques, es van identificar llevats aïllats d'una vinificació en negre. La correcta identificació dels llevats aïllats es va comprovar mitjançant l'anàlisi dels perfils de restricció (RFLPs) del ITS/5.8S rRNA.

Els resultats es presenten en el Capítol 1 d'aquesta tesi.

2. Estudi ecològic de vinificacions amb diferents condicions de fermentació.

Es va realitzar un estudi ecològic en diferents condicions de fermentació per tal de validar la utilitat de les tècniques anteriorment desenvolupades, però també per avaluar l'efecte que pot tenir el grau de maduració del raïm i la pràctica de la maceració en fred sobre la dinàmica poblacional de la fermentació alcohòlica.

Es van realitzar tres vinificacions a partir de raïm verd, madur i sobremadur de la varietat Ull de llebre a les que es va practicar, prèvia a la fermentació, una maceració en fred. Les soques aïllades van ser identificades mitjançant les tècniques PCR-ISS i ERIC-PCR. Aquestes identifications foren confirmades amb dues tècniques addicionals: l'anàlisi dels perfils de restricció (RFLPs) del rDNA i seqüenciació de la regió ribosomal D1/D2.

Els resultats es presenten en el Capítol 2 d'aquesta tesi.

3. Desenvolupament de les tècniques QPCR i RT-QPCR per a la detecció i quantificació de llevats totals.

Per detectar i quantificar llevats totals mitjançant la tècnica de la PCR a temps real (QPCR), es van dissenyar uns primers específics a partir del domini D1/D2 del gen ribosomal 26S rRNA. Per a la quantificació s'ha utilitzat com a molècula motlle tant el DNA ribosomal com el RNA ribosomal (prèvia una reacció de retrotranscripció). La utilització del RNA com a molècula motlle té l'avantatge que permet una millor quantificació de les cèl·lules viables.

Els resultats es presenten en el Capítol 3 d'aquesta tesi.

4. Validació de les tècniques QPCR i RT-QPCR en la detecció i quantificació de llevats totals.

Per tal de comprovar la utilitat de la tècnica QPCR, aquesta es va aplicar sobre unes mostres de vi contaminades artificialment. També es va validar la seva utilitat quantificant mostres reals d'una vinificació en blanc, una vinificació en negre i d'envelliment. La tècnica RT-QPCR també fou validada amb la quantificació dels llevats totals viables de diversos punts d'una vinificació en negre i de diverses mostres d'envelliment.

En tots els casos, els resultats obtinguts per la PCR a temps real van ser contrastats amb els obtinguts per creixement en placa.

Els resultats es presenten en el Capítol 3 d'aquesta tesi.

5. Desenvolupament de la tècnica QPCR per a la detecció i quantificació d'espècies d'interès enològic.

S.cerevisiae és el principal llevat vínic i *H. uvarum* es considera la principal espècie no pertanyent al gènere *Saccharomyces*. Per aquest motiu es va considerar interessant poder detectar i quantificar *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. Es van dissenyar uns primers específics a partir del gen ribosomal 5.8S rRNA i de l'espai intern transcrit ITS2.

Els resultats es presenten en el Capítol 4 d'aquesta tesi.

6. Validació de la tècnica QPCR per a la detecció i quantificació d'espècies víniques.

Per tal de comprovar la validesa d'aquesta tècnica, es van quantificar unes mostres de vi contaminades artificialment amb *S.cerevisiae* i *H. uvarum*. També es va validar la utilitat de la tècnica amb la quantificació de mostres obtingudes de dues fermentacions reals fermentades a diferent temperatura.

En tots els casos, els resultats obtinguts per la PCR a temps real van ser contrastats amb els obtinguts per creixement en placa.

Els resultats es presenten en el Capítol 4 d'aquesta tesi.

En el següent quadre es presenta de manera resumida els objectius proposats en aquesta tesi i el pla de treball per tal d'assolir-los:

<u>TÈCNiques DESENVOLUPADES</u>		<u>VALIDACIÓ DE LA TÈCNICA</u>	<u>RESULTATS</u>
ERIC-PCR REP-PCR	Caracterització i identificació de llevats vínics mitjançant amplificació d'elements repetitius, ERIC i REP, descrits en genoma bacterià.	<ul style="list-style-type: none"> Identificació de colònies aïllades d'una vinificació en negre. Estudi ecològic amb diferents condicions de fermentació. Efecte del grau de maduració del raïm i de la maceració en fred sobre la dinàmica poblacional. 	Capítol 1 i 2
QPCR totals	Quantificació de llevats totals mitjançant detecció de DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Quantificació de llevats totals de vi contaminat artificialment. Quantificació de llevats totals i viables aïllats d'una vinificació en blanc, en negre i d'envelliment. 	Capítol 3
RT-QPCR totals	Quantificació de llevats totals viables mitjançant detecció de rRNA.		
QPCR <i>Saccharomyces</i> spp. QPCR <i>Hanseniaspora</i> spp.	Detecció i quantificació d'espècies d'importància enològica a partir de DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Quantificació de <i>S.cerevisiae</i> i <i>H.uvarum</i> de vi contaminat artificialment. Quantificació de <i>Saccharomyces</i> spp. i <i>Hanseniaspora</i> spp. d'una fermentació alcohòlica real. 	Capítol 4

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

1. LLEVATS I FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA.

Els microorganismes presents durant la vinificació són principalment llevats, bacteris làctics i bacteris acètics. Durant el complex procés d'elaboració del vi, tots aquests microorganismes van desenvolupant-se i interaccionant entre si, però són els llevats els que juguen el paper principal ja que són els responsables de la transformació del most en etanol (Pretorius, 2000). Però els llevats no tan sols produiran etanol i diòxid de carboni, durant la fermentació alcohòlica també es sintetitzen tot una sèrie de metabolits secundaris que, col·lectivament, determinaran les característiques organolèptiques del vi.

Saccharomyces cerevisiae és el llevat que realitzarà la funció principal, la fermentació alcohòlica; però unes altres espècies, anomenades genèricament llevats no-*Saccharomyces*, també tenen una gran incidència durant el procés. Aquests poden aportar una millora qualitativa al vi, augmentant la complexitat aromàtica d'aquest o poden actuar de manera perjudicial, conferint al vi greus defectes tant aromàtics com gustatius.

1.1. Taxonomia

Durant més d'un segle la classificació dels llevats es va dur a terme mitjançant la taxonomia clàssica. Aquesta classifica els llevats segons les seves característiques morfològiques i fisiològiques (Lodder i Kreger van Rij, 1967; Kreger van Rij, 1984; Kurtzman i Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000). Però el desenvolupament de la biologia molecular poc a poc ha anat desplaçant aquest tipus de classificació tediosa i molt cops erràtica donant pas a la classificació de llevats a través de la taxonomia molecular.

Dins el grup *Eumycetes* o fongs vertaders, es distingeixen quatre grups morfològics: els *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*) i *Basidiomycetes*. Els llevats són fongs unicel·lulars que poden multiplicar-se asexualment per gemació o fissió i sexualment

mitjançant la formació d'espores. Segons el tipus d'espóra sexual que formen, aquests es classifiquen en *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*. Els *Ascomycetes* produeixen ascospores que es troben tancades en una espècie de sac (asca) i els *Basidiomycetes* formen unes hifes o basidis a l'extrem dels quals es produiran les basidiospores. Els llevats d'interès enològic pertanyen principalment al grup dels *Ascomycetes* i representen tan sols una quinzena d'espècies de les prop de 700 que es coneixen (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). L'actual classificació dels llevats *Ascomycetes* comprèn tres classes, els *Archiascomycetes*, *Euascomycetes* i *Hemiascomycetes* (veure Taula 1). La majoria dels llevats vínics *Ascomycetes* es troben dins dels ordres *Schizosaccharomycetales* i *Saccharomycetales*, els quals s'inclouen dins les classes *Archiascomycetes* i *Hemiascomycetes*, respectivament. Els *Hemiascomycetes* estan dividits en 9 famílies a les que pertanyen 51 gèneres i 432 espècies. (Barnett *et al.*, 2000).

Taula 1. Classificació dels principals gèneres de llevats d'interès enològic en base a les seves característiques fenotípiques (Barnett *et al.*, 2000).

GRUP	CLASSE	ORDRE	FAMÍLIA	GÈNERE
	<i>Archiascomycetes</i>	<i>Schizosaccharomycetales</i>	<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Ascomycetes</i>	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Candidaceae</i>	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i> <i>Rhodotorula</i>
			<i>Metschnikowiaceae</i>	<i>Metschnikowia</i>
			<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>
			<i>Saccharomycodaceae</i>	<i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomycodes</i>
			<i>Dipodascaceae</i>	<i>Yarrowia</i>
			<i>Phaffomycetaceae</i>	
			<i>Ermotheciaceae</i>	
			<i>Lipomycetaceae</i>	
			<i>Saccharomycopsidaceae</i>	
			<i>Euascomycetes</i>	

1.2. Característiques generals dels llevats.

Els llevats són els microorganismes eucariotes més senzills i poden presentar forma globular, el·líptica, ovoide, apicular o cilíndrica més o menys allargada. Com totes les cèl·lules eucariotes, posseeixen una paret cel·lular i una membrana plasmàtica i diferents corpuscles intracel·lulars (nucli, mitocondries, vacuoles, etc.) envoltats per una membrana. La paret cel·lular a part de la seva funció protectora, dona forma i rigidesa a la cèl·lula. Esta formada per β -glucans (60%) i

manoproteïnes (25-50%). Immediatament per sota de la paret es troba la membrana plasmàtica la qual envolta tot el citoplasma. Aquesta està formada principalment per lípids (fosfolípids i esterols, formant una bicapa lipídica) i proteïnes. La membrana citoplasmàtica presenta diversos mecanismes de transport que determinen el seu paper com a principal barrera i control de permeabilitat.

Els llevats, en el seu interior també presenten altres estructures membranoses com són el reticle endoplasmàtic, l'aparell de Golgi, els lisosomes, les mitocondries... i el nucli, on el material genètic està organitzat en cromosomes. El número de cromosomes varia segons el microorganisme.

La majoria de llevats tenen un cicle de reproducció asexual per gemació, excepte el gènere *Schizosaccharomyces* que es reproduïxen asexualment per bipartició. Els llevats poden reproduir-se sexualment amb la formació d'ascospores.

1.3. Fermentació alcohòlica

Els llevats són els responsables del principal procés metabòlic que es produeix en la vinificació, la fermentació alcohòlica. Aquesta consisteix en la transformació dels sucres del most en etanol i diòxid de carboni i el principal llevat responsable d'aquesta transformació és *S.cerevisiae*. La concentració total de sucres en el most generalment està entre 170 i 220 g/l (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) i les dues hexoses majoritàries són la glucosa i la fructosa les quals es troben en proporció equimolar. Però a part dels sucres hi ha altres components importants que podem trobar en el most i que tenen una gran influència en el procés de fermentació com són els àcids orgànics (àcid tartàric, màlic, cítric, glucònic, succínic, etc.), els compostos nitrogenats (amoni i aminoàcids), les sals minerals i les vitamines.

Altres paràmetres a tenir en compte durant la fermentació alcohòlica són:

-La temperatura. Aquest és un dels paràmetres més importants tant per al creixement del llevat com per a la correcta evolució de la vinificació. Per això és necessari un control acurat de la temperatura, 25-30°C en vinificacions en negre per a una major extracció de compostos fenòlics i 15-20°C en vinificacions en blanc, per retenir els compostos aromàtics. També s'ha de tenir en compte que la tolerància a l'etanol va molt lligada amb la temperatura. La toxicitat de l'etanol augmenta amb la temperatura i aquest augment de temperatura provoca també la pèrdua de compostos volàtils essencials per a les característiques organolèptiques del vi (Torija *et al.*, 2003), sobretot en vins blancs. Algunes espècies no-*Saccharomyces* com per exemple *Hanseniaspora uvarum* i *Candida stellata*, són menys tolerants a concentracions elevades d'etanol que *S.cerevisiae*, no obstant, la tolerància d'aquests llevats augmenta notablement a baixes temperatures, podent esdevenir un problema en vinificacions en blanc.

- pH. El pH del most oscil·la entre 2,8 i 4,2 (Heard i Fleet, 1988). Aquest interval de pH no suposa cap problema per al creixement dels llevats. Tan sols sorgeixen problemes amb valors inferiors a 2,8 degut a què a pH baixos s'incrementa l'efecte tòxic de l'etanol i del SO₂ (Pampulha i Loureiro-Dias, 1989).

- Aireació. *S.cerevisiae* és un microorganisme aerobi facultatiu capaç de consumir sucres en absència d'oxigen millor que altres llevats no-*Saccharomyces* (Visser *et al.*, 1990). Però certa quantitat d'oxigen és necessària per a la síntesi de determinats compostos cel·lulars (àcids grassos insaturats i esterols), per aquest motiu és convenient l'aireació durant la fermentació alcohòlica.

La principal ruta de degradació dels sucres al llarg de la fermentació alcohòlica és la glicolisis (Figura 1). La glicolisis és una via oxidativa en la que s'obté àcid pirúvic i energia en forma d'ATP. Posteriorment aquest àcid pirúvic serà descarboxilat a acetaldehid i CO₂ mitjançant

l'enzim piruvat descarboxilasa. Per últim l'acetaldehid es reduït a etanol per l'enzim alcohol deshidrogenasa.

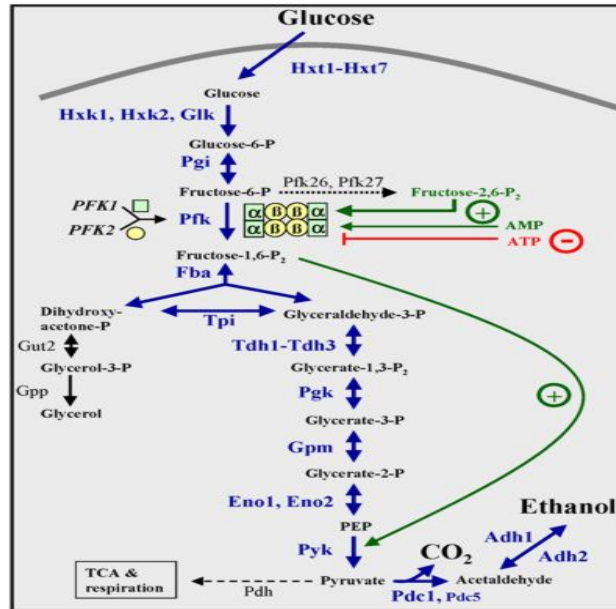


Figura 1. Esquema de la glicolisis.

Durant la fermentació alcohòlica i com a resultat del metabolisme dels llevats vínics, es generen tot una sèrie de compostos volàtils com alcohols superiors, esters, àcids orgànics, aldehids, àcids grassos, etc. Aquests són de gran importància ja que confereixen al vi unes característiques organolèptiques determinades. La concentració d'aquests compostos i l'equilibri entre ells determinarà quin efecte sensorial s'esdevé en el vi, podent tenir tant una millora aromàtica del producte com l'aparició de greus defectes organolèptiques. Els compostos aromàtics més importants quantitativament parlant, són els alcohols superiors i els esters (Taula 2).

Taula 2. Principals compostos aromàtics sintetitzats per llevats vínics durant la fermentació alcohòlica (Soles *et al.*, 1982; Amerine i Roessler, 1983; Chatonnet *et al.*, 1992; 1995; Dubois, 1994; Zoecklein *et al.*, 1995; Lambrechts i Pretorius, 2000; Rojas *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2003)

Compost	Aroma	Llindar de detecció (mg/L)
Alcohols superiors		
propanol	alcohol	500
butanol	alcohol	150
alcohol isoamílic	whisky, cremat	30
hexanol	herbaci	4
2-feniletanol	rosa, mel	< 300
	alcohol	> 400
Esters d'acetat		
acetat d'etil	afruitat	< 50
	pegament	> 200
acetat 2-fenil etil	rosa, mel	0,01-8
acetat d'isoamil	plàtan, pera	0,03
acetat d'isobutil	plàtan	1,6
acetat d'hexil	poma madura	0,67-2,4
Esters etílics		
butanoat d'etil	floral, afruitat	0,02
caprilat d'etil	pinya, pera	0,26-0,58
hexanoat d'etil	poma verda	0,05
octanoat d'etil	afruitat	0,005
Àcids grassos volàtils		
àcid acètic	vinagre	700-1100
àcid butíric	ranci, formatge	0,17

àcid propiònic	ranci	8
àcid hexanoic	amarg, ranci	8
àcid octanoic	oliós, mantega	13
Aldehids volàtils		
acetaldehid	èter, amarg	100
diacetil	mantega	0,2-2,8
Fenols volàtils		
4-vinil fenol	medicinal, pintura	770 µg/l
4-vinil guaiacol	fumats, espècia(clau)	< 440 µg/l
	farmàcia, tabac quitrà	> 750 µg/l
4-etil fenol	fumats, espècia(clau)	< 400 µg/l
	farmàcia	> 620 µg/l
4-etil guaiacol	fumats, espècia(clau)	< 100 µg/l
	farmàcia, tabac quitrà	> 100 µg/l
Compostos sofrats		
sulfur d'hidrogen	ou podrit	50-80 µg/l
Etil mercaptà	ceba, goma	1,1 µg/l
metil mercaptà	ous podrits, col	2-12 µg/l
sulfur de dietil	verdura, all podrit	0,92 µg/l
sulfur de dimetil	espàrrecs, panís	25 µg/l
Compostos carbonílics		
acetaldehid	oxidat	100
benzaldehid	ametlla amarga	
diacetil	mantega	0,15
pentanal	cacau, cafè	
2-acetil-tetrahidropiridina	orina de ratolí (mousy)	1,6 x 10 ⁻³

1.4. Influència dels llevats no-*Saccharomyces* durant la fermentació alcohòlica.

L'elaboració del vi és un procés que implica l'acció combinada de diferents espècies de llevats. *S.cerevisiae* és el principal llevat responsable de la fermentació alcohòlica, però durant els primers dies de fermentació els llevats no-*Saccharomyces* poden tenir una gran influència en la composició final del vi degut a què són molt abundants (poden arribar a valors de 10^6 - 10^7 UFC/ml) (Fleet i Heard, 1993; Kunkee i Bisson, 1993). I encara que el seu nombre disminueix al llarg de la fermentació, poden mantenir-se poblacions força elevades les quals influiran de manera decisiva en l'aroma i gust del vi. Però no tan sols durant la vinificació la presència d'aquests llevats pot afectar, durant l'envelliment en barrica o l'emmagatzematge en ampolla també poden exercir alguna influència sobre el producte.

La influència dels llevats no-*Saccharomyces* sobre la qualitat del vi pot atribuir-se a diferents factors. Com ja hem comentat anteriorment, un dels més importants és la síntesi de compostos volàtils els quals contribueixen de manera positiva o negativa en la qualitat aromàtica del vi depenent de la seva concentració. Un altre aspecte a tenir en compte és la capacitat dels llevats no-*Saccharomyces* per secretar enzims, aquests poden millorar alguna etapa del procés de vinificació com la filtració i la clarificació i els atributs sensorials del vi, especialment l'aroma. Però els llevats no-*Saccharomyces* poden generar també tot una sèrie de problemes físico-químics com turbidesa, viscositat, formació de sediments i pel·lícules; exercint així un paper negatiu sobre la qualitat del vi.

1.4.1. Síntesi de compostos aromàtics.

La capacitat per produir compostos volàtils és una característica general de tots els llevats, però la quantitat varia en funció de l'espècie i de la soca (Egli *et al.*, 1998; Henick-Kling *et al.*, 1998) (Taula 3).

Taula 3. Compostos volàtils sintetitzats per llevats no-*Saccharomyces* durant el procés de vinificació.

Llevat no- <i>Saccharomyces</i>	Compost	Referències
<i>Brettanomyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fenols volàtils (olor a cuir, estable, farmacèutic...). • Acetil-2-tetrahidropiridina ("mousy"). • Augment de l'acidesa volàtil. 	Heresztyn, 1986; Chatonnet <i>et al.</i> , 1995 ; Boulton <i>et al.</i> , 1996
<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Àcid succínic. • Esters d'acetat (principalment acetat d'etil). • Concentracions elevades d'acetaldehid. • Augment de l'acidesa volàtil. 	Fleet, 1992; Ciani, 1997; Fugelsang, 1997; Fleet, 1998
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohols superiors a concentracions baixes. • Glicerol. • Augment de l'acidesa volàtil. • Acetaldehid i acetoïna en excés. 	Ciani i Maccarelli, 1998; Romano, 2002
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohols superiors a concentracions baixes. • Esters d'acetat en general. • Glicerol i acetoïna. • Acetat d'etil i metilbutil acetat, en excés (>200mg/L). • Augment de l'acidesa volàtil. 	Herraiz <i>et al.</i> , 1990; Fleet, 1992; Sponholz, 1993; Zoecklein <i>et al.</i> , 1995; Boulton <i>et al.</i> , 1996; Gil <i>et al.</i> , 1996; Romano <i>et al.</i> , 1997a; Plata <i>et al.</i> , 2003
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acetaldehid i acetoïna en excés. • Concentracions elevades d'acetat d'etil. 	Granchi <i>et al.</i> , 2002
<i>Issatchenkia terricola</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Esters d'acetat (principalment acetat d'etil). 	Clemente-Jimenez <i>et al.</i> , 2004
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acetat d'etil i acetaldehid en excés. • Esters (caprilat d'etil, 2-fenil etanol i 2,3-butanediol). 	Sponholz, 1993; Clemente-Jimenez <i>et al.</i> , 2004

<i>Picchia anomala</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acetat d'etil i metilbutil acetat, en excés (>200mg/L). • Augment de l'acidesa volàtil. 	Fleet, 1992; Boulton <i>et al.</i> , 1996; Plata <i>et al.</i> , 2003
<i>Picchia fermentans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohols superiors (1-propanol, n-butanol i 1-hexanol). • Esters (capilat d'etil, 2-fenil etanol i 2,3-butanediol). 	Clemente-Jimenez <i>et al.</i> , 2004; 2005
<i>Picchia guilliermondii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fenols volàtils en excés (principalment 4-etil fenol). 	Dias <i>et al.</i> , 2003
<i>Pichia membranifaciens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Concentracions elevades d'acetaldehid. • Acetat d'etil, en excés (>200mg/L). • Augment de l'acidesa volàtil. 	Lafon-Lafourcade, 1986; Fleet, 1992; Zoecklein <i>et al.</i> , 1995;
<i>Rhodotorula spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Esters d'acetat (principalment acetat d'isoamil). • Vins amb gust a suro. 	Suomalainen i Lehtonen, 1979; Charpentier, 1977
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Concentracions elevades d'acetaldehid i acetoïna. 	Fleet, 1992; Boulton <i>et al.</i> , 1996
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acetaldehid a baixes concentracions. 	Ciani, 1997
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Augment de l'acidesa volàtil. 	Sponholz, 1993; Boulton <i>et al.</i> , 1996 ; Fugelsang, 1996, 1998.

Diversos estudis han demostrat que determinades soques de llevats apiculats com *H. uvarum*, a l'inici de la fermentació alcohòlica contribueixen a un millor aroma i major complexitat del vi ja

que produeixen elevades quantitats de glicerol, esters i acetoïna (Romano *et al.*, 1996; 1997a). Però s'ha de tenir en compte que *H. uvarum*, a l'igual que *Pichia anomala* i *Metschnikowia pulcherrima*, poden generar seriosos problemes en el vi ja que poden produir grans quantitats d'acetat d'etil i àcid acètic abans i durant els primers estadis de la fermentació (Romano *et al.*, 1992; Plata *et al.*, 2003).

Altres llevats, com és el cas del *Zygosaccharomyces bailii* i el *Saccharomyces ludwigii*, són especialment problemàtics degut a què són altament tolerants a concentracions elevades d'etanol (>15%) i pH baixos (< 2) i a més són resistents a SO₂. Inclús una sobredosificació de sulfurós pot afavorir el creixement de *Saccharomyces ludwigii*, fet que s'ha detectat en mostos intensament sulfitats de zones càlides espanyoles (Suárez i Íñigo, 1992). Però entre tots els llevats causants d'alteracions víniques, hem de tenir especial atenció al gènere *Brettanomyces* (anamorf del gènere *Dekkera*) i concretament a l'espècie *Brettanomyces bruxellensis*. Aquesta espècie rarament es troba entre la microbiota natural del raïm i durant el procés de fermentació, però la seva capacitat de desenvolupar-se tant en aerobiosis com en anaerobiosis quasi estricta, a vegades a partir de traces de sucres residuals presents en els vins, la fa especialment perillosa. Així, podem trobar la seva presència al final de la fermentació alcohòlica i malolàctica o durant la criança en barrica. L'alteració organolèptica més greu que pot produir *D.bruxellensis* és la causada per la síntesi excessiva de fenols volàtils. La formació d'acetil-2-tetrahidropiridina i d'acetil prolina (aroma a orina de ratolí "mousy") també és un motiu de preocupació (Chatonnet *et al.*, 1992; 1995; 1997).

1.4.2. Producció d'enzims.

La producció de determinats enzims per part de microorganismes implicats en la fermentació alcohòlica té un efecte beneficiós en la qualitat final del vi. L'activitat d'aquests enzims repercuteix de manera positiva en algunes etapes del procés de vinificació; les pectinases

afavoreixen la clarificació i la filtració dels vins com a conseqüència de la degradació de pectines, les proteases també milloren la clarificació i estabilitat del vi degut a la hidròlisi de proteïnes, els enzims cel·lulolítics i hemicel·lulolítics permeten una major extracció de color i aroma procedent de la pell del raïm i les glicosidases són responsables d'un augment aromàtic del vi ja que precursors glicosidats no-volàtils presents en el raïm són hidrolitzats alliberant-se terpens (geraniol, nerol, linalool, etc.).

Encara que hi ha algun estudi sobre l'activitat enzimàtica de *S.cerevisiae* (McKay, 1990; Delcroix *et al.*, 1994), aquest no es reconeix com un destacat productor d'enzims. Els llevats no-*Saccharomyces* són els principals productors de proteases extracel·lulars, lipases, esterases, β -glucosidases... (Taula 4). Però la producció enzimàtica presenta gran variabilitat, és una característica de gran heterogeneïtat entre soques (Federici, 1983).

Taula 4. Principals enzims produïts per llevats no-*Saccharomyces* durant el procés de vinificació.

Enzim	Llevat no- <i>Saccharomyces</i>	Referència
Pectinases		
Pectin metilesterasa	<i>Candida krusei</i>	Bell i Etchells, 1956
	<i>Debaryomyces membranaefaciens</i> var. <i>hollandius</i>	
	<i>Rhodotorula</i>	
Poligalacturonasa	<i>Candida norvegensis</i>	Lagace i Bisson, 1990; Fernández <i>et al.</i> , 2000; Strauss <i>et al.</i> , 2001
	<i>Candida oleophila</i>	
	<i>Candida pulcherrima</i>	
	<i>Candida silvae</i>	
	<i>Candida stellata</i>	
	<i>Candida tropicalis</i>	

Proteases			
	<i>Candida flavus</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Lagace i Bisson, 1990;
	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Charoenchai <i>et al.</i> ,
	<i>Candida olea</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1997; Dzy i Bisson,
	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Pichia anomala</i>	2000; Fernández <i>et al.</i> ,
	<i>Candida stellata</i>	<i>Torulopsis magnolia</i>	2000; Strauss <i>et al.</i> ,
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Torulopsis monosa</i>	2001
Enzims cel·lulolítics			
Cel·lulasa	<i>Candida albicans</i>		Lagace i Bisson, 1990;
	<i>Candida hellenica</i>		Chambers <i>et al.</i> ,1993;
	<i>Candida pulcherrima</i>		Fernández <i>et al.</i> , 2000;
	<i>Candida stellata</i>		Strauss <i>et al.</i> , 2001
β -glucanasa	<i>Candida hellenica</i>		
	<i>Candida lambica</i>		
	<i>Candida pulcherrima</i>		Lagace i Bisson, 1990;
	<i>Candida sorbosa</i>		Fernández <i>et al.</i> , 2000;
	<i>Candida stellata</i>		Strauss <i>et al.</i> , 2001
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
Enzims hemicel·lulolítics			
Xilanasa	<i>Candida oleophila</i>		Lagace i Bisson, 1990;
	<i>Candida pelliculosa</i>		Fernández <i>et al.</i> , 2000;
	<i>Candida pulcherrima</i>		Strauss <i>et al.</i> , 2001
	<i>Candida stellata</i>		
Glicosidases			

β -glucosidasa	<i>Candida stellata</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Rosi <i>et al.</i> , 1994;
	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Charoenchai <i>et al.</i> ,
	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1997; Manzanares <i>et</i>
	<i>Candida hellenica</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>al.</i> , 2000; Strauss <i>et al.</i> ,
	<i>Candida vini</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2001; Mansfield <i>et al.</i> ,
	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	2002; Rodríguez <i>et al.</i> ,
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	2004
β -xilosidasa	<i>Hanseniaspora osmophila</i>		Manzanares <i>et al.</i> ,
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		1999; Capece <i>et al.</i> ,
	<i>Pichia anomala</i>		2005
α -ramnosidasa	<i>Candida guilliermondii</i>		Rodríguez <i>et al.</i> , 2004
α -arabinofuranosidasa	<i>Pichia anomala</i>		Yanai i Sato, 2000;
	<i>Pichia capsulata</i>		Spagna <i>et al.</i> , 2002

1.4.3. Alteracions físico-químiques.

La qualitat del vi també es pot veure afectada com a conseqüència d'una sèrie d'alteracions físico-químiques produïdes pels llevats no-*Saccharomyces* (Taula 5). Alguns d'aquests problemes són refermentacions de vins acabats produint-se gran quantitat de CO₂ i donant una aspecte tèrbol al vi, formació de pel·lícules a la superfície del vi, formació de floculs i sedimentació.

Taula 5. Alteracions físico-químiques del vi causades per llevats no-*Saccharomyces*

Alteració	Llevats	Referències
Formació de pel·lícula.	<i>Candida</i> spp.	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1997
	<i>Dekkera</i> spp.	Vollekova <i>et al.</i> , 1996
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Vollekova <i>et al.</i> , 1996
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Vollekova <i>et al.</i> , 1996
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1997
	<i>Pichia anomala</i>	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1997
	<i>Pichia vini</i>	Fleet, 1992
	<i>Pichia membranifaciens</i>	Fleet, 1992; Vollekova <i>et al.</i> , 1996
Sedimentació en ampolla.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Boulton <i>et al.</i> , 1996; Fugelsang, 1997
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1996, 1998.
	<i>Pichia membranifaciens</i>	Fleet, 1992
Formació de floculs.	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Fleet, 1992; Boulton <i>et al.</i> , 1996
Refermentacions en ampolla.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Boulton <i>et al.</i> , 1996; Fugelsang, 1997
Fermentacions secundàries amb gran producció de CO ₂ .	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1996, 1998.

2. TÈCNIQUES D'IDENTIFICACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LLEVATS.

2.1. Mètodes clàssics d'identificació.

Tradicionalment, els llevats han estat classificats segons les seves característiques morfològiques i propietats fisiològiques i bioquímiques (Kurtzman i Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

- Criteris morfològics: reproducció vegetativa (gemació, bipartició), reproducció sexual (zigot, espores), morfologia cel·lular en medi líquid i sòlid, formació de vel, aspecte de la colònia...
- Criteris fisiològics i bioquímics: fermentació i assimilació de sucres (glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa, etc.), poder fermentatiu, assimilació d'àcids orgànics, creixement a diverses temperatures, assimilació de nitrats, necessitats en vitamines, desenvolupament en presència d'etanol...

Però aquestes tècniques de classificació són complexes, tedioses i lentes i en alguns casos poden portar a classificacions incorrectes (Lin i Fung, 1987; Deák i Beuchat, 1996), ja que les característiques fisiològiques poden variar en funció de les condicions del cultiu i a vegades les espècies estan delimitades per una sola característica fisiològica. També es poden produir confusions ja que en alguns casos apareix una dualitat en la nomenclatura, una mateixa espècie es nomenada de manera diferent segons si es troba en estat vegetatiu (anamorf) o bé si es troba en estat sexual (teleomorf), un exemple seria l'espècie *Brettanomyces bruxellensis* (anamorf) i *Dekkera bruxellensis* (teleomorf).

Els progressos en la biologia molecular han proporcionat un gran nombre de marcadors per a la caracterització i identificació de llevats. Aquestes tècniques es presenten com a millor alternativa als mètodes tradicionals degut a la seva fiabilitat i rapidesa.

2.2. Mètodes moleculars: identificació a nivell d'espècie.

Les tècniques moleculars de caracterització i identificació d'espècies es basen en la utilització de diferents marcadors moleculars (principalment basats en la molècula d'ADN) que són idèntics per a les diferents soques de la mateixa espècie. A continuació es descriuen algunes de les tècniques més emprades en la identificació d'espècies de llevats vínic.

2.2.1. Seqüenciació de gens ribosomals.

Els eucariotes presenten els gens que codifiquen els diferents RNA ribosòmics agrupats en tàndem i formant unitats de transcripció que es repeteixen al llarg del genoma entre 100 i 200 vegades. Existeixen dos unitats transcripcionals que són adjacents però que es transcriuen separatament. Una d'aquestes unitats està formada pel gen que codifica el RNA ribosòmic 5S i l'altra unitat transcripcional està formada pels gens ribosomals 5.8S, 18S i 26S i per dos espais intergènics (ITS1 i ITS2) i dos espais externs (ETS). A més, aquestes dues unitats codificants estan separades pels espais intergènics IGS també anomenats NTS (Figura 2).

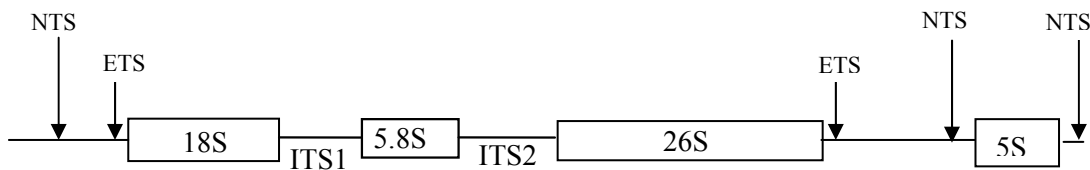


Figura 2. Esquema de l'organització del gens ribosomals en eucariotes.

Els gens ribosomals (5.8S, 18S i 26S) presenten unes seqüències bastant conservades a nivell de gènere i espècie, l'anàlisi de les quals ha esdevingut una eina molt útil per a establir relacions filogenètiques i identificar espècies. Les regions ribosomals més utilitzades per a la seqüenciació són el domini D1/D2, situat a l'extrem 5' del gen ribosomal 26S (Kurtzman i Robnett, 1998) i el gen 18S (James *et al.*, 1994). La tècnica consisteix en amplificar aquestes regions conservades

mitjançant PCR i posteriorment seqüenciar el fragment amplificat. La comparació de les seqüències obtingudes amb seqüències disponibles a bases de dades, permet la identificació d'espècies. L'eina BLAST (Basic Alignment Search Tool; <http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>) permet realitzar aquesta comparació entre seqüències. Alineaments amb homologies iguals o superiors a 99% es consideren pertanyents a la mateixa espècie (Kurtzman i Robnett, 1998).

La seqüenciació del domini D1/D2 és acceptat universalment com a la principal eina per a la realització de classificacions taxonòmiques. Per tant, és una tècnica que ha estat força utilitzada tant per realitzar reclassificacions d'espècies, com és el cas de Kurtzman (2000) que va identificar nous llevats del gènere *Pichia* que no havien estat reconeguts com a nous quan s'havien utilitzats tècniques d'identificació convencionals; com per identificar noves espècies (Fonseca *et al.*, 2000; Sipiczki, 2003; Rao *et al.*, 2007). Aquesta tècnica també s'ha emprat per realitzar estudis sobre la diversitat microbiològica al llarg d'una fermentació alcohòlica (van Keulen *et al.*, 2004; Baleiras Couto *et al.*, 2005). Per altra banda, la seqüenciació del gen 18S ha estat emprada per realitzar estudis filogenètics de llevats del gènere *Saccharomyces* (James *et al.*, 1997) i de llevats no-*Saccharomyces* pertanyents al gènere *Dekkera*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* (Yamada *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 1996) i *Zygosaccharomyces* (James *et al.*, 1994).

2.2.2. Anàlisis dels perfils de restricció (RFLPs) del rDNA.

La tècnica d'anàlisis de perfils restricció (RFLPs) consisteix en la comparació dels patrons de restricció de diferents regions de la zona ribosomal. Una de les més utilitzades per l'identificació de llevats és la regió compresa entre el gen ribosomal 18S i 26S, la qual inclou els dos espais intergènics (ITS1 i ITS2) i el gen ribosomal 5.8S. Per a obtenir una gran quantitat de còpies d'aquesta regió, s'amplifica mitjançant PCR i posteriorment el fragment amplificat es digereix

amb diferents enzims de restricció donant lloc a un patró de fragments espècie-específic. El patró de restricció resultant serveix de referència per a la identificació de nous aïllats.

Aquesta tècnica ha estat vastament utilitzada per a la identificació d'espècies d'interès vínic. Guillamón *et al.* (1998) va realitzar la caracterització i identificació de 38 soques pertanyents a 33 espècies de llevats de col·lecció. Posteriorment, aquesta identificació va ser ampliada per Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) amb la caracterització de 243 soques pertanyents a 132 espècies de llevats diferents i recentment, de Llanos *et al.* (2004) i Villa-Carvajal *et al.* (2006) han realitzat la identificació d'espècies pertanyents al gènere *Candida* i al gènere *Pichia*, respectivament. La caracterització i identificació de llevats de col·lecció també ha estat ampliada al gènere *Saccharomyces*. Fernández-Espinar *et al.* (2000) van identificar soques pertanyents als grups *Saccharomyces sensu stricto* i *Saccharomyces sensu lato* i a un grup de *Saccharomyces* aïllats d'un procés de criança biològica, coneguts com a llevats de flor.

La senzillesa i rapidesa de la tècnica ha fet que sigui una de les més aplicades en la realització d'estudis ecològics. S'ha utilitzat per a la identificació d'espècies de llevats presents en la superfície del raïm (Sabaté *et al.*, 2002; Raspor *et al.*, 2006), en estudis de dinàmica poblacional en fermentacions inoculades (Constantí *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1989; Ganga i Martínez, 2004) i en fermentacions espontànies (Fernández *et al.*, 1999; Torija *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2006). També s'ha utilitzat en estudis enzimàtics on llevats aïllats de fermentacions i considerats interessants per la seva activitat enzimàtica han estat identificats a nivell d'espècie per aquesta tècnica (Fernández *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004).

2.2.3. PCR-DGGE.

Aquesta tècnica es fonamenta en les propietats desnaturalitzants del DNA. Les dues cadenes de DNA es separen quan s'aplica calor o un agent químic desnaturalitzant. Depenent de l'agent utilitzat parlarem, de la tècnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) quan fem servir un agent químic com la urea i la formamida o de la tècnica TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) quan utilitzem la temperatura per desnaturalitzar.

La tècnica PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1993) consisteix en amplificar una regió del genoma mitjançant PCR i posteriorment aquests amplicons es sotmeten a una electroforesis en gel de poliacrilamida el qual presenta un increment lineal del seu gradient desnaturalitzant. Inicialment els fragments es mouran segons el seu tamany, però les condicions desnaturalitzants faran que aquests es moguin depenent la seva seqüència. Per tant, petits fragments de DNA (200-700 pb) d'igual tamany però amb petites diferències en la seva seqüència (inclús de tan sols una base) poden ser separats ja que la seva mobilitat davant agents desnaturalitzants serà diferent. Per obtenir una major resolució s'evita la completa desnaturalització de la doble cadena de DNA incorporant a l'extrem 5' d'un dels primers utilitzats en la PCR, un domini anomenat "GC-clamp" el qual consisteix en una seqüència de quaranta GC aproximadament.

Encara que aquesta tècnica suposa una preparació significativa i un temps d'anàlisi llarg i complex comparat amb altres tècniques, s'ha de tenir en compte les seves avantatges: un alt grau de detecció, alta sensibilitat i la possibilitat d'identificar directament microorganismes sense la necessitat d'aïllar-los. Per aquest motiu, la tècnica PCR-DGGE ha estat àmpliament utilitzada per a la caracterització i identificació de microorganismes relacionats amb el vi. Algunes de les aplicacions d'aquesta tècnica han estat la identificació de bacteries acètiques i làctiques (López *et al.*, 2003; Renouf *et al.*, 2006a) durant la fermentació alcohòlica, l'avaluació de la diversitat de llevats en fermentacions procedents de raïm afectat per *Botrytis* (Mills *et al.*, 2002; Divol *et al.*,

2006), la identificació de llevats en mostres de raïm (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004), la confirmació de la presència de *Dekkera bruxellensis* i *D. anomala* en mostres de vi (Cocolin *et al.*, 2004a) i l'estudi d'interaccions entre *D. bruxellensis* i altres espècies de llevats (no-*Saccharomyces* i *Saccharomyces*) durant la vinificació (Renouf *et al.*, 2006b).

2.2.4. FISH.

La tècnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) es basa en la utilització d'unes sondes de DNA o RNA marcades amb un fluorocrom, com per exemple la fluoresceïna, que són capaces d'hibridar-se amb àcids nucleics diana complementaris. Posteriorment a la hibridació, s'observen les cèl·lules marcades mitjançant un microscopi de fluorescència. Un avantatge d'aquesta tècnica és la possibilitat d'utilitzar diferents sondes marcades amb diferents fluorocroms, permetent així la identificació simultània de múltiples espècies en una mescla de poblacions. Per a la identificació d'espècies normalment s'utilitza com a molècula diana el rDNA, ja que la variabilitat entre les seqüències de rDNA permet una identificació amb una elevada exactitud.

Una alternativa a les tradicionals sondes de DNA són les sondes anomenades PNA (peptide nucleic acid). Les PNAs són molècules artificials anàlogues als àcids nucleics on l'esquelet de ribosa-fosfat s'ha substituït per un polímer d'aminoetilglicina (Nielsen *et al.*, 1991). Aquestes molècules segueixen les regles d'hibridació de Watson-Crick (Egholm *et al.*, 1993) i degut a les seves característiques físico-químiques, la hibridació entre PNA i el DNA complementari resulta més estable i específic que la unió entre molècules de DNA. La principal avantatge de les sondes PNA sobre les tradicionals sondes de DNA, és que no existeix cap enzim (DNasa, RNasa o proteasa) que el pugui degradar. Per totes aquestes avantatges, la tècnica FISH es realitza majoritàriament utilitzant sondes PNA.

Aplicacions de la tècnica FISH, en el camp de l'enologia, han estat la realització d'estudis de diversitat poblacional de llevats en una vinificació en blanc i en negre (Xufre *et al.*, 2006) i la identificació de bacteries làctiques en el vi (Sohier i Lonvaud-Funel, 1998; Blasco *et al.*, 2003). Aquesta tècnica també ha estat utilitzada per a la detecció de llevats alterants del vi, *D.bruxellensis* (Stender *et al.*, 2001; Connell *et al.*, 2002). En aquests treballs les sondes utilitzades van ser PNAs.

2.3. Mètodes moleculars: identificació a nivell de soca.

Hi ha tot una sèrie de factors que repercuteixen en el procés de vinificació i la qualitat final del vi (poder fermentatiu del llevat, producció d'etanol, síntesi d'enzims, producció de metabolits secundaris...) i que es troben lligats no tan sols a l'espècie de llevat sinó a la soca. És per aquest motiu, l'interès per disposar de tècniques que ens permetin identificar soques de llevats.

A continuació es presenten algunes de les tècniques més utilitzades per a la identificació de llevats a nivell de soca.

2.3.1. Cariotip o separació de cromosomes en camp polsant.

La separació de cromosomes sencers es presenta com una tècnica útil per diferenciar tant a nivell d'espècie com a nivell de soca. Les diferents soques d'una mateixa espècie presenten una gran variabilitat en el nombre i el tamany dels cromosomes, per tant presenten cariotips diferents. Aquest polimorfisme cromosòmic és degut principalment a l'addició o delecció de fragments de DNA en els cromosomes mitjançant recombinació homòloga o no homòloga durant els processos de reproducció meiótica i mitòtica.

La tècnica consisteix en la separació dels cromosomes mitjançant una electroforesi en camp polsant. Aquesta electroforesi es realitza amb dos parells d'elèctrodes als quals s'aplica un

corrent elèctric de manera que es creen dos camps de direccions diferents. La modificació de la direcció del camp elèctric aplicat fa que les molècules de DNA sofreixen una reorientació. Els temps requerits per a aquesta reorientació estan en funció del tamany molecular. Per tant l'electroforesi en camp polsant permet separar molècules de gran tamany, com és el cas dels cromosomes de llevats. No obstant, aquestes electroforesis impliquen certa complexitat metodològica i un temps d'anàlisi elevat, fet que limita la utilització d'aquesta com a rutinària en la identificació de llevats.

La separació de cromosomes en camp polsant ha estat força utilitzada per diferenciar soques de llevats del gènere *Saccharomyces* (Vezinhet *et al.*, 1990; Cardinali i Martini, 1994; Guillamón *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2004; Antunovics *et al.*, 2005). En el cas de les espècies no-*Saccharomyces* presenten cariotips amb menys polimorfismes i un menor número de bandes, no obstant això la tècnica també ha estat emprada per determinar relacions taxonòmiques entre llevats (Belloch *et al.*, 1998) i per a la identificació d'aquests a nivell de soca. Versavaud i Hallet (1995) van identificar soques pertanyents a les espècies *Schizosaccharomyces pombe*, *Kloeckera apiculata* i *Candida famata* utilitzant enzims de restricció (*Not I* i *Sfi I*). Aquests enzims tallaven els cromosomes en un nombre limitat de fragments, els quals eren separats per electroforesi en camp polsant. Soques d'altres espècies no-*Saccharomyces* també han estat tipificades amb aquesta tècnica. Mitrakul *et al.*, (1999) va caracteritzar soques de *Dekkera bruxellensis* aïllades de vi i Esteve-Zarzoso *et al.* (2001b) va realitzar la caracterització de diverses espècies del gènere *Hanseniaspora*. Rodríguez *et al.* (2004) va utilitzar aquesta tècnica per identificar aquelles soques de llevats no-*Saccharomyces* seleccionades per la seva elevada activitat β -glucosidasa.

2.3.2. Anàlisi de restricció del mtDNA.

El mtDNA de *S. cerevisiae* és una molècula petita de 65 a 80 Kb la variabilitat de la qual pot ser utilitzada per diferenciar soques. Aigle *et al.* (1984) fou el primer en utilitzar l'anàlisi de restricció del mtDNA per a la caracterització de llevats cervesers, encara que no fou capaç d'identificar a nivell de soca. Posteriorment la tècnica fou aplicada amb èxit per a la caracterització de soques víniques de l'espècie *S.cerevisiae* (Dubourdiou *et al.*, 1987, Hallet *et al.*, 1988). Però en aquests treballs l'extracció del mtDNA comprenia una sèrie de passos, obtenció de protoplast per digestió enzimàtica, ultracentrifugació per gradients de clorur de cesi, purificació mitjançant extracció amb fenol-cloroform; que feien complicada l'aplicació rutinària d'aquesta tècnica. Querol *et al.* (1992a) va simplificar aquesta tècnica basant-se en què el mtDNA és una molècula molt més rica en AT i GC en comparació amb el DNA nuclear. Per tant, digestions del DNA total amb enzims de restricció del tipus GCAT tallaran amb més freqüència el DNA nuclear que el mtDNA ja que aquests enzims no reconeixen les seqüències riques en AT i en GC. Aleshores, el DNA nuclear quedarà degradat a fragments molt petits que no interferiran en la visualització d'unes bandes clarament definides corresponents als fragments de major tamany del mtDNA. Això redueix considerablement el temps d'anàlisi i la complexitat metodològica, convertint aquesta tècnica en una de les més útils per a la tipificació de soques de *Saccharomyces* spp. (Querol *et al.*, 1992b; Guillamón *et al.*, 1994; Sabaté *et al.*, 1998; Fernandez-Espinar *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2002; Torija *et al.*; 2001; 2003; Valero *et al.*, 2005).

Però aquesta tècnica no ha estat aplicada únicament sobre el gènere *Saccharomyces*, sinó que altres llevats d'interès vínic també han estat identificats a nivell de soca amb aquesta tècnica. Ibeas *et al.* (1996) va utilitzar els enzims *AluI* i *HinfI* per a la identificació de soques pertanyents a l'espècie *D. bruxellensis*. Belloch *et al.* (1997) va realitzar la identificació de quatre espècies pertanyents al gènere *Kluyveromyces*; *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus* i *K. thermotolerans*. Guillamón *et al.* (1997) va utilitzar les endonucleases *HaeIII*, *HinfI* i *RsaI*, per tal de caracteritzar i

identificar soques pertanyents al gènere *Zygosaccharomyces*. La tipificació de soques de *Zygosaccharomyces* spp. va ser ampliada per Esteve-Zarzoso *et al.* (2003), que va realitzar la caracterització de 40 soques pertanyents a 10 espècies diferents. Pramateftaki *et al.* (2000) va combinar els enzims *HaeIII* i *HpaII* per diferenciar aïllats de *C. stellata* i els enzims *CfoI* i *HaeIII* per identificar soques de *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii*. Amb els aïllats de *H. uvarum* no va tenir èxit, sempre va obtenir "smears" amb les diferents combinacions d'enzims que va emprar.

2.3.3.RAPD-PCR.

La tècnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) consisteix en l'amplificació a l'atzar de seqüències mitjançant la utilització d'oligonucleòtids curts (d'aproximadament 10 nucleòtids) de seqüència arbitrària. Degut a la baixa temperatura d'hibridació (35-39°C), l'oligonucleòtid s'uneix de manera inespecífica i aleatòria a diferents llocs del genoma permeten l'amplificació de fragments polimòrfics de DNA. Com a resultat, obtindrem per a cada soca un nombre diferent d'amplicons i de diferent tamany i per tant, tindrem un perfil d'amplificació determinat per a cada soca. El gran avantatge d'aquesta tècnica és que no es necessita informació prèvia sobre la seqüència per a poder realitzar el disseny dels cebadors i el principal inconvenient, són els problemes de reproduïbilitat dels perfils d'amplificació com a conseqüència de la falta d'especificitat dels productes d'amplificació. No obstant, la tècnica ha estat utilitzada per a la tipificació de llevats vínics com és el cas de soques de *S. cerevisiae* (Baleiras Couto *et al.*, 1996; Cocolin *et al.*, 2004b), per a la realització d'estudis taxonòmics del grup *Saccharomyces sensu stricto* (Fernández-Espinar *et al.*, 2003) i també per a la caracterització de llevats no-*Saccharomyces*.

S'han caracteritzat i identificat llevats del gènere *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Hansenula* i *Rhodotorula* (Quesada i Cenis, 1995), llevats del gènere *Hanseniaspora* (Bujdosó *et al.*, 2001),

soques pertanyents a l'espècie *H. uvarum* (Capece *et al.*, 2005) i soques pertanyents a *D. bruxellensis* i *P. guilliermondii* (Mitrakul *et al.*, 1999; Martorell *et al.*, 2006).

2.3.4. Microsatèl·lits.

Els microsatèl·lits o SSRs (Simple Sequence Repeats) són repeticions en sèrie de seqüències curtes, entre 1 i 10 pb. Aquestes repeticions en tàndem estan àmpliament distribuïdes al llarg del genoma i són altament variables entre espècies. Aquest elevat polimorfisme fa que els microsatèl·lits siguin bons marcadors moleculars per a la identificació intra i interespecífica. La variabilitat presentada per aquestes seqüències és detectada mitjançant amplificació per PCR utilitzant oligonucleòtids específics com (GACA)₄, (GAC)₅, (GTG)₅, M13 i RM13. El resultat és l'obtenció de perfils d'amplificació que ens permeten discriminar entre diferents soques d'una mateixa espècie. Les avantatges d'aquesta tècnica són l'alta reproduïbilitat i que es necessiten quantitats molt petites de DNA.

Aquesta tècnica s'ha aplicat per a la identificació intraespecífica de *S. cerevisiae* (Hennequin *et al.*, 2001; Howell *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2005) i també d'altres llevats d'interès vínic, els llevats no-*Saccharomyces*. Caruso *et al.* (2002) i Capece *et al.* (2003) van utilitzar els cebadors (GAC)₅ i (GTG)₅ per a la caracterització i identificació de soques aïllades en diferents punts de la fermentació alcohòlica pertanyents a les espècies *K. apiculata*, *C. stellata*, *M. pulcherrima* i *S. pombe*. En canvi, Bujdosó *et al.* (2001) va utilitzar els cebadors M13 i RM13 per a la caracterització intraespecífica de llevats del gènere *Hanseniaspora*.

En la identificació de soques de *S. cerevisiae*, també s'han utilitzat unes altres seqüències anomenades minisatèl·lits. Els minisatèl·lits són repeticions en tàndem de 10 a 100pb i a l'igual que els microsatèl·lits, es troben distribuïts al llarg del genoma (Marinangeli *et al.*, 2004).

2.3.5. Seqüències δ .

Els elements delta són seqüències de 330pb que flanquegen els retrotransposons Ty de llevats (Cameron *et al.*, 1979). Cada cop que el retrotransposó dur a terme un procés de transposició i integració a una nova regió del genoma del llevat, a la zona de l'antiga posició deixa una còpia d'aquests elements delta. Per tant, la seqüència δ és una seqüència distribuïda de manera freqüent al llarg del genoma del llevat. La tècnica es basa en la utilització de cebadors específics a aquests elements delta per amplificar les seqüències compreses entre aquests elements, sempre que la separació entre els elements δ sigui una distància amplificable (aproximadament 2 Kb). Els elements δ no són presents en llevats no-*Saccharomyces* i per tant, aquesta tècnica es limita a *S. cerevisiae* i a espècies molt estretament relacionades (Hawthorne i Philippsen, 1994; Pearson *et al.*, 1995). Ness *et al.* (1993) van desenvolupar uns cebadors específics (δ_1 i δ_2) útils per diferenciar soques de *S. cerevisiae*.

Encara que l'amplificació de seqüències δ és una tècnica útil per a la caracterització intraespecífica de l'espècie *S.cerevisiae*, alguns autors han realitzat estudis comparatius amb altres tècniques on revelen un menor poder de discriminació d'aquesta tècnica. Vezinhet *et al.* (1994) ja va afirmar que la tècnica d'amplificació de seqüències δ presentava una fiabilitat del 80%. Fet que posteriorment van confirmar Egli *et al.* (1998) realitzant un estudi comparatiu entre la tècnica d'amplificació de seqüències δ i l'electroforesi de cromosomes en camp polsant, en el que van veure que un 15% de les soques aïllades no podien ser diferenciades utilitzant les seqüències δ però si amb l'electroforesi de cromosomes. En altres estudis també s'ha constatat que l'anàlisi de restricció del mtDNA és una tècnica molt més resolutive que l'amplificació de seqüències δ (Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002).

2.3.6. AFLP.

La tècnica AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) es basa en l'amplificació selectiva mitjançant PCR dels fragments de restricció resultants de la digestió total de DNA genòmic. La tècnica fou posada a punt per Vos *et al.* (1995) i consta de quatre etapes:

- digestió del DNA amb dos enzims de restricció diferents, un amb tall freqüent (*MseI*) i l'altre amb tall infreqüent (*EcoRI*).
- lligament d'adaptadors de doble cadena amb extrems cohesius que s'uneixen als extrems cohesius complementaris dels fragments de restricció.
- PCR-preselectiva. Amplificació de fragments de DNA utilitzant primers complementaris als adaptadors.
- PCR-selectiva. Els productes de l'anterior amplificació es sotmeten a una nova PCR. Als primers s'afegeixen un o dos nucleòtids per tan sols amplificar un subconjunt de fragments. En aquesta segona PCR un dels primers es marca amb un fluorocrom per a posteriorment poder realitzar la detecció dels fragments amplificats.

Després d'aquests passos ja es pot realitzar la detecció de polimorfismes o bé mitjançant gel de poliacrilamida o a través d'electroforesi capilar utilitzant equips de seqüenciació.

Importants avantatges de la tècnica són l'elevada sensibilitat i reproduïbilitat, es necessita una quantitat petita de DNA i no és necessari conèixer la seqüència del DNA. No obstant, té grans desavantatges com són l'anàlisi complex que implica la utilització d'equips cars i de personal amb molta experiència i la necessitat de partir de DNA d'alta qualitat. És per aquest motiu que la tècnica AFLP no ha estat molt utilitzada en la caracterització i identificació de llevats vínics.

Gallego *et al.* (2005) va realitzar la identificació de soques de *S.cerevisiae* aïllades de fermentacions espontànies, on va demostrar que la tècnica AFLP presenta el mateix grau de resolució que l'anàlisi de microsatèl·lits i un major poder de discriminació que la tècnica RAPD-PCR. Però també constata la complexitat i tediositat dels AFLPs respecte a l'anàlisi de microsatèl·lits. També s'han efectuat treballs de caracterització d'espècies pertanyents al complex *Saccharomyces sensu stricto* (Azumi i Goto-Yamamoto, 2001; Capece *et al.*; 2004). Llevats no-*Saccharomyces* també han estat caracteritzats utilitzant aquesta tècnica. De Barros Lopes *et al.* (1999) va caracteritzar soques del gènere *Saccharomyces* i soques de les espècies *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *T. delbrueckii*, *I. orientalis*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *M. pulcherrima*, *P. fermentans* i *P. membranifaciens*. Posteriorment, altres autors han realitzat treballs d'identificació de soques aïllades de vi pertanyents al gènere *Hanseniaspora* (Flores Berrios *et al.*, 2005) i a l'espècie *D. bruxellensis* (Curtin *et al.*, 2007).

2.3.7. PCR-ISS (PCR-Intron Splice Sites).

Els introns contenen seqüències altament conservades (necessàries per al seu processat i així obtenir RNA missatge funcional) i seqüències amb un alt grau de variabilitat entre diferents espècies (Figura 3). Encara que el número d'introns en els llevats no és molt elevat, aquestes regions conservades dels introns es troben disperses pel genoma del llevat amb bastant freqüència.

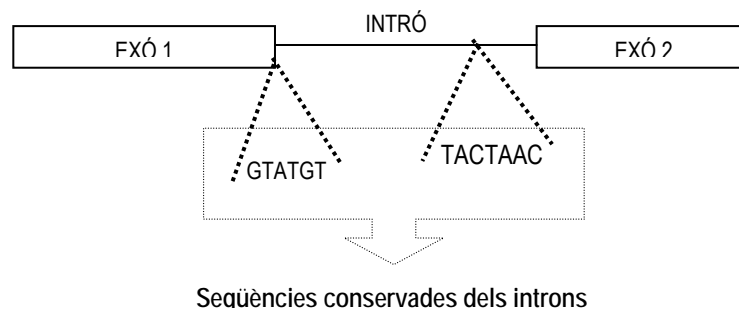


Figura 3. Seqüències conservades del introns que s'utilitzen per al disseny dels primers.

La tècnica consisteix en amplificar mitjançant PCR les zones compreses entre introns utilitzant un sol primer o bé un parell quan el grau de discriminació no és prou satisfactori. Aquests primers presenten a l'extrem 3' la seqüència conservada dels introns (6 o 7 nucleòtids) i s'extenen cap a l'extrem 5' amb una seqüència a l'atzar, fins un tamany de 16 oligonucleòtids. El resultat és l'obtenció d'uns patrons d'amplificació específics per cada espècie. La PCR-ISS ens permet la caracterització i identificació d'espècies de llevats i en alguns casos inclús podem identificar a nivell de soca. De Barros Lopes *et al.* (1996) va desenvolupar la tècnica PCR-ISS i va utilitzar-la per detectar polimorfismes en soques de llevats comercials pertanyents a l'espècie *S.cerevisiae*. Posteriorment, de Barros Lopes *et al.* (1998) va caracteritzar i identificar espècies pertanyents al complex *Saccharomyces sensu stricto* i llevats no-*Saccharomyces* de les espècies *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *T. delbrueckii*, *I. orientalis*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *M. pulcherrima*, *P. fermentans* i *P. membranifaciens*. No obstant la simplicitat, fiabilitat i reproduïbilitat de la tècnica, aquesta no ha estat aplicada posteriorment per altres autors.

2.3.8. ERIC-PCR i REP-PCR.

Tant els elements anomenats ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) com els elements anomenats REP (Repetitive Extragenic Palindromic) són seqüències repetitives descrites en bacteris (Stern *et al.*, 1984; Sharples i Lloyd, 1990; Hulton *et al.*, 1991). Estudis amb eubacteris han demostrat que aquestes seqüències estan àmpliament distribuïdes al llarg del genoma i que la freqüència d'aquestes repeticions són específiques per a cada espècie de bacteris i també per a cada soca d'una mateixa espècie (Versalovic *et al.*, 1991). Per tant, l'amplificació mitjançant PCR de les seqüències compreses entre aquests elements repetitius ens permetrà la caracterització tant d'espècies com de soques.

Aquests elements han estat utilitzats amb èxit per a la caracterització i identificació de diferents espècies de bacteris, també d'aquells relacionats amb el vi com són les bacteries acètiques.

González *et al.* (2004) va demostrar la utilitat de les tècniques ERIC-PCR i REP-PCR per a la identificació a nivell de soca de bacteries acètiques aïllades de vi. Posteriorment, González *et al.* (2005) va aplicar ambdós tècniques per estudiar la diversitat poblacional de les bacteries acètiques sobre la superfície del raïm i analitzar l'efecte de la inoculació de llevat i l'addició de SO₂ sobre la població d'acètiques durant la fermentació alcohòlica.

2.4. Mètodes de quantificació.

Existeixen diferents mètodes per detectar i quantificar llevats implicats en el procés de vinificació. Tradicionalment, el mètode més emprat és el recompte en placa el qual es basa en el recompte de colònies formades pel creixement del llevat en un medi de cultiu. Però aquest fet pot ser un factor limitant, ja que alguns microorganismes no responen al medi de cultiu degut a la falta de nutrients específics o bé tenen un creixement lent o es troben en estat viable però no cultivable (VBNC). A més, el recompte en placa, encara que és una tècnica senzilla, consumeix molt de temps (un mínim de 48 hores). Per aquests motius, s'han desenvolupat altres tècniques de quantificació sense la necessitat de realitzar cultiu en placa i amb el menor temps possible.

A continuació es descriuen alguns dels mètodes utilitzats en la indústria enològica per enumerar llevats.

2.4.1. Recompte en placa.

La població de llevats viables pot determinar-se mitjançant el recompte de les colònies formades sobre un medi de cultiu determinat després d'haver transcorregut un temps d'incubació. Aquest mètode és el majoritàriament utilitzat en la indústria enològica i múltiples treballs han avaluat diferents medis de cultiu per a l'enumeració de llevats (Davenport, 1980; Taylor i Marsh, 1984; Beuchat, 1992). Però aquests medis presenten l'inconvenient de què no són selectius i permeten el creixement de totes les espècies de llevats associades al procés de vinificació. Per solucionar

aquest problema, s'han desenvolupat medis de cultiu selectius i diferencials que permeten quantificar la població de determinades espècies de llevats. El medi agar-lisina és utilitzat de manera genèrica per aïllar llevats no-*Saccharomyces*, ja que *Saccharomyces* spp. no és capaç d'utilitzar la lisina com a única font de nitrogen i per tant no pot créixer en aquest medi (Heard i Fleet, 1986). Recentment, s'han desenvolupats altres medis més específics. Schuller *et al.*, (2000) realitzà diferents assaigs on variava la concentració de les fonts de carboni, glucosa i àcid fòrmic, fins obtenir aquelles condicions on l'espècie *Z. bailii* creixia selectivament en el medi. Però la majoria d'esforços s'han centrat en desenvolupar un medi de creixement selectiu per a l'espècie *D. bruxellensis*. Rodrigues *et al.* (2001) va dissenyar el medi DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* Diferencial Media) utilitzant etanol al 6% com a única font de carboni, àcid p-cumàric (precursor de 4-etilfenol) i ciclohexamida (10mg/l) per evitar el creixement de *Saccharomyces*. En canvi, Couto *et al.* (2005) utilitza la glucosa com a font de carboni i afegeix al medi els antibiòtics ciclohexamida i cloramfenicol, tots dos a una concentració de 20 mg/l. D'altra banda, Renouf *et al.* (2006b) volia confirmar la presència de *D. bruxellensis* sobre la superfície del raïm i per això va desenvolupar un medi específic (EEB medium) per detectar aquesta espècie, encara que són necessaris 10 dies d'incubació per a la detecció.

2.4.2. Epifluorescència.

Aquesta tècnica consisteix en el recompte de cèl·lules a un microscopi de fluorescència després de què aquestes hagin estat tenyides amb un colorant fluorescent. Prèviament a la tinció, la mostra requereix uns pre-tractaments per a posteriorment filtrar-se i finalment tenyir-se amb el fluorocrom. El fluorocrom majoritàriament utilitzat és el taronja d'acridina. Aquest colorant s'uneix als àcids nucleics i, teòricament, permet distingir cèl·lules viables de no viables. Això s'aconsegueix perquè el color de llum emesa és diferent quan s'uneix a àcids nucleics de doble cadena (color taronja), de quan s'uneix a cadena simple (color verd). Les cèl·lules metabòlicament actives presenten una proporció d'ARN molt superior al ADN cel·lular, per tant

en les cèl·lules vives predominarà el color verd i en les mortes o no viables, com el RNA es degrada ràpidament mentre que el ADN és més estable, predominarà el color taronja.

L'epifluorescència ha estat utilitzada per a enumerar llevats vínics descrivint-se com una tècnica ràpida i sensible (Cootes i Johnson, 1980; Froudière *et al.*, 1990). No obstant, Rodrigues i Kroll (1986) afirmen que la utilització d'un únic fluorocrom, el taronja d'acridina, no permet distingir les cèl·lules mortes per tractament tèrmic (la tècnica requereix llargues preincubacions de les mostres) de la resta de cèl·lules mortes. Per solucionar aquest problema proposen la utilització combinada de dos fluorocroms, el Janus Green B i el taronja d'acridina. Millet i Lonvaud-Funel (2000) opten per utilitzar com a fluorocrom el Fluorassure® (Chemunex) per a la quantificació de *D.bruxellensis* en vi. Aquest substrat no presenta fluorescència fins que no és hidrolitzat en el citoplasma de cèl·lules viables.

2.4.3. Citometria de flux.

Aquesta tècnica ens permet quantificar de manera ràpida i exacta el nombre de llevats viables d'una mostra. La citometria de flux es basa en la dispersió de la llum per part de les cèl·lules i la utilització de fluorocroms per poder discriminar entre llevats vius i morts. Les cèl·lules vives tenen la membrana intacta i per tant són impermeables a fluorocroms com el iodur de propidi, en canvi fluorocroms com el taronja de tiazol són permeables a totes les cèl·lules, vives o mortes. Per tant, la utilització d'aquests dos tipus de fluorocroms ens proporciona un mètode per determinar viables.

La citometria de flux ha estat aplicada a la indústria enològica obtenint uns resultats altament reproduïbles i amb una excel·lent correlació respecte als obtinguts per mètodes tradicionals, com el recompte en placa (Breeuwer *et al.*, 1994; Bruetschy *et al.*, 1994). Recentment, Malacrino *et al.* (2001) ha utilitzat aquesta tècnica per quantificar llevats viables en vi arribant a uns límits de

detecció de 10^3 cèl·lules/ml i Farthing *et al.* (2007) ha realitzat, mitjançant la citometria de flux, el seguiment poblacional al llarg de la fermentació de diferents soques comercials de *S.cerevisiae* inoculades en mostos amb un elevat contingut en sucres.

2.4.4. Anàlisi d'impedància.

La detecció quantitativa de microorganismes mitjançant el sistema d'impedància elèctrica es realitza per la mesura de l'activitat metabòlica d'aquests d'una manera indirecta. L'anàlisi de la impedància es fonamenta en la modificació de la conductivitat del medi de cultiu. Aquesta modificació es deu a què les molècules del medi de cultiu (proteïnes, hidrats de carboni...) són elèctricament neutres o estan dèbilment ionitzades però es transformen per acció dels microorganismes en molècules més petites, de càrrega i mobilitat elèctrica més elevada (aminoàcids, àcids orgànics, àcids grassos...). En conseqüència, aquests metabolits augmenten la conductància i disminueixen la impedància del medi. Totes aquestes modificacions són mesurables mitjançant uns elèctrodes submergits en el medi de cultiu als quals se'ls aplica un voltatge elèctric. Per tant, l'anàlisi per impedància es descriu com un mètode ràpid i fiable per a la quantificació de microorganismes viables (Cady *et al.*, 1978; Futschik *et al.*, 1988).

La impedància elèctrica es pot mesurar de manera directa o indirecta. En la detecció i quantificació de llevats la mesura indirecta és la més adequada. En aquest tipus de mesura els elèctrodes estan submergits en una solució de KOH, la qual es troba comunicada amb el recipient que conté el cultiu de creixement. El CO₂ produït pel metabolisme del llevat és absorbit per aquest KOH formant-se carbonat potàssic, el qual produirà una disminució de la impedància que serà proporcional al tamany de la població. S'han realitzat diversos estudis on s'ha utilitzat l'anàlisi d'impedància per detectar i quantificar llevats en aliments (Connelly *et al.*, 1988; Deák i Beuchat, 1993; 1994) i també en vi. Henschke i Thomas (1988) va determinar la població de llevats directament de mostres de vi, va analitzar vins contaminats i vins no contaminats.

Martínez *et al.* (2004) va realitzar mesures de població en vins embotellats obtenint coeficients de correlació de 0,99 comparats amb mètodes tradicionals i podent confirmar l'absència de llevats en menys de 21 hores. No obstant la rapidesa i senzillesa de la tècnica, aquesta no permet distingir diferents microorganismes en una mateixa mostra.

2.4.5. PCR a temps real o QPCR.

La PCR a temps real o PCR quantitativa (QPCR) es basa en detectar la senyal emesa per un donador fluorescent quan es genera el producte d'amplificació durant la reacció de PCR. Aquesta senyal fluorescent augmenta en proporció directa a la quantitat de producte de la reacció. Per a realitzar la reacció de PCR es pot utilitzar com a molècula motlle DNA o RNA (prèvia reacció de retrotranscripció). La utilització del RNA com a molècula motlle te l'avantatge que permet una millor quantificació de les cèl·lules viables.

La fluorescència es pot donar a través de:

(a) Agents intercalants.

Són molècules fluorescents que s'intercalen en la doble cadena de DNA. La més utilitzada és el SYBR Green I (Figura 4). Aquestes molècules tan sols emeten senyal fluorescent quan estan unides a una doble cadena de DNA.

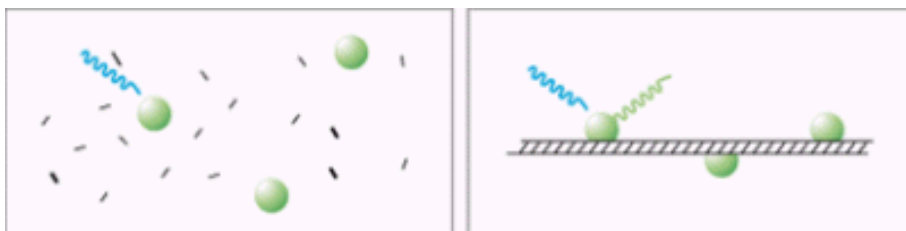


Figura 4. Molècula fluorescent intercalant de doble cadena, SYBR Green I.

L'inconvenient d'aquests fluorocroms es que s'uniran a totes les dobles cadenes de DNA i per tant també es mesurarà la fluorescència procedent de productes d'amplificació inespecífics.

(b) Sondes d'hibridació.

Les més utilitzades són les sondes TaqMan (Figura 5). Aquestes sondes tenen un marcador fluorescent a l'extrem 5' i una molècula (anomenada "quencher") que absorbeix la fluorescència que emet el marcador fluorescent de l'altre extrem. Mentre aquestes dues molècules estan unides no es detecta fluorescència.

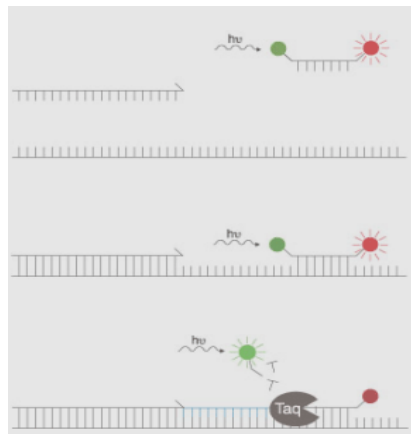


Figura 5. Esquema del funcionament de les sondes d'hibridacióTaqman.

La sonda s'uneix a una seqüència específica del fragment que volem amplificar i a mesura que es sintetitza la cadena complementària, la sonda es va degradant per acció exonucleasa de la Taq polimerasa alliberant-se el marcador que a l'està lliure, sí emetrà fluorescència.

Una alternativa a les tradicionals sondes TaqMan són les anomenades sondes TaqMan® MGB (Minor Groove Binder) (Applied Biosystems). Aquestes sondes també estan marcades amb un fluorocrom a l'extrem 5' i una molècula "quencher" a l'extrem 3', però són més molt més curtes que les tradicionals (12-15 nucleòtids) i s'uneixen al solc petit del DNA. Aquest fet dona major

estabilitat en la hibridació de la sonda i permet discriminar seqüències amb tan sols un nucleòtid de diferència.

Els resultats de la PCR quantitativa es visualitzen mitjançant la integració de la senyal fluorescent i es reflexen en una corba d'amplificació (Figura 6).

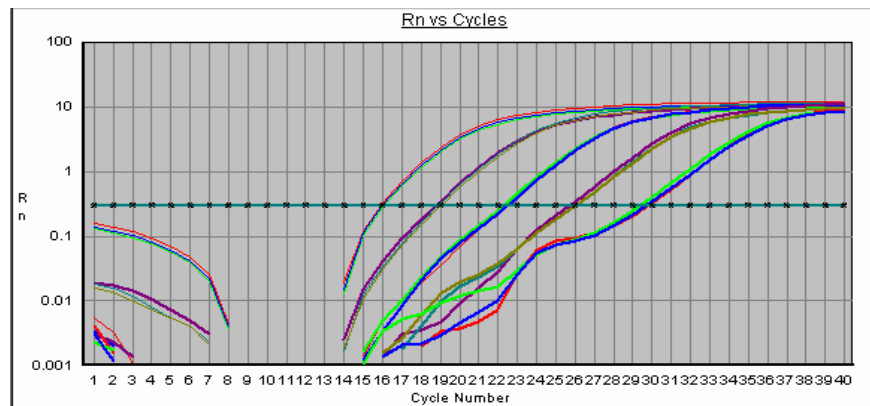


Figura 6. Corba d'amplificació com a resultat d'una PCR-quantitativa a temps real.

S'estableix una senyal llindar, per sobre de la qual es considera una lectura positiva. El cicle llindar (C_T) serà el cicle en què es detecta per primera vegada una senyal de fluorescència superior a la de la senyal llindar. Aquest cicle C_T és inversament proporcional a la quantitat inicial de DNA motlle. I degut a què es produeix un increment de la fluorescència mesurable i proporcional al nombre de còpies de la seqüència de DNA de partida, com a resultat podem obtenir una recta de calibrat que permet la quantificació del nombre de cèl·lules presents en una mostra.

La PCR a temps real s'ha convertit en una eina molt útil per a la detecció i enumeració de microorganismes degut a la seva gran especificitat, rapidesa i sensibilitat. S'ha utilitzat de

manera molt extensa per a quantificar espècies patògens en mostres clíniques (Lyons *et al.*, 2000; Brinkman *et al.*, 2003; Bu *et al.*, 2005; Trama *et al.*, 2005), però també per a la detecció de microorganismes alterants d'aliments (Bleve *et al.*, 2003; Casey i Dobson, 2004) i microorganismes relacionats amb el vi. Per tal d'establir un major control de la població de bacteris que podrien ser perjudicials per al vi durant la fermentació alcohòlica i després de l'embotellat, diversos autors han desenvolupat la QPCR per detectar directament del vi bacteris acètiques (González *et al.*, 2006) i làctiques (Pinzani *et al.*, 2004; Neeley *et al.*, 2005). En aquest últim cas, també per poder avaluar de manera més ràpida la fermentació malolàctica i aplicar mesures correctives quan siguin necessàries. Però, la PCR a temps real, també ha estat aplicada per a la detecció i quantificació de llevats vínics. Martorell *et al.* (2005) va dissenyar uns primers específics per a la detecció de *S.cerevisiae* a partir d'un fragment d'un producte de RAPD que li permetia detectar fins a 5 UFC/ml directament de la mostra de vi. Altres autors, han desenvolupat aquesta tècnica per poder detectar llevats alterants com *D.bruxellensis* i *Z. bailii*. Phister i Mills (2003) i Delaherche *et al.* (2004) van dissenyar uns primers a partir del domini D1/D2 del gen 26S rRNA i a partir del gen *rad4*, respectivament, per tal de quantificar de manera específica l'espècie *D.bruxellensis*. En tots dos estudis es van obtenir excel·lents correlacions respecte als resultats obtinguts per cultiu en placa. No obstant, mentre que Phister i Mills van aconseguir un límit de detecció significativament baix (1 UFC/ml), Delaherche tan sols era capaç de detectar en vi poblacions de 10^4 UFC/ml. Rawsthornen i Phister (2006) han desenvolupat amb èxit la tècnica QPCR per a la detecció de l'espècie *Z. bailii*. Va dissenyar els primers a partir del domini D1/D2 del gen ribosomal 26S rRNA, aconseguint un límit de detecció en vi de 6 UFC/ml.

3. DIVERSITAT MICROBIOLÒGICA EN LA FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA.

3.1. Fermentació alcohòlica espontània.

En una fermentació espontània, es produeix un patró de creixement seqüencial dels diferents llevats indígenes existents en la superfície del raïm i en la bodega. Els llevats no-*Saccharomyces* són els més abundants a l'inici del procés degut a la seva presència majoritària en la superfície del raïm (la població oscil·la entre 10^4 - 10^6 UFC/g) (Fleet i Heard, 1993), on els llevats *Saccharomyces* són pràcticament absents amb una població d'entre 10 a 100 UFC/g (Parish i Carroll, 1985; Martini *et al.*, 1996; Pretorius, 2000). Per tant, en els primers dies de fermentació, els gèneres *Hanseniaspora* i *Candida* són els predominants. També poden aparèixer altres espècies més minoritàries com *Metschnikowia* i *Pichia* i ocasionalment *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* i *Zygosaccharomyces*. Però una vegada comença la fermentació tumultuosa serà *S. cerevisiae* qui predominarà degut a la seva alta tolerància a l'etanol i la seva gran capacitat fermentativa (Fugelsang, 1997; Fleet, 1998; Pretorius *et al.*, 1999). Altres motius de la desaparició d'espècies no-*Saccharomyces* al final de la fermentació poden ser el SO₂ utilitzat com antimicrobià, la menor tolerància d'aquestes espècies a concentracions baixes d'oxigen respecte a *S. cerevisiae* (Hansen *et al.*, 2001) o la menor resistència a determinats antimicrobians produïts per *Saccharomyces*, com són les toxines killer. Soques *S. cerevisiae* amb el fenotip killer han estat aïllades durant el procés de vinificació i sovint predominen al final de la fermentació (Musmanno *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2001). Però cal esmentar que soques de *Candida*, *Pichia* i *Hanseniaspora* amb fenotip killer també han estat aïllades de vi i algunes d'elles poden exercir activitat killer contra soques de *S. cerevisiae* (Fleet i Heard, 1993). Recentment, Pérez-Nevado *et al.* (2006) han demostrat que aquesta discriminació de les poblacions de no-*Saccharomyces* és independent de la tolerància a l'etanol o al SO₂ o a la concentració de nutrients. Ells mostren que la mort de soques de *Hanseniaspora* durant fermentacions mixtes amb *S. cerevisiae* sempre comença quan la població de *Saccharomyces*

arriba a una densitat de 10^7 UFC/ml, independentment de la concentració d'etanol. Per contra, cultius purs de *Hanseniaspora* mantenen cèl·lules viables en torn a 10^7 - 10^8 UFC/ml, inclús amb concentracions d'etanol superiors als 70 g/l.

Encara que *S. cerevisiae* s'acaba imposant en la fermentació alcohòlica, si durant la fermentació s'assoleixen poblacions elevades de llevats no-*Saccharomyces* (per sobre de 10^6 - 10^7 UFC/ml), aquests influiran en la cinètica de creixement i en el metabolisme de *Saccharomyces* i en conseqüència en la composició del vi (Lema *et al.*, 1996). A més, en alguns estudis ecològics s'ha detectat la presència de llevats no-*Saccharomyces* en estadis avançats de la fermentació alcohòlica (Ciani i Picciotti, 1995; Torija *et al.*, 2001).

Una fermentació espontània permet aconseguir vins que reflecteixen la biodiversitat d'una regió específica, ja que l'acció combinada dels llevats no-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* proporciona al vi un seguit de característiques organolèptiques lligades als diferents llevats que han participat en l'elaboració del vi. En contra, tenim un producte altament variable d'un any per l'altre ja que la diversitat, composició i evolució de la flora depèn de diversos factors: condicions climàtiques (Parrish i Carrol, 1985; Longo *et al.*, 1991), localització geogràfica (Versavaud *et al.*, 1995; van der Westhuizen *et al.*, 2000; Torija *et al.*, 2001), any de la vinya i la varietat (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982; Beltran *et al.*, 2002), addició de sulfurós (Constantí *et al.*, 1998), temperatura de fermentació (Sharf i Margalith, 1983; Heard i Fleet, 1988; Torija *et al.*, 2003)...

3.2. Fermentació alcohòlica inoculada.

Per evitar problemes durant la vinificació, com parades de fermentació o fermentacions lentes, s'opta per inocular llevat sec actiu (LSA). D'aquesta manera es controla millor la fermentació i es produeixen vins amb una qualitat organolèptica repetible d'un any per l'altre (Bauer i Pretorius, 2000; Fleet i Heard, 1993; Giudici i Zambonelli, 1992). En aquest tipus de fermentacions dirigides

és interessant poder determinar durant les diferents fases de la vinificació si la soca de llevat inoculada s'imposa a la microflora autòctona. Una de les tècniques més ràpides i fiables per a diferenciar soques de *S. cerevisiae* és l'anàlisi de restricció del mtDNA (Querol *et al.*, 1990, 1992b). Aquesta tècnica s'ha aplicat en nombrosos estudis ecològics de fermentacions inoculades (Gutiérrez *et al.*, 1997; Constantí *et al.*, 1998). També s'ha estudiat l'efecte que pot tenir l'addició d'un inòcul comercial de *S. cerevisiae* sobre la població autòctona de llevats no-Saccharomyces (Constantí *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002; Ganga i Martínez, 2004).

En alguns casos s'ha considerat que l'ús de llevats comercials comporta una pèrdua d'identitat en els vins, ja que es produeix una uniformitat de les característiques secundàries aportades al vi. Per aquest motiu, s'han realitzat estudis per seleccionar llevats autòctons (Torija *et al.*, 2001, 2003) i utilitzar-los com a inòcul per poder així mantenir la tipicitat.

3.3 Estudis ecològics.

Estudis realitzats sobre la microbiota de la superfície del raïm conclouen que l'espècie majoritària (entre el 50-75% de la població total) és *H. uvarum* (Martini i Vaughan-Martini, 1990; Pretorius, 2000; Sabaté *et al.*, 2002). Tot i així, els llevats associats a la superfície del raïm depenen en gran mesura de la varietat de raïm però també s'han de considerar els factors climàtics, el sòl, l'aplicació de fungicides... (Pretorius, 2000) i també s'ha de tenir en compte el grau de maduresa del raïm (Rosini *et al.*, 1982). En el most i durant els primers dies de fermentació, en la majoria d'estudis ecològics es troba que el llevat predominant és també *H. uvarum* (Querol *et al.*, 1990; Sabaté *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2005). Aquest llevat perd dominància a favor de *C. stellata*, teòricament més resistent a l'etanol (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). Però en altres estudis s'ha vist el contrari, és *C. stellata* l'espècie predominant en el most i en els primers dies de fermentació i en dies posteriors *H. uvarum* comença a guanyar protagonisme (Constantí *et al.*, 1998; Granchi *et al.*, 1999; Torija *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002). Altres espècies no-

Saccharomyces més minoritàries han estat també aïllades durant la fermentació alcohòlica i en altres processos de la vinificació (veure Taula 6).

Taula 6. Principals espècies no-*Saccharomyces* aïllades en diferents punts del procés de vinificació.

Aïllament	Llevat no- <i>Saccharomyces</i>	Referències
Superfície del raïm	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Alguacil <i>et al.</i> , 1998
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Martini i Vaughan-Martini, 1990; Pretorius, 2000; Sabaté <i>et al.</i> , 2002
	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Parish i Carroll, 1985
	<i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Combina <i>et al.</i> , 2005
Most i primers dies de fermentació	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (com a llevat predominant)	Querol <i>et al.</i> , 1990; Romano <i>et al.</i> , 1997b; Raspor <i>et al.</i> , 2002; Sabaté <i>et al.</i> , 2002; Combina <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Candida stellata</i> (com a llevat predominant)	Constanti <i>et al.</i> , 1998; Granchi <i>et al.</i> , 1999; Torija <i>et al.</i> , 2001; Beltran <i>et al.</i> , 2002
	<i>Candida colliculosa</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Torija <i>et al.</i> , 2001
	<i>Candida sorbosa</i> <i>Debaromyces hansenii</i> <i>Zygoascus hellenicus</i>	Beltran <i>et al.</i> , 2002
	<i>Candida valida</i>	Romano <i>et al.</i> , 1997b
	<i>Dekkera bruxellensis</i> <i>Dekkera intermedia</i> <i>Rhodotorula aurantica</i>	Mateo <i>et al.</i> , 1991
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 2001a

	<i>Issatchenkia terricola</i>	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 2001a; Beltran <i>et al.</i> , 2002
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Torija <i>et al.</i> , 2001; Beltran <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pichia anomala</i>	Rojas <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pichia kluyveri</i>	Raspor <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pichia membranifaciens</i>	
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Ciani i Maccarelli, 1998
Meitat fermentació	<i>Candida stellata</i>	Clemente-Jiménez <i>et al.</i> , 2004
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Constantí <i>et al.</i> , 1998; Raspor <i>et al.</i> , 2002
	<i>Issatchenkia terricola</i>	Clemente-Jiménez <i>et al.</i> , 2004
	<i>Schizosaccharomyces</i> spp.	Torija <i>et al.</i> , 2001
Final fermentació	<i>Candida stellata</i>	Torija <i>et al.</i> , 2001; Mills <i>et al.</i> , 2002; Clemente-Jiménez <i>et al.</i> , 2004
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Clemente-Jiménez <i>et al.</i> , 2004
	<i>Issatchenkia terricola</i>	
	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Mora <i>et al.</i> , 1990a; Mills <i>et al.</i> , 2002
	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	Romano <i>et al.</i> , 1997b
Envelliment	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Chatonnet <i>et al.</i> , 1992; 1993; Ibeas <i>et al.</i> , 1996
Vi acabat (ampolla)	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2001
	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Malfeito-Ferreira <i>et al.</i> , 1989; Thomas, 1993
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Kunkee i Bisson, 1993; Boulton <i>et al.</i> , 1996
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Malfeito-Ferreira <i>et al.</i> , 1989; Fugelsang, 1996; 1998

Encara que la dinàmica poblacional d'una fermentació alcohòlica segueix més o menys sempre un mateix patró, s'ha de tenir en compte que hi ha factors que poden alterar aquesta dinàmica poblacional. Un d'aquests és la temperatura. S'han realitzat estudis en què s'ha observat com *H. uvarum* o *C. stellata* poden mantenir poblacions elevades (10^7 - 10^8 UFC/ml) en fermentacions a baixes temperatures, convertint-se en l'espècie dominant en detriment de *S. cerevisiae*. Aquest fet pot ser degut a què a baixes temperatures aquestes espècies augmenten la seva tolerància a

l'etanol (Sharf i Margalith, 1983; Gao i Fleet, 1988; Heard i Fleet, 1988; Erten, 2002). També existeixen estudis on es descriu que determinades soques de *Candida* tenen una tolerància a l'etanol similar a la que posseeix *S. cerevisiae* (Cocolin *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2002). En canvi, en altres estudis ecològics (Torija *et al.*, 2001), s'ha detectat la presència de *Schizosaccharomyces* en estadis avançats de la fermentació alcohòlica quan aquesta es realitzava a altes temperatures (absència de control de temperatura). *Schizosaccharomyces* posseeix una alta capacitat fermentativa a altes temperatures i a més és resistent a SO₂ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1976), característiques que poden esdevenir un problema durant la vinificació.

Com hem vist, la microbiota existent durant la vinificació pot ser força variable. Temperatura de fermentació, inoculació de llevats, addició de SO₂, condicions climàtiques... són factors que condicionaran la presència o absència de determinats llevats i això farà que es puguin modificar, ja sigui positiva o negativament, les característiques organolèptiques del vi. Els estudis ecològics són els que ens permeten determinar si les condicions ambientals o determinades pràctiques enològiques tenen realment una influència sobre la dinàmica poblacional durant la fermentació i en conseqüència sobre la qualitat final del vi.

3.4. Fermentacions mixtes.

Cada cop es dona més importància a la implicació dels llevats en les característiques organolèptiques del vi. La utilització de *S. cerevisiae* com a únic inòcul és un fet generalitzat en les bodegues per tal de controlar la vinificació i també aportar al vi uns caràcters aromàtics i gustatius determinats. Però s'ha de plantejar la possibilitat de combinar una major complexitat aromàtica (aconseguida en fermentacions espontànies) a la vegada que un control sobre la fermentació (aconseguit amb les fermentacions inoculades). La utilització de inòculs mixtes, *Saccharomyces* /no-*Saccharomyces*, podria afavorir la complexitat aromàtica del vi a l'igual que

la gustativa, amb la producció de compostos com glicerol, alcohols superiors, esters... Però s'ha de tenir en compte que no tots els llevats no-*Saccharomyces* són vàlids per a la realització d'aquest tipus de fermentació, per això s'han realitzat nombrosos estudis sobre fermentacions mixtes aplicant diferents mescles de llevats, ja sigui simultàniament (Moreno *et al.*, 1991; Gil *et al.*, 1996; Erten, 2002) o bé de manera seqüencial (Herraiz *et al.*, 1990; Zironi *et al.*, 1993; Clemente-Jimenez *et al.*, 2005).

Un dels llevats més proposats per a utilitzar com a "starter" en combinació amb *S.cerevisiae* és *C.stellata*, degut a què presenta una alta tolerància a concentracions elevades d'etanol (de fins a 12%) i es produeix una utilització més completa dels sucres (evitant així parades de fermentació), ja que *C.stellata* mostra preferència per la utilització de fructosa. Els beneficis que comporta l'ús d'aquest llevat és un augment en el contingut de glicerol i una major complexitat aromàtica al sintetitzar-se més quantitat de compostos volàtils (Ciani i Ferraro, 1998; Soden *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003; Ciani i Comitini, 2006). En canvi, Toro i Vázquez (2002) van centrar el seu estudi en cultius mixtes amb l'espècie *C. cantarellii*. L'efecte d'aquesta espècie recau en les quantitats d'acetoïna, propanol i àcid succínic sintetitzat, a més de presentar una concentració d'etanol i glicerol superiors.

Altres llevats que també s'han estudiat força en fermentacions mixtes són els llevats apiculats. Gil *et al.* (1996) ja apuntava la importància dels llevats apiculats en la composició química i qualitativa del vi al detectar un augment en la concentració d'alcohols i àcids en el vi resultant de fermentacions mixtes en contrast amb vins produïts amb cultius purs. No obstant, s'ha de tenir en compte que molts llevats apiculats es caracteritzen per sintetitzar metabolits secundaris en excés, tal com acetat d'etil, acetoïna i àcid acètic; produint així un efecte negatiu en el vi. En canvi altres llevats apiculats són bons productors d'aquests compostos aportant una millora organolèptica al vi (Ciani i Maccarelli, 1998; Ciani *et al.*, 2006). Determinades soques de

H.uvarum produeixen considerables quantitats de metabolits secundaris i per tant s'ha suggerit la utilització d'aquests llevats per augmentar el perfil aromàtic del vi (Romano *et al.*, 1996; 1997a). Altres estudis (Rojas *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2005) mostren que determinades soques de *H.guilliermondii* contribueixen a augmentar la síntesi d'acetat 2-feniletíl i de 2-feniletanol sense que afecti significativament en la producció d'acetaldehid, àcid acètic, glicerol i alcohols superiors.

Podem també destacar força estudis realitzats amb *Torulaspota delbrueckii* i *Kluyveromyces thermotolerans* (Mora *et al.*, 1990b; Moreno *et al.*, 1991; Ciani i Picciotti, 1995). *T.delbrueckii* produeix aromes tipus fruits vermells com la maduixa o la frambuesa i també contribueix a la reducció de l'acidesa volàtil. *K.thermotolerans* té capacitat (encara que limitada) per degradar l'àcid màlic. No obstant, aquests llevats presenten una sèrie de limitacions; són poc tolerants a la baixa disponibilitat d'oxigen (Hansen *et al.*, 2001) i detenen el seu creixement en presència de *S.cerevisiae* a elevades concentracions suggerint l'existència d'un mecanisme d'interacció cèl·lula-cèl·lula que atura el creixement d'espècies competidores (Nissen *et al.*, 2003). També Pérez-Nevado *et al.* (2006) va observar que determinades soques de *H. uvarum* i *H. guilliermondii* es morien durant els primers dies de les fermentacions mixtes amb *S. cerevisiae*. Aquest fenomen es produïa independentment de la concentració d'etanol existent. Per tant, van arribar a la conclusió que *S. cerevisiae* sintetitzava algun compost tòxic que afectava a la viabilitat d'altres espècies. No obstant, no van poder determinar la natura d'aquestes toxines.

Per incrementar la presència de compostos aromàtics en el vi, també es podria utilitzar *Pichia fermentans*, ja que s'ha comprovat que aquest llevat produeix grans quantitats de 2,3-butanediol, acetaldehid, acetat d'etil, 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol, caprilat d'etil i glicerol (Clemente-Jimenez *et al.*, 2005).

En contrapartida hi ha estudis en què es descarten determinades espècies per a utilitzar-les en fermentacions mixtes. És el cas de *I.terricola*, que mostra un baix poder fermentatiu i a més, presenta una producció en excés d'acetat d'etil provocant així aromes a pegament (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004).

4. BIBLIOGRAFIA

- Aigle, M., Erbs, D. and Moll, M. (1984). Some molecular structures in the genome of larger brewing yeast. *Am. Soc. Brew. Chem.* 42, 1-7.
- Alguacil, M., Fidalgo, M., Jiménez, J., Lozano, J.I., Neva, M.A. and Perdignes, F. (1998). Detecció de *Brettanomyces/Dekkera* en instal·lacions de vendimia mitjançant PCR. *Aliment., Equipos Tecnol.* 10, 81-85.
- Amerine, M. and Roessler, E.B. (1983). *Wines. Their sensory evaluation.* Freeman: New York.
- Antunovics, Z., Irinyi, L. and Sipiczki, M. (2005). Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J. Appl. Microbiol.* 98, 971-979.
- Azumi, M. and Goto-Yamamoto, N. (2001). AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast.* 18, 1145-1154.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.H. and van der Vossen J.M.B.M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 41-46.
- Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 49-56.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification.* 3rd edn Cambridge University Press.
- Bauer, F. F. and Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27-51.
- Bell, T.A. and Etchells, J.L. (1956). Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeasts. *Appl. Microbiol.* 4, 196-202.

- Belloch, C. Barrio, E., Uruburu, F., Garcia, M.D. and Querol, A. (1997). Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 397-408.
- Belloch, C. Barrio, E., Garcia, M.D. and Querol, A. (1998). Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast.* 14, 1341-1354.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.
- Beuchat, L.R. (1992). Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 145-158.
- Blasco, L., Ferrer, S. and Pardo, I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 115-123.
- Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. (2003) Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4116-4122.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. and Kunkee, R.E. (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.
- Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman, and S. J. Vesper. (2003) Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1775-1782.
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Rombouts, F.M and Abee, T. (1994). Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1467-1472.

- Bruetschy, A., Laurent, M. and Jacquet, R. (1994). Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 343-345.
- Bujdosó, G., Egli, C.M. and Henick-Kling, T. (2001). Differentiation of natural wine strains of *Hanseniaspora (Kloeckera)* by physiological and molecular methods. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 19-28.
- Bu, R., Sathiapalan, R.K., Ibrahim, M.M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M.I. and Bhatia, K. (2005). Monochrome LigthCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.* 54, 243-248.
- Cady, P., Dufour, S.W., Shaw, J. and Kraeger, S.J. (1978). Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 7, 265-272.
- Cai, J., Roberts, I.N. and Collins, M.D. (1996). Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 542-549.
- Cameron, J.R., Loh, E.Y. and Davis, R.W. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell.* 16, 739-751.
- Capece, A., Salzano, G. and Romano, P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 33-39.
- Capece, A., Sciancalepore, A., Sunseri, F. and Romano, P. (2004). Molecular tools for assessing genetic diversity in *Saccharomyces cerevisiae* and in the grapevine cultivar aglianico del vulture typical of South Italy. *J. Wine Res.* 15, 179-188.
- Capece, A., Fiore, C., Maraz, A. and Romano, P. (2005). Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J. Appl. Microbiol.* 98, 136-144.
- Cardinali, G. and Martini, A. (1994). Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4, 791-797.

- Caruso, M. Capece, A., Salzano, G. and Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 323-328.
- Casey, G.D. and Dobson, A.D. (2004). Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice-a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 327-335.
- Chambers, R.S., Broughton, M.J., Cannon, R.D., Carne, A. Emerson, G.W. and Sullivan, P.A. (1993). An exo- β -(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J. Gen. Microbiol.* 139, 325-334.
- Charoenchai, C, Fleet, G.H., Henschke, P.A. and Todd, B.E.N. (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2-8.
- Charpentier, M. (1977). Apparition des goûts de bouchon en relation avec le développement des levures dans liège. *Rev. Fr. Oenol.* n° 66 (60).
- Chatonnet, P., Dubourdiou, D., Boidron, J.N. and Pons, M.. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165-178.
- Chatonnet, P., Boidron, J.N. and Dubourdiou, D. (1993). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 27, 277-298.
- Chatonnet, P., Dubourdiou, D. and Boidron, J.N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463-468.
- Chatonnet, P., Viala, C. and Dubourdiou, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 443-448.
- Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making process. *Biotechnol. Lett.* 17, 1247-1250.

- Ciani, M. (1997). Role, oenological properties and potencial use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 1, 317-331.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 247-254.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotech.* 14, 199-203.
- Ciani, M., Beco, L. and Comitini, F. (2006). Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 239-245.
- Ciani, M. and Comitini, F. (2006). Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotech.* 22, 619-623.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J. and Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21, 149-155.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J. and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301-308.
- Cocolin, L., Hersey, A., and Mills, D.A. (2001). Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 49-53.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. and Comi, G. (2004a). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347-1355.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G. and Ciani, M. (2004b). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res.* 5, 237-245.

- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. and Martinez, C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237-243.
- Connell, L., Stender, H. and Edwards, C.G. (2002). Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 322-324.
- Connelly, P., Lewis, S.J. and Corry, J.E. (1988). A medium for the detection of yeasts using a conductimetric method. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 31-40.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. and Guillamón, J.M. (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Constantí, M., Reguant C., Poblet, M., Zamora F., Mas, A. and Guillamón, J. M. (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 169-175.
- Cootes, R.L. and Johnson, R. (1980). A fluorescent staining technique for determination of viable and non-viable yeast and bacteria in wineries. *Food Technol.* 32, 522-523.
- Couto, J.A., Barbosa, A. and Hogg, T. (2005). A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces* / *Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 505-510.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W. and de Barros, M.A: (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* (*in press*).
- Davenport, R. (1980). An outline guide to media and methods for studying yeasts and yeast-like organisms. In *Biology and Activities of Yeasts* ed. Skinner, F., Passmore, S. and Davenport, R. London: Academic Press, pp. 261-278.

- Deák, T. and Beuchat, L.R. (1993). Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeast in fruit juice. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 546-550.
- Deák, T. and Beuchat, L.R. (1994). Use of indirect conductimetry to predict the growth of spoilage yeasts, with special consideration of *Zygosaccharomyces bailii*. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 405-417.
- Deák, T. and Beuchat, L.R. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4514-4520.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 279-286.
- De Barros Lopes, M. A., Rainieri, S., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 915-924.
- Delaherche, A., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97, 910-915.
- Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J., Salmon, J. and Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeasts strains during winemaking: effect of the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vit.* 45, 291-296.
- De Llanos, R., Fernández-Espinar, M.T. and Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 85, 175-185.

- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2003). Identification of yeasts originated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20, 567-574.
- Divol, B., Miot-Sertier, C. and Lonvaud-Funel, A. (2006). Genetic characterization of strain of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *J. Appl. Microbiol.* 100, 516-526.
- Dizy, M. and Bisson, L.F. (2000). Proteolytic activity of yeasts strains during grape juice fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 155-167.
- Dubois, P. (1994). Les arômes des vins et leurs défauts. *Revue Française d'Oenologie.* 145, 27-40.
- Dubourdieu, D., Sokol, A., Zucca, J., Thalouarn, P. Datee, A. and Aigle, M. (1987). Identification de souches de levures isolées de vins par l'analyse de leur ADN mitochondrial. *Conn. Vigne Vin.* 4, 267-278.
- Egholm, M., Buchard, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B. and Nielsen, P.E. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson Crick hydrogen bonding rules. *Nature* 365, 556-568.
- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M. and Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789.
- Erten, H. (2002). Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 373-378.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.

- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F. and Querol, A. (2001a). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2056-2061.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M.J., Ramón, D. and Querol, A. (2001b). Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *Antonie van Leeuwenhoek.* 80, 85-92.
- Esteve-Zarzoso, B., Zoman, T., Belloch, C., and Querol, A. (2003). Molecular characterization of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 404-411.
- Farthing, J.B., Rodríguez, S.B. and Thornton, R.J. (2007). Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. *J. Sci. Food Agric.* 87, 527-533.
- Federici, F. (1983). Extracellular enzymes production in yeasts. *Ann. Microbiol.* 33, 93-97.
- Fernández, M., Úbeda, J.F. and Briones, A.I. (1999). Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 223-229.
- Fernández, M., Úbeda, J.F. and Briones, A.I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 29-36.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78, 87-97.
- Fernandez-Espinar, M.T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 1-10.
- Fernandez-Espinar, M.T., Barrio, E. and Querol, A. (2003). Genetic variability among species of the *Saccharomyces sensu stricto*. *Yeast* 20, 1213-1226.
- Fleet, G.H. (1992). Spoilage yeasts. *Crit. Reviews Biotech.* 12, 1-44.

- Fleet, G.H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. In: Wood, B.J.B.(ed). Microbiology of Fermented Foods, vol.I. Blackie Academic & Professional, London. pp.217-262.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology (Ed. Fleet, G.H.) Hardwood Academic Publishers, Chur. pp. 27-54.
- Flores Berrios, E.P., Alba Gonzalez, J.F., Arrizon Gavino, J.P., Romano, P., Capece, A. and Gschaedler Mathis, A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. Lett. Appl. Microbiol. 41, 147-152.
- Fonseca, A., Fell, J.W., Kurtzman C.P. and Spencer-Martins, I. (2000). *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L(+)- and meso-tartaric acid. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 389-394.
- Froudière, I., Laure, F. and Lonvaud-Funel, A. (1990). Utilisation de l'épifluorescence pour la détection des micro-organismes dans le vin. J. Int. Sci. Vig. Duv. 24, 43-46.
- Fugelsang, K.C. (1996). *Zygosaccharomyces*, a spoilage yeast isolated from wine. CATI August 1996.
- Fugelsang, K.C. (1997). Wine Microbiology. Chapman & Hall, New York.
- Fugelsang, K.C. (1998). *Zygosaccharomyces bailii*, a spoilage yeast isolated from grape juice. CATI September 1998.
- Futschik, K., Pfützner, H., Doblander, A. and Asperger, H. (1988). Automatical registration of microorganism growth by a new impedance method. Abst. Int. Meet. Chem. Eng. Biotechnol., Achema 88, 3p.
- Gallego, F. J., Pérez, M. A., Núñez, Y. and Hidalgo, P. (2005). Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 22, 561-568.
- Ganga, M.A. and Martínez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. J. Appl. Microbiol. 96, 76-83.

- Gao, C. and Fleet, G.H. (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, and *Kloeckera apiculata*. J. Appl. Bacteriol. 65, 405-410.
- Gil, J.V., Mateo, J.J., Jiménez, M., Pastor, A. and Huerta, T. (1996). Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts, J. Food Science. 61, 1247-1249.
- Giudici, P. and Zambonelli, C. (1992) Criteri di selezioni dei lieviti per enologia. Vignevini 9, 29-34.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. J. Appl. Microbiol. 96, 853-860.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. Int. J. Food Microbiol. 102, 295-304.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2006). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested-PCR. FEMS Microbiol. Lett. 254, 123-128.
- Granchi, L., Bosco, M. and Vicenzini, M. (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol. 87, 949-956.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A. and Vicenzini, M. (2002). Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. FEMS Yeast Res. 2, 403-407.
- Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T. and Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 708-714.

- Guillamón, J. M., Barrio, E. and Querol, A. (1996) Characterization of wine yeast strains of *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132.
- Guillamón, J. M., Sánchez, I. and Huerta, T. (1997) Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 267-272.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Gutiérrez, A.R., López, R., Santamaría, P. and Sevilla, M.J. (1997). Ecology of inoculated and fermentations in Rioja Spain musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 241-245.
- Gutiérrez, A.R., Epifanio, S., Garijo, P., López, R. and Santamaría, P. (2001). Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 352-356.
- Hallet, J.N., Craneguy, B., Zucca, J. and Poulard, A. (1988). Caractérisation de différentes souches industrielles de levures oenologiques par les profils de restriction de leur ADN mitochondrial. *Prog. Agric. Vitic.* 105, 328-333.
- Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541-547.
- Hawthorne, D. and Philippsen, P. (1994). Genetic and molecular analysis of hybrids in the genus *Saccharomyces* involving *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and a new species, *S. douglasii*. *Yeast.* 10, 1285-1296.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H. (1986). Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 477-481.

- Heard, G.M. and Fleet, G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84, 865-876.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C. and Dujon, B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 551-559.
- Henschke, P.A. and Thomas, D.S. (1988). Detection of wine-spoiling yeast by electronic methods. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 123-133.
- Heresztyn, T. (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 127-132.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martín-Alvarez, P.J. and Cabezudo, M.D. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulphur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 313-318.
- Howell, K.S., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H. and Henschke, P.A. (2004). Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 315-320.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. and Sharp, P. M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 825-834.
- Ibeas, J., Lozano, J., Perdignes, L. and Jiménez, J. (1996). Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998-1003.

- James, S.A., Collins, M.D. and Roberts, I.N. (1994). Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast*. 10, 871-881.
- James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N. and Collins, M.D. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 453-460.
- Kreger van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast. A taxonomic Study*. Elsevier Sci., Pub., B.V. Amsterdam.
- Kunkee, R.E. and Bisson, L. (1993). Winemaking yeasts. In: Rose, A.H. & Harrison, J.S. (eds.) *The Yeasts* (2nd ed.), vol.5:Yeast technology. Academic Press, London. pp. 69-128.
- Kurtzman, C.P. and Fell, F.W. (1998). *The Yeasts: a Taxonomic Study*. 4th edn. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P. (2000). Four new yeasts in the *Pichia anomala* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 395-404.
- Lafon-Lafourcade, S. (1986). *Appl. Microbiol. Experientia*. 42, 904-914.
- Lagace, L.S. and Bisson, L.F. (1990). Survey of yeasts acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vit.* 41, 147-155.
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. and Angulo, L. (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol.Vitic.* 47, 206-216.

- Lin, C.C.S. and Fung, D.Y. (1987). Conventional and rapid methods for yeast identification. *Crit. Rev. Microbiol.* 14, 273-289.
- Lodder, R.J. and Kreger van Rij, N.J.W. (1967). *The yeast. A taxonomic Study.* North Holland. Pub.Co. Amsterdam.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. and Villa, T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A. and 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, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L. Orr, E., Phister, T., Marshall, M., van der Gheyns, J. and Mills, D.A. (2003). Design and evolution of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6801-6807.
- Lyons, S.R., Griffen, A.L. and Leys, E.J. (2000). Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2362-2365.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S. and Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods.* 45, 127-134.
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes, L. and Loureiro, V. (1989). Infecting yeasts in Portuguese bottled white wines. *Proceedings of the XIIIth International Symposium on Yeasts.* Leuven, Belgium, 34-35.
- Mansfield, A.K., Zoecklein, B.W. and Whiton, R.S. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 303-307.
- Manzanares, P., Ramón, D. and Querol, A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 105-112.

- Manzanares, P., Rojas, V. Genovés, S. and Vallés, S. (2000). A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 95-103.
- Marinangeli, P., Angelozzi, D., Ciani, M., Clementi, F. and Mannazzu, I. (2004). Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Res.* 4, 427-435.
- Martínez, J., Millán, C. and Ortega, J.M. (1989). Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from 'Pedro Ximénez' grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 10, 31-35.
- Martínez, M., Yuste, M., Esteve, B., Álvarez, J.F., Cantarero, J., Bobet, R. and Rubires, X. (2004). Application de l'impédance électrique pour le contrôle microbiologique des vins embouteillés. *Rev. Fr. Oenol.* 205, 123-128.
- Martini, A., Federici, F. and Rosini, G. (1980) A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can. J. Microbiol.* 26, 856-859.
- Martini, A., Ciani, M. and Scorzzetti, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435-440.
- Martini, A. and Vaughan-Martini, A. (1990). Grape must fermentation: Past and present. In: *Yeast technology*. Ed: J.F.T. Spencer and D.M.Spencer. Springer-Verlag. Berlin. pp:105-123.
- Martorell, P., Querol, A. and Fernández-Espinar, M. T. (2005). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* species directly from wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6823-6830.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernandez-Espinar, M.T., Loureiro, V. and Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 79-86.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. and Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.

- McKay, A.M. (1990). Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. Lett. Appl. Microbiol. 11, 41-44.
- Millet, V. and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. 30, 136-141.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. and Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4884-4893.
- Mitrakul, C., Henick-Kling, T. and Egli, C. (1999). Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. Food Microbiol. 16, 3-14.
- Mora, J., Barbas, J.I., and Mulet, A. (1990a). Growth of yeast microflora during the early stages of the fermentation in inoculated Majorcan musts. Microbiologia. 6, 65-70.
- Mora, J., Barbas, J.I. and Mulet, A. (1990b). Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveomyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. 41, 156-159.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T. and Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 103, 285-294.
- Moreno, J.J., Millán, C., Ortega, J.M. and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. J. Ind. Microbiol. 7, 181-190.
- Musmanno, R.A., Maggio, T. and Coratza, G. (1999). Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. J. Appl. Microbiol. 87, 932-938.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.
- Neeley, E.T., Phister, T.G. and Mills, D.A. (2005). Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8954-8957.

- Ness, F., Lavelleé, F., Dubourdiou, D., Aigle, M. and Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89-94.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 254, 1497-1500.
- Nissen, P., Nielsen, D. and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast.* 20, 331-341.
- Pampulha, M. E., and Loureiro-Dias, M. C. (1989). Combined effect of acetic acid, pH, and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotech.* 31, 547-550.
- Parish, M.E. and Carroll, D.E. (1985). Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 12, 3-31.
- Pearson, B.M., Carter, A.T., Furze, J.M. and Roberts, I.N. (1995). A novel approach for discovering retrotransposons: characterization of a long terminal repeat element in the spoilage yeast *Pichia membranaefaciens* and its use in strain identification. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 386-389.
- Pérez-Nevaldo, F., Albergaria, H., Hoqq, T. and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336-345.
- Phister, T. G., and Mills, D. A.. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430-7434.
- Pinzani, P., Bonciani, M., Pazzagli, C., Orlando, S., Guerrini, S. and Granchi, L. (2004). Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 118-124.

- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J.C. and Ortega, J.M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20, 217-224.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865-877.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. and Typas, M.A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* 89, 236-248.
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J. and Augustyn, O.P.H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20, 61-74.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16, 675-729.
- Querol, A. and Barrio, E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 1657.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992b). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Quesada, M.P. and Cenis, J.L. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 204-208.
- Rao, R.S., Bhadra, B., Kumar, N.N. and Shivaji, S. (2007). *Candida hyderabadensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from wine grapes. *FEMS Yeast Res.* (in press).

- Raspor, P., Cus, F., Jemec, K.P., Zagorc, T., Cadez, N. and Nemanic, J. (2002). Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technol. Biotechnol.* 40, 95-102.
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S. and Cadez, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 97-102.
- Rawsthornen, H. and Phister, T.G. (2006). A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 1-7.
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C. and Lonvaud-Funel, A. (2006a). Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol.* 23, 136-145.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G. and Lonvaud-Funel, A. (2006b). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208-1219.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P. (1976). *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du vin. Vol. 2* Dunod ed. Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000). *Handbook of enology. The Microbiology of wine and vinifications. Vol. I.* West Sussex, England: Wiley & Sons.
- Rodrigues, U.M. and Kroll, R.G. (1986). Use the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 139-144.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera* / *Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588-599.

- Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., van Broock, M., Valles, S., Ramón, D. and Caballero, A.C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeast for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* 96, 84-95.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, P. and Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283-289.
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, P. and Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 181-188.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G. and Zironi, R. (1992). Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 126-130.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 309-315.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. and Maifreni, M. (1997a). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 82, 615-618.
- Romano, P., Suzzi, P. and Fatichenti, F. (1997b). Secondary products formation as a tool discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71, 239-242.
- Romano, P. (2002). Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. In: Ciani M (ed) *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 99-109.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180.
- Rosi, I., Vinella, M. and Domizio, P. (1994) Characterization of β -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519-527.
- Rosini, G., Federici, F. and Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8, 83-89.

- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. and Guillamón, J.M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.
- Sabaté, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. and Guillamón, J.M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267-274.
- Schuller, D., Corte-Real, M. and Leao, C. (2000). A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *J. Food Prot.* 63, 1570-1575.
- Sharf, R. and Margalith, P. (1983). The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.
- Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosome. *Nucleic Ac. Res.* 18, 6503-6508.
- Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2079-2083.
- Soden, A., Francis, I. L., Oackey, H. and Henschke, P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21-30.
- Sohier, D. and Lonvaud-Funel, A. (1998). Rapid and sensitive in situ hybridisation method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine. *Food Microbiol.* 15, 391-397.
- Soles, R.M., Ough, C.S. and Kunkee, R.E. (1982). Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 94-98.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C. and Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian mustsand wines. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1036-1041.
- Sponholz, W.R. (1993). Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G.H. (ed). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. Chur. pp. 395-420.

- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B. and Coull, J. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938-941.
- Stern, M.J., Ames, G.F.L., Smith, N.H., Robinson, E.C. and Higgins, C.F. (1984). Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell.* 37, 1015-1026.
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. and van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* yeasts. *J.Appl. Microbiol.* 91, 182-190.
- Sturm, J., Grossman, M. and Schnell, S. (2006). Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1241-1248.
- Suárez, J.A. y Íñigo, B. (1992). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Suomalainen, H, and Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* 85, 149-156.
- Taylor, G.T. and Marsh, A.S. (1984). MYGP+ copper, a medium that detects both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast. *J. Inst. Brew.* 90, 134-145.
- Thomas, D.S. (1993). Yeast as spoilage organisms in beverages. In: Rose, A.H. & Harrison, J.S. (eds.) *The Yeasts*, 2nd ed., vol. 5: Yeast Technology. Academic Press, New York. pp, 517-561.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 345-352.

- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. and Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47-53.
- Toro, M.E. and Vázquez, F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 347-354.
- Trama, J.P., Mordechai, E. and Adelson, M.E. (2005). Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida vaginitis* by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. Cell Probes.* 19, 145-152.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M. and Dequin, S. (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5, 959-969.
- van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E. and Gerlosky, W. (2004). Yeasts present during spontaneous fermentations of Lake Erie Charonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek.* 83, 149-154.
- van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. and Pretorius, I.S. (2000). Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 3-9.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Ac. Res.* 19, 6823-6831.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Poulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.N. (1995). Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
- Versavaud, A. and Hallet, J.N. (1995). Pulsed-field gel electrophoresis combined with rare-cutting endonucleases for strain differentiation of *Candida famata*, *Kloeckera apiculata* and

- Schizosaccharomyces pombe with chromosomes number and size estimation of the two former. Syst. Appl. Microbiol. 18, 303-309.
- Veziñhet, F., Blondin, B. and Hallet, J. N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 568-571.
- Veziñhet, F., Dulau, L. and Hallet, J. N. (1994). Comparaison de différentes méthodes d'identification moléculaire de levures d'intérêt oenologique. R. F. Oe. 149, 13-16.
- Villa-Carvajal, M., Querol, A. and Belloch, C. (2006). Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. Antonie van Leeuwenhoek. 90, 171-181.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-Van Der Vegte, W. H. and Van Dijken, J. P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3785-3792.
- Vollekova, A., Malik, F., Vollek, V. and Linczenyiova, K. (1996). Characterization of yeasts isolated from red wine surface film. Folia Microbiol. 41, 347-352.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., vande Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23, 4407-4414.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K. and Mikata, K. (1994). The phylogenetic relationships of species of the genus *Dekkera* van der Walt based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1803-1808.
- Yanai, T. and Sato, M. (2000). Purification and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1181-1188.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-MARTins, I. and Gírio, F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. Int. J. Food Microbiol. (*In press*).

Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F. and Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guillermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 15, 235-238.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. (1995). *Wine analysis and production*. Chapman & Hall, New York.

CAPÍTOL 1

New PCR-based methods for yeast identification

Núria Hierro, Ángel González, Albert Mas and José M. Guillamón

Unitat d'Enologia, Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments (CeRTA).

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili.

Ramón y Cajal 70, 43005, Tarragona, Spain.

Journal of Applied Microbiology 97, 792-801 (2004)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ABSTRACT

Aims: To characterize reference yeast strains and identify indigenous strains isolated from wine fermentations by PCR methods.

Methods and Results: We compared several PCR techniques for yeast identification. We used oligonucleotide primers that are complementary to (i) intron splice sites, (ii) REP and (iii) ERIC elements to produce PCR fingerprints that display specific patterns between the different yeast species. These three techniques were used to characterize 41 reference yeast strains belonging to 15 different species and to identify 40 indigenous strains isolated from grape must and wine fermentations. Species-specific banding patterns were obtained with the three PCR techniques with different degrees of intraspecific differentiation depending on the method. By comparing the PCR fingerprints of unknown isolates with those produced by reference strains, we identified yeast strains isolated from an industrial wine fermentation.

Conclusions: All three PCR techniques are rapid, reliable and simple methods of yeast identification. As far as we know, this is the first time that the primers designed for amplifying repetitive elements in bacteria have been successfully used in yeast.

Significance and Impact of the Study: Industry needs rapid, reliable and simple methods of yeast identification. The proposed PCR techniques will allow to achieve this objective.

Keywords: 5.8S-ITS, ERIC-PCR, PCR-intron splice sites, REP-PCR, RFLP-PCR, yeast identification.

1. INTRODUCTION

Yeasts are a source of economically valuable products. They play a crucial role in the production of fermented foods and alcoholic beverages, such as bread, beer and wine. Yeasts can also produce a wide range of useful secondary metabolites such as antibiotics and vitamins. However, they can be both beneficial and harmful. Spoilage by yeasts can lead to huge economic losses in production, processing, preservation and storage. Therefore, the industry needs rapid, simple and reliable methods to detect whether yeasts are causing food spoilage and to quickly identify possible routes of contamination. In this way, industry can improve the microbiological quality of foods (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

Yeasts have traditionally been classified on the basis of their morphological, physiological and biochemical properties (Kurtzman and Fell 1998; Barnett *et al.* 2000). However, this is complex and time-consuming, and can lead to incorrect classification (Deák and Beuchat 1996). However, progress in molecular biology has provided a large number of DNA based techniques for identifying and characterizing yeasts. These include DNA–DNA hybridization (Vaughan Martini and Martini 1987; Török *et al.* 1993), electrophoretic karyotyping (Vezinhet *et al.* 1990; Guillamón *et al.* 1996), RFLPs of chromosomal DNA (Versavaud and Hallet 1995), mitochondrial DNA (Guillamón *et al.* 1994, 1997; Belloch *et al.* 1997) and ribosomal DNA sequencing (Kurtzman and Robnett 1998). Within these molecular techniques, PCR based methods have permit both intraspecies differentiation and species identification of yeast isolates (De Barros Lopes *et al.* 1998). Most of these methods are quick and simple.

A useful method of yeast identification is the restriction analysis of different regions of the ribosomal RNA genes (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). This technique has two steps: first, the rRNA region is amplified and then the PCR product is digested. This technique is slower than some current PCR methods, which achieve identification and typing with

just the PCR product. Most of these techniques are based on amplifying several repetitive sequences in the yeast genome, such as microsatellites (Gallego *et al.* 1998; Hennequin *et al.* 2001) delta elements of the Ty transposon (Ness *et al.* 1993; Lavalée *et al.* 1994) and intron splice sites (ISS; De Barros Lopes *et al.* 1996, 1998).

Similar repetitive sequences such as repetitive extragenic palindromic (REP) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) elements have been described in bacteria (Sharples and Lloyd 1990; Hulton *et al.* 1991). PCR studies of eubacterial species have shown that these repetitive sequences are specific for bacterial species and strains within species (Versalovic *et al.* 1991). REP and ERIC elements have therefore been used to identify bacteria as well as to determine taxonomic relationships between bacterial species (Marshall *et al.* 1999; Nanda *et al.* 2001; Ventura and Zink 2002).

In this study we used the oligonucleotides based on the REP and ERIC elements (Versalovic *et al.* 1991) to characterize reference yeast strains and identify indigenous strains isolated from wine fermentations. We also evaluated the usefulness of the complementary primers to ISS (De Barros Lopes *et al.* 1996) for the same objective. We propose that these molecular methods be used for the taxonomic identification of yeasts because they require less time and effort than other molecular techniques.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Strains.

The 41 reference strains used in this study, all of which were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT), are listed in Table 1. Forty indigenous colonies were randomly isolated from the must and the first day of fermentation by plating these samples on YEPD-agar medium (1% yeast extract; 2% peptone, 2% glucose and 2% agar, w/v). The must was obtained

from grapes of the red Grenache variety. Wine fermentation was carried out in the experimental cellar of the Oenology Faculty in Tarragona during the 2002 vintage.

Table 1. Reference strains used in this study. Sources of strains are abbreviated as : CECT (Spanish Type Culture Collection, Universidad de Valencia), CBS (Centralalbureau voor Schimmelcultures, culture collection in Delft, the Netherlands), ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA,USA), MCYC (Microbiology Collection of Yeast Cultures, Universidad Politécnica de Madrid), NCYC (National Collection of Yeast Cultures, Norwich, U.K.), IFI (International Fabricare Institute).

Species	CECT Designation	Other designations	Isolation source
<i>Candida boidinii</i>	10029	MCYC 113	Milk
<i>Candida boidinii</i>	10035	MCYC 124	<i>Amygdalus communis</i>
<i>Candida mesenterica</i>	1025	CBS 602	Beer
<i>Candida sake</i>	1044	CBS 617	Lambic beer
<i>Candida sake</i>	10034	MCYC 123	Faeces of sheep
<i>Candida stellata</i>	11046	CBS 2649	Grape juice
<i>Candida stellata</i>	11108	CBS 157	Wine grapes
<i>Candida stellata</i>	11109	CBS 1713	Wine
<i>Candida stellata</i>	11110	CBS 843	Wine grapes
<i>Dekkera anomala</i>	1008	ATCC 10559	Beer
<i>Dekkera anomala</i>	11162 ^T	-	-
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1009	CBS 72	Lambic beer
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1451 ^T	CBS 74	Lambic beer
<i>Dekkera bruxellensis</i>	11024	NCYC 362	Stout beer
<i>Dekkera bruxellensis</i>	11045	CBS 2797	Bordeaux wine
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1118	CBS 5914	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1444 ^T	CBS 314	Muscat grape

<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10389	MCYC 1857	Grape juice
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11105	CBS 2589	Grape must
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11106	CBS 5073	Wine grape
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11107	CBS 8130	Grapes
<i>Issatchenkia terricola</i>	11139	-	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	11176	-	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	10181	MCYC 579	Grapes
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1382	IFI 982	-
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1371	IFI 979	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1378	ATCC 24751	Millet beer
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1379	ATCC 26760	Grape must
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10685 ^T	CBS 356	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1880	-	Wine
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	10558	MCYC 2604	White wine
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	10676	CBS 3003	Grapes
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11041	CBS 3014	Wine
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11042	CBS 4688	Grape must
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11043	CBS 2902	Cloudy wine
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1230	CBS 741	Honey
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1232 ^T	CBS 732	Must of black grape
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1941 ^T	CBS 300	Beer
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1969	CBS 395	Juice of Ribes nigrum
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1171	CBS 1320	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1942 ^{NT}	CBS 1171	Beer

2.2. DNA extraction.

After overnight growth in YEPD media in a 1.5-ml Eppendorf tube, DNA were extracted according to Querol *et al.* (1992) and diluted between 1 and 50 ng μl^{-1} . The concentration and purity of DNA were determined using a GenQuant spectrophotometer (Pharmacia, Cambridge, UK).

2.3. PCR conditions.

The primers that are complementary to the ISS (De Barros Lopes *et al.* 1996) and to the ERIC and REP elements (Versalovic *et al.* 1991) are shown in Table 2.

Table 2. DNA amplification conditions and primers used for PCR-ISS, ERIC-PCR, REP-PCR and PCR-RFLP of the 5,8S rRNA gene and the two ITS. "I" represents inosine.

Method	Primer	Sequence 5'-3'	Amplification conditions
			33 cycles
PCR- ISS	EI1*	CTGGCTTGGTGTATG	94 °C 1 min- 45 °C 2 min- 74 °C 1.5 min
			30 cycles
REP-PCR	REPIR-1 REP2-I	IIICGICGICATCIGGC ICGICTTATCIGGCCTAC	94 °C 30 s- 47 °C 1 min- 65 °C 4 min
			30 cycles
ERIC-PCR	ERIC 1R ERIC 2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	94 °C 30 s- 52 °C 1 min- 65 °C 4 min
			40 cycles
PCR-RFLP 5,8S/ITS	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	95 °C 30 s- 52 °C 1 min- 72 °C 1 min

*In PCR-ISS, primer EI1 was used alone.

REP oligonucleotides are partially degenerate because they include some inosines in their sequence. Inosine is capable of forming Watson–Crick base pairs with A, G, C or T. PCR conditions for each technique are also shown in this Table 2. PCR-ISS was carried out in 50 µl final volume containing 2 µl of DNA template, 50 pmol of primer EI1, 32 µM of each dNTP, 2.5

mM MgCl₂ and 0.2 U of Taq DNA polymerase (ARK Scientific, Darmstadt, Germany). ERIC-PCR and REP-PCR amplification was carried out in 25 µl final volume containing 3 µl of DNA template, 15 pmol of each respective primer, 100 µM of each dNTP, 5 µl 5X GB buffer [Tris-HCl 1 M pH 8.8 (NH₄)₂SO₄ 1 M, MgCl₂ 1 M, EDTA 0.5 M pH 8.8, b-mercapto-ethanol 14.4 M], 0.2 µl of BSA (20 mg ml⁻¹), 2.5 µl of DMSO and 2.5 U of Taq DNA polymerase (ARK Scientific, Darmstadt, Germany). The internal transcribed spacer (ITS) region and the 5.8S rRNA gene was amplified as described previously (Guillamón *et al.* 1998). Primer pairs used to amplify this region were also previously described (White *et al.* 1990) (Table 2). All the amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4. Restriction of amplified DNA.

Five microlitres of the ITS/5.8S rRNA gene amplified product was digested with the restriction endonucleases *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the supplier's instructions.

2.5. Agarose gel electrophoresis and microchip electrophoresis.

The products of the PCR-ISS, ERIC-PCR and REP-PCR were analysed by electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel in 1X TBE buffer, stained with ethidium bromide and visualized under u.v. light. A 100-bp DNA Ladder marker (Gibco-BRL, Eggenstein, Germany) was used as the size standard. The ITS/5.8S rRNA gene amplicons were electrophoresed on a 0.8% (w/v) agarose gel and the restriction fragments were separated on a 3% (w/v) agarose gel.

Sizing by electrophoresis was compared with automated capillary electrophoresis using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, Germany). The DNA 12000 LabChip[®] kit was used to size the amplified products on the bioanalyzer. The bioanalyzer sizes PCR products quickly and automatically. DNA assay separates nucleic acid fragments by capillary electrophoresis in a microchip with micro-fabricated channels and automates both detection and

on-line data evaluation. The instrument is equipped with a fluorescence detection system that leads to greater detection sensitivity, and the DNA sample size is estimated by comparison with external standards (DNA sizing ladder) and internal standards (DNA markers), thus providing accurate and reproducible sizing (Panaro *et al.* 2000; Nachamkin *et al.* 2001). However, although the sizing of fragments is more accurate in the bioanalyzer than in the agarose gels, we detected an error between 2 and 5%. All the sizes assigned should therefore be considered approximations.

2.6. Sequencing of the amplified fragments.

PCR fragments were purified with the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). DNA sequencing was performed using the ABIPrism 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) and the Prism Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The ERIC 1R primer was used to perform this sequencing process. The sequences obtained were assembled using the CLUSTALW program (Jeanmougin *et al.* 1998) and compared with that of the *Saccharomyces cerevisiae* genome using a BLAST search (Basic Alignment Search Tool) with the Saccharomyces Genome Database (SGD) (internet address, <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd>). The BLAST search was also used to compare the ERIC consensus sequence (Hulton *et al.* 1991) with the SGD and the EMBL (internet address, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

3. RESULTS

3.1. Characterization of yeast collection strains.

We characterized 41 strains belonging to 15 species (Table 1) by three independent PCR methods: PCR-ISS, ERIC-PCR and REP-PCR. Tables 3, 4 and 5 show the sizes of the PCR products obtained for each of these techniques, respectively. We demonstrated the reproducibility of the techniques by amplifying the same strain several times, but each time from different DNA

extractions. The patterns obtained were identical for the same strain with the PCR-ISS and ERIC-PCR techniques but some problems of reproducibility were sometimes detected with the REP-PCR. The three PCR methods yielded between three and 14 DNA fragments, ranging from 100 to 2000 bp (faint bands above 2000 bp were detected in some PCR fingerprints but they were not considered). The PCR-ISS, ERICPCR and REP-PCR yielded 27, 20 and 15 different patterns, respectively, of the 41 strains belonging to 15 species. The REP-PCR amplification patterns from strains of the same species were identical and some polymorphism was detected by PCR-ISS and ERIC-PCR in strains of the same species. In spite of this intraspecific variability, the strains of the same species always shared several fragments of the same size.

PCR-ISS. This technique was first described as effective in the differentiation of yeast strains of different species (De Barros Lopes *et al.* 1998). We used the primer EI1, complementary to the yeast intron 5' splice site (De Barros Lopes *et al.* 1996), to obtain the PCR patterns listed in Table 3.

Table 3. Size in bp of the amplified fragments obtained by PCR-ISS of the yeast collection strains (common fragments in the strains of the same species with different fingerprint are underlined).

Species	CECT Designation	Fragments (bp)
<i>C. boidinii</i>	10029	450, 600, <u>740</u> , 1100, 1250, <u>1750</u>
<i>C. boidinii</i>	10035	<u>740</u> , 1200, 1350, <u>1750</u>
<i>C. mesenterica</i>	1025	480, 660, 820, 1200, 1750
<i>C. sake</i>	1044, 10034	125, 285, 480, 500, 650, 760, 925, 1350, 1750
<i>C. stellata</i>	11046, 11109	285, 630, 875, 900, 980, 1150, 1500
<i>C. stellata</i>	11108	320, 510, 750, 900, 980, 1300, 1750
<i>C. stellata</i>	11110	460, 590, 630, 950, 1300, 1750
<i>D. anomala</i>	1008, 11162	250, 350, 360, 400, 420, 650, 1000, 1300

<i>D.bruxellensis</i>	1009, 1451, 11024, 11045	250, 350, 510, 650, 730, 1150, 1450
<i>H. uvarum</i>	1118	<u>370</u> , <u>450</u> , 470, <u>500</u> , <u>1050</u> , 1250, <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>H. uvarum</i>	1444	<u>370</u> , <u>450</u> , <u>500</u> , 730, <u>1050</u> , 1250, <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>H. uvarum</i>	10389	<u>370</u> , <u>450</u> , <u>500</u> , 620, 730, 850, <u>1050</u> , <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>H. uvarum</i>	11105	<u>370</u> , <u>450</u> , <u>500</u> , <u>1050</u> , 1250, <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>H. uvarum</i>	11106	<u>370</u> , <u>450</u> , 470, <u>500</u> , 620, 730, <u>1050</u> , <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>H. uvarum</i>	11107	<u>370</u> , <u>450</u> , <u>500</u> , 620, 730, <u>1050</u> , <u>1350</u> , <u>1500</u>
<i>I. terricola</i>	11139	<u>320</u> , <u>580</u> , <u>660</u> , <u>750</u> , <u>820</u> , 875, 980, <u>1150</u> , 1350
<i>I. terricola</i>	11176	<u>320</u> , <u>580</u> , <u>660</u> , <u>750</u> , <u>820</u> , <u>1150</u> , 1200
<i>I. terricola</i>	10181	470, 880, 990, 1100, 1250, 1450
<i>S' codes ludwigii</i>	1382, 1371	300, 450, 720, 940, 1200
<i>Schiz. pombe</i>	1378, 1379, 10685	590, 750, 1100, 1350
<i>T. delbrueckii</i>	1880, 10558, 10676	530, 830, 1350, 1550
<i>Z. bailii</i>	11041, 11042, 11043	270, 730, 1550
<i>Z. rouxi</i>	1230	390, <u>700</u> , <u>730</u> , <u>850</u> , <u>940</u> , <u>1400</u>
<i>Z. rouxi</i>	1232	<u>700</u> , <u>730</u> , <u>850</u> , <u>940</u> , 1300, <u>1400</u>
<i>S.bayanus</i>	1941	350, <u>400</u> , <u>410</u> , 520, 680, <u>875</u> , 1020, <u>1300</u>
<i>S.bayanus</i>	1969	240, <u>400</u> , <u>410</u> , <u>875</u> , 1150, <u>1300</u>
<i>S.cerevisiae</i>	1171, 1942	350, 520, 680, 940, 1350, 1450

When a combination of the E11 and LA2 primers (De Barros Lopes *et al.* 1996) were used in the same PCR reaction, there was no additional separation of the strains (data not shown). The amplification patterns of all the species were different. Although some species yielded a unique amplification fingerprint, some strains of the same species produced different patterns. This was the case for the strains of the species *Candida boidinii*, *C. stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Z. rouxii* and *S. bayanus*. However, the strains of the same species shared amplified fragments, with some exceptions (Table 3). The best example of intraspecific variability together with the presence of species-specific bands was shown by the strains of *H. uvarum*.

Each *H. uvarum* strain yielded a different fingerprint, but six bands were common to all of them. Species-specific amplified fragments were also present in *C. boidinii*, *Z. rouxii* and *S. bayanus*. The strains of *I. terricola* 11139 and 11176 also shared most of the amplified fragments, but neither strain shared any fragment with the other strain of this species (CECT 10181). We have usually used the PCR-RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ITS for yeast identification (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). We checked that the sizes of the PCR products and the restriction fragments of all the strains in this study were as previously described for each of their species (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999) (data not shown). The *I. terricola* 10181 also yielded the restriction pattern described for this species and, therefore, other molecular markers should be used to confirm these differences with the other strains. *Candida stellata* strains did not present any common band in the three different fingerprints obtained. The couple of strains 11046 and 11109 yielded the same pattern and shared some bands with the pattern of the strain 11108 (900 and 980 bp bands) or with the pattern of the strain 11110 (630 bp band), but any band was common to the three PCR patterns. The strains 11108 and 11110 also shared amplified fragments between them (1300 and 1750 bp bands).

ERIC-PCR and REP-PCR. We tested the PCR primers based on the ERIC and REP consensus sequences (Versalovic *et al.* 1991) with the same set of yeast strains listed in Table 1. This was to obtain exclusive fingerprints for each yeast strain. However, neither method was absolutely effective in differentiating strains of the same yeast species. All species had a different ERIC-PCR pattern (Table 4).

Table 4. Size in bp of the amplified fragments obtained by ERIC-PCR of yeast collection strains (common fragments in the strains of the same species with different fingerprint are underlined).

Species	CECT Designation	Fragments (bp)
<i>C. boidinii</i>	10029	400, <u>500</u> , 700, <u>800</u> , 1100, 1250, <u>1300</u> , <u>1550</u>
<i>C. boidinii</i>	10035	250, <u>500</u> , <u>800</u> , <u>1300</u> , <u>1550</u>
<i>C. mesenterica</i>	1025	450, 750, 950, 2000
<i>C. sake</i>	1044, 10034	150, 270, 450, 530, 640, 670, 830, 920, 1050, 1200, 1350
<i>C. stellata</i>	11046, 11109	350, 420, 450, 700, <u>900</u> , 1100, 1400, 1700
<i>C. stellata</i>	11108	270, 420, 500, 750, <u>900</u> , 1050, 1200
<i>C. stellata</i>	11110	270, 700, <u>900</u> , 1400, 1500
<i>D. anomala</i>	1008, 1162	200, 270, 350, 450, 550, 670, 700, 840, 900, 950, 1050, 1250, 1500, 1950
<i>D. bruxellensis</i>	1009, 1451, 11024, 11045	220, 350, 450, 650, 700, 950, 975, 1200
<i>H. uvarum</i>	1118, 1444, 10389, 11105, 11106, 11107	340, 480, 500, 590, 700, 1050, 1350, 1450
<i>I. terricola</i>	11139	<u>400</u> , <u>1000</u> , 1090, <u>1550</u> , <u>2000</u>
<i>I. terricola</i>	11176	330, <u>400</u> , <u>1000</u> , 1090, 1250, <u>1550</u> , <u>2000</u>
<i>I. terricola</i>	10181	340, <u>400</u> , 700, <u>1000</u> , 1250, <u>1550</u> , <u>2000</u>
<i>S'codes ludwigii</i>	1382,1371	560, 600, 710, 1350
<i>Schiz. pombe</i>	1378, 1379, 10685	200, 520, 650, 710, 830, 900, 1150, 1250, 1750
<i>T. delbrueckii</i>	1880, 10558, 10676	320, 400, 550, 590, 610, 650, 730, 830, 1000, 1050, 1200, 1500
<i>Z. baillii</i>	11041, 11042, 11043	180, 520, 590, 600, 780, 850, 930, 1000, 1350
<i>Z. rouxi</i>	1230, 1232	320, 380, 470, 540, 700, 790, 930, 1000, 1050, 1250
<i>S.bayanus</i>	1941, 1969	160, 350, 420, 530, 900, 1000, 1100, 1300
<i>S.cerevisiae</i>	1171, 1942	150, 340, 570, 700, 900, 1000, 1080, 1100, 1250, 1300

Most species yielded a unique amplification fingerprint, but intraspecific variability was detected in the strains of *C. boidinii*, *C. stellata* and *I. terricola*. Unlike the PCR-ISS, *H. uvarum*, *Z. rouxii* and *S. bayanus* strains yielded the same fingerprints. Despite this intraspecific variability, species-specific bands were present in these species. For instance, all the strains of *I. terricola* shared four common bands (400, 1000, 1550 and 2000 bp), or the strains of *C. boidinii* shared four bands of 500, 800, 1300 and 1550 bp. As in the PCR-ISS, three different PCR fingerprints were obtained of the four *C. stellata* strains. The strains 11046 and 11109 again showed the same ERIC-PCR pattern. These three PCR patterns only shared a common band of 900 bp. As mentioned above, REP-PCR banding patterns were identical for all the strains of the same species (Table 5).

Table 5. Size in bp of the amplified fragments obtained by REP-PCR of yeast collection strains.

Species	CECT Designation	Fragments (bp)
<i>C. boidinii</i>	10029, 10035	350, 975
<i>C. mesenterica</i>	1025	520, 560, 950, 975
<i>C. sake</i>	1044, 10034	160, 230, 550, 610, 800
<i>C. stellata</i>	11046, 11108, 11109, 11110	300, 400, 550, 650, 800, 870, 1000, 1400,
<i>D. anomala</i>	1008, 11162	960, 1150, 1300, 2000
<i>D. bruxellensis</i>	1009, 1451, 11024, 11045	300, 650, 870, 960, 1000, 1100, 1300, 1500
<i>H. uvarum</i>	1118, 1444, 10389, 11105, 11106, 11107	870, 2000
<i>I. terricola</i>	11139, 11176, 10181	320, 800, 870, 950, 1000, 1300, 1500
<i>S'codes ludwigii</i>	1382, 1371	825, 925, 1050
<i>Schiz. pombe</i>	1378, 1379, 10685	470, 850, 1200, 1400
<i>T. delbrueckii</i>	1880, 10558, 10676	180, 330, 420, 500, 580, 620, 850, 1250, 1400
<i>Z. baillii</i>	11042, 11043	150, 200, 380, 500, 620, 850, 950, 980, 1250

<i>Z. rouxi</i>	1230, 1232	350, 650, 850, 1400, 1500
<i>S.bayanus</i>	1941, 1969	220, 520, 600, 650, 820, 980, 1150, 1200, 1500
<i>S.cerevisiae</i>	1171, 1942	220, 270, 320, 590, 630, 800, 980, 1200, 1250, 1400

3.2. Sequence analysis of ERIC-PCR products.

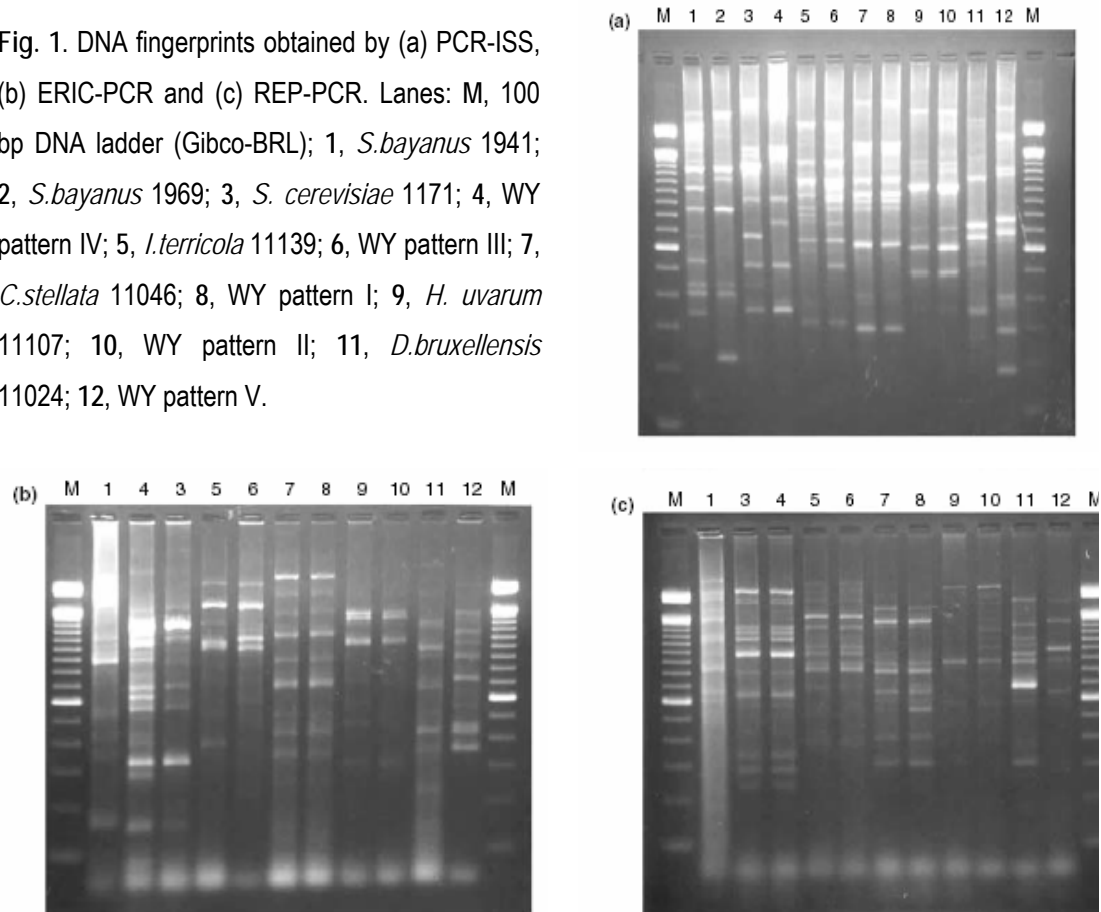
We determined the specificity of the PCR product by sequencing the 340-bp amplified fragment of the *S. cerevisiae* strains 1171 and 1942. This species was chosen because of the availability of all the *S. cerevisiae* genome in the database (SGD). Both sequences of the *S. cerevisiae* strains were identical and matched with the nucleotides 159 to 509 from the ATG start codon of ORF PEX6 in chromosome XIV. This sequence was amplified because the ERIC 1R primer showed a strong homology (especially in the 3'-end of the primer) with the nucleotides 159 to 181 of the PEX6 gene (ACATTGTGTCCTGGATGATTCAC; nucleotides underlined are identical to the primer ERIC 1R). Curiously the reverse primer for the amplification of this fragment was not the ERIC 2. The complementary of the ERIC 1R primer showed the highest homology with the nucleotides 488–509 (TTGATTTTACAGAAACCCAATT; nucleotides underlined are identical to the complementary of the primer ERIC 1R). As expected, the amplified fragments must be the product of the combination of the primers ERIC 1R/ERIC 1R; ERIC 1R/ERIC 2 and ERIC 2/ERIC 2.

The PEX6 gene encoded a protein with ATPase activity and essential for biogenesis of peroxisomes (Birschmann *et al.* 2003). Therefore, it is not an intergenic sequence as the ERIC elements in bacteria have been defined. To check the presence of the ERIC elements in *S. cerevisiae*, we searched the consensus ERIC sequence of 44 nucleotides (Hulton *et al.* 1991) in the SGD. This search was not able to find this consensus sequence in the entire genome of *S. cerevisiae*.

3.3. Identification of indigenous strains

Forty colonies isolated from must and on the first day of fermentation were analysed for PCR-ISS, ERIC-PCR and REP-PCR.

Fig. 1. DNA fingerprints obtained by (a) PCR-ISS, (b) ERIC-PCR and (c) REP-PCR. Lanes: M, 100 bp DNA ladder (Gibco-BRL); 1, *S.bayanus* 1941; 2, *S.bayanus* 1969; 3, *S. cerevisiae* 1171; 4, WY pattern IV; 5, *I.terricola* 11139; 6, WY pattern III; 7, *C.stellata* 11046; 8, WY pattern I; 9, *H. uvarum* 11107; 10, WY pattern II; 11, *D.bruxellensis* 11024; 12, WY pattern V.



The patterns obtained with each technique were compared with those produced by yeast collection strains. Most patterns were the same or similar as those of some collection strains, which enabled the identification of the isolated yeasts. Each PCR technique yielded five different patterns which are named as wild yeast (WY) patterns I–V (Fig. 1).

Twenty-one colonies (WY pattern I) were identified as *C. stellata* because these colonies presented the same PCR-ISS and ERIC-PCR patterns as the *C. stellata* 11046 and 11109. As Fig. 1c shows the REP-PCR pattern was also the same as that of the *C. stellata* reference strains. Eight colonies (WY pattern II) showed the same ERIC-PCR and REP-PCR patterns as those of the *H. uvarum* reference strains and the same PCR-ISS pattern as that of the *H. uvarum* 11107. Four colonies (WY pattern III) showed similar PCR-ISS and ERIC-PCR patterns as those of the *I. terricola* 11139. As in the other isolates, the REP-PCR pattern also corresponded with that of the *I. terricola* reference strains. Three colonies (WY pattern IV) showed very similar PCR-ISS, ERIC-PCR and REP-PCR patterns as those of the *S. cerevisiae* reference strains. Finally, four colonies (WY pattern V) yielded a pattern, which did not present a strong resemblance to any of the patterns of the reference strains. We identified these colonies as *Dekkera bruxellensis* by RFLP of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal ITS (Guillamón *et al.* 1998; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). As can be seen in Fig. 1, although this pattern shared some amplified fragments with the pattern of the *D. bruxellensis* reference strains, the identification was not so easier as in the other patterns. The remainder patterns were also identified by the RFLPs of the ribosomal region and the result of this identification was exactly the same (data not shown).

4. DISCUSSION

Industry needs rapid, reliable and simple methods of yeast identification. Guillamón *et al.* (1998) and Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) proved the usefulness of the RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal ITS to identify yeast at the species level. Although this method is not particularly complex, it involves a two-step procedure: PCR amplification and restriction analysis of the amplified fragment. Other PCR techniques have achieved species identification or strain differentiation with a single PCR amplification. Most of these PCR techniques have exploited the presence of repetitive DNA sequences in the yeast genome such as microsatellites, delta elements of the Ty transposon and ISS. Similar extragenic repetitive sequences such as REP

and ERIC elements have also been used for DNA fingerprinting in various PCR bacterial species. The aim of this study was to test the usefulness of the oligonucleotides based on these bacterial repetitive sequences for yeast discrimination and identification. With the same aim in mind we also used oligonucleotides that anneal to *S. cerevisiae* ISS motifs. These primers have previously been used to identify yeasts of grape must and wine (De Barros Lopes *et al.* 1996, 1998).

As ERIC-PCR and REP-PCR have been described as useful tools for typing bacterial strains, we expected that they could be used for the same purpose in yeasts. However, contrary to what was expected, none of these techniques allow strain differentiation, only some strains can be readily distinguishable. Some of the strains in this study have previously been differentiated by RFLP of mitochondrial DNA and chromosomal karyotyping (Guillamón *et al.* 1994, 1997; Esteve-Zarzoso *et al.* 1999). However, all the species showed a different amplification pattern. Although some intraspecific polymorphism was detected, because the ERIC-PCR and PCR-ISS patterns were not identical for all the strains of the same species, these fingerprints showed enough species-specific bands to enable yeast identification. The REP-PCR technique did not display any intraspecific variability, so it may be ideal for yeast identification. However, care should be taken with this technique to avoid unspecific amplifications and problems of reproducibility. The partial degeneration of the REP oligonucleotides represented by some inosines in their sequences may lead to unspecific amplification.

As far as we know, this is the first time that the primers designed for the amplification of repetitive elements in bacteria have been successfully used in yeast. Therefore, this may be evidence that these repetitive sequences are present in yeast genomes. The *S. cerevisiae* fragment sequenced belonged to the ORF PEX6. None of the primer binding sites of the amplified fragments seems to be related with intergenic sequences. The ERIC consensus sequence, described previously (Hulton *et al.* 1991), was not located in the *S. cerevisiae* genome. When the BLAST search was

performed in the EMBL gene databank, this consensus sequence showed high homology only with bacterial genomes (specially with enterobacterial species). More fragments of *S. cerevisiae* and other species should be sequenced, but these preliminary data did not point to the presence of these repetitive intergenic sequences in yeast and the PCR patterns should be the result of a partial homology of the oligonucleotides with different sequences of the yeast genomes. In a recent study, Gillings and Holley (1997) compared the ERIC-PCR with a variant of the RAPD method and they reported that amplification in a target DNA by using the ERIC primers does not indicate the presence of ERIC sequences in this DNA. In our opinion, however, although these techniques can be compared with the RAPD as random amplification processes, except the REP-PCR, these techniques did not present the problems of reproducibility that are typically described in the RAPD method. Reproducibility is higher probably because the annealing temperature of the primers is higher with these techniques than with the RAPD method and these primers are also longer.

Using these PCR techniques to the colonies isolated from natural grape must proved that they are useful for yeast identification. Although the reference strains showed a certain degree of intraspecific polymorphism with the PCR-ISS and ERIC-PCR techniques, the indigenous strains belonging to the same species yielded the same pattern. Moreover, this pattern was identical or similar to a pattern previously described for some reference strain. For instance, all the colonies identified as *C. stellata* displayed the same PCR-ISS and ERIC-PCR pattern as that observed for the strains CECT 11046 and CECT 11109. But we also detected a *D. bruxellensis* pattern which did not correspond with any pattern of the reference strains. Therefore, further studies should be performed with more strains of different origins and with more molecular markers to check whether these associations below species level correspond with a closer phylogenetic or taxonomic proximity.

From the point of view of yeast diversity, *C. stellata* was the predominant species in the grape must and on first day of fermentation. This result has been widely observed in several studies carried out in this cellar (Constantí *et al.* 1997; Beltran *et al.* 2002). These studies also proved the importance of *H. uvarum* in the first days of the winemaking process. We had also previously isolated *I. terricola*, but this was the first study in which we isolated *D. bruxellensis* from the must or in the first days of alcoholic fermentation. This species, and its anamorph form *Brettanomyces bruxellensis*, is an absolute nightmare for winemakers because it is involved in spoilage by off-flavour production in ageing wines in oak barrels (Pretorius 2000). As in previous studies, *S. cerevisiae*, the main responsible of the alcoholic fermentation, was isolated in very low number at the beginning of the process (Constantí *et al.* 1997; Beltran *et al.* 2002). An additional advantage of these techniques is that the sibling species *S. cerevisiae* and *S. bayanus*, both of oenological importance, are clearly differentiated with the three PCR techniques.

In conclusion, PCR amplification using primers derived from these repetitive sequences did not yield strain-specific banding patterns within selected species but provided species-specific banding patterns. All three techniques are useful for rapid, simple and relatively cheap yeast identification. That is of great interest for winemakers who cannot arrange sophisticated methods for routine work. We are currently using these techniques to monitor yeast diversity during industrial wine fermentation with consistent and relevant results.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants AGL2001-0467 and AGL2000-0205-P4-03 from the *Comision Interministerial de Ciencia y Tecnología*, Spain. The authors wish to thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

5. REFERENCES

- Barnett, J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., García, M. D. and Querol, A. (1997) Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 397-408.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 287-293.
- Birschmann, I., Stroobants, A. K., van den Berg, M., Schafer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W. H. and Tabak, H.,F. (2003) Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 2226-2236.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. and Guillamón, J. M. (1997) Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 339-344.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4514-4520.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 279-286.
- Deák, T. and Beuchat, L. R. (1996) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 329-337.
- Gallego, F. J., Pérez, M. A., Martínez, I. and Hidalgo, P. (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 350-351.
- Gillings, M. and Holley, M. (1997) Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 17-21.
- Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T. and Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 708-714.
- Guillamón, J. M., Barrio, E. and Querol, A. (1996) Characterization of wine yeast strains of *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic origin. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 122-132.
- Guillamón, J. M., Sánchez, I. and Huerta, T. (1997) Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiology Letters* **147**, 267-272.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* **169**, 387-392.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C. and Dujon, B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 551-559.

- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. and Sharp, P. M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* **5**, 825-834.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 403–405.
- Kurtzman, C.P. and Fell J.W. (1998) *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C.P. and Robnett C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
- Lavallée, F., Salvat, Y., Lamy, S., Thomas, D. Y., Degré, R. and Dulau, L. (1994) PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 86-91.
- Marshall, S., Clark, C. G., Wang, G., Mulvey, M., Kelly, M. T. and Johnson, W. M. (1999) Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2473-2478.
- Nachamkin, I., Panaro, N. J., Li, M., Ung, H., Yuen, P. K., Kricka, J. and Wilding, P. (2001) Agilent 2100 Bioanalyzer for Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *Campylobacter jejuni* Flagellin Gene. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 754-757.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. and Murooka, Y. (2001) Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 986-990.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieau, D., Aigle, M. and Dulau, L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**, 89-94.

- Panaro, N. J., Yuen, P. K., Sakazume, T., Fortina, P., Kricka, L. J. and Widing, P. (2000) Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clinical Chemistry* **46**, 1851-1853.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 439-446.
- Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosome. *Nucleic Acids Research* **18**, 6503-6508.
- Török, T., Rockhold, D. and King, A. D. (1993) Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 63-80.
- Vaughan Martini, A. and Martini, A. (1987) Taxonomic revision of the yeast genus *Kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 380-385.
- Ventura, M. and Zink, R. (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* **217**, 141-154.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823-6831.
- Versavaud, A. and Hallet, J. N. (1995) Pulsed-field gel electrophoresis combined with rare-cutting endonucleases for strain identification of *Candida famata*, *Kloeckera apiculata* and *Schizosaccharomyces pombe* with chromosome number and size estimation of the two former. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 303-309.

- Veizinet, F., Blondin, B. and Hallet, J. N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 568-571.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications. In *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. pp.315-322. San Diego: Academic Press.

CAPÍTOL 2

Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentations: Effect of grape ripeness and cold maceration

Núria Hierro, Ángel González, Albert Mas and José M. Guillamón

Unitat d'Enologia, Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments (CeRTA).

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili.

Marcelí Domingo. Tarragona, Spain.

FEMS Yeast Research 6, 102-111 (2006)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

1. INTRODUCTION

Alcoholic fermentation is a complex microbial process that is characterized by a succession of different species of yeasts (Fleet, 1993). Yeasts with low fermentation activity, such as *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. and *Kluyveromyces* spp., are predominant in grape musts and during the early stages of fermentation. Subsequently, *Saccharomyces cerevisiae* proliferates and will dominate and complete the wine fermentation (Ribéreau-Gayon, 1985; Fleet & Heard, 1993). In our previous studies in the same cellar, the same pattern of yeast growth was always detected. The apiculate yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Candida stellata* were the dominant species at the beginning of the process, to be replaced after a few days by *S. cerevisiae* (Constanti *et al.*, 1997, 1998; Beltran *et al.*, 2002). The dominance of this fermentative species in the middle and final stages of the process was so overwhelming that it was highly unlikely that other non-*Saccharomyces* spp. would be isolated. Non-*Saccharomyces* spp. can contribute to the aroma properties and chemical composition of the resulting wine because more secondary metabolites are produced, which contribute to the taste and flavour of the wines (Mateo *et al.*, 1991; Soden *et al.*, 2000). Some authors have even reported that these yeasts produce extracellular enzymes that may be responsible for providing the wine with properties unique to the region of its production (Rosi *et al.*, 1994; Charoenchai *et al.*, 1997; Pretorius *et al.*, 1999). In our opinion, however, a question that remains unanswered in most yeast studies is to what extent these minor species contribute to the total yeast population during wine fermentation.

The growth of these yeasts during wine fermentations is influenced by factors such as the temperature of fermentation, pH and nutrients of the must, and winemaking practices (SO₂ treatment, yeast inoculation, maceration, etc.) (Pretorius, 2000). In this study, we have evaluated how the growth dynamics of these non-*Saccharomyces* spp. are affected by new winemaking

practice of cold maceration, and by grape maturity. The wine industry has become increasingly interested in the use of cold maceration prior to fermentation because of its ability to enhance flavour complexity and extraction of colour (Parenti *et al.*, 2004). This technique consists of cooling the must to approximately 4°C for several days, thus delaying the onset of fermentation.

For this purpose, we used various molecular methods to selectively isolate and identify colonies of non-*Saccharomyces* spp. Recently, we proved that new PCR-based methods are useful for yeast identification (Hierro *et al.*, 2004). Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERICPCR) is based on the use of oligonucleotides that are complementary to repetitive elements described in bacteria (Sharples & Lloyd, 1990; Hulton *et al.*, 1991), and it has been previously applied in the study of clinical yeasts (Van Belkum *et al.*, 1994). PCR-intron splice sites (PCR-ISS) is based on the use of oligonucleotides complementary to the intron splice sites of yeasts (De Barros Lopes *et al.*, 1996, 1998). The species identifications with both techniques were further confirmed with two complementary techniques, namely the restriction analysis of the ITS1 and ITS2 regions and the 5.8S ribosomal RNA gene (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), and the sequencing analysis of the D1/D2 ribosomal region (Kurtzman & Robnett, 1998).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Yeast isolation

Wine fermentations were carried out in the experimental cellar of the Oenology Faculty in Tarragona during the 2002 vintage. In all the fermentations, the grape variety was Tempranillo, but with different degrees of maturation. Three different musts were obtained from grapes harvested at least one week apart. Table 1 shows the date of harvest, alcohol potential, total acidity and pH of the musts.

Table 1.Characteristics of the three Tempranillo musts with different degree of maturation

	Under-ripe	Ripe	Overripe
Date of harvest	Aug 8	Aug 19	Aug 28
Potential alcohol (%)	9.78	10.60	11.12
Density(g l ⁻¹)	1070	1075	1080
Total acidity (g l ⁻¹) ^a	8.14	6.71	5.63
pH	3.35	3.5	3.72

^aExpressed as g l⁻¹ of tartaric acid.

Our initial idea was to investigate musts of different ripeness, but unfavourable climatic conditions forced us to harvest early rather than obtain diseased grapes. Although none of these musts showed an excessive degree of ripening, we shall call them unripe, ripe and overripe in order to differentiate between them. Each must was separated into two tanks of 100 L and sulphited with 40 mg L⁻¹ of SO₂. In one of the tanks, the must was inoculated with the commercial wine yeast BDX (Lallemand S. A., Toulouse, France), and the fermentation was performed in the usual way for red wine. The must in the other tank, however, was subjected to cold maceration for 7 days by cooling to an average temperature of 4°C with solid CO₂. After this maceration period, the must was inoculated with the same commercial strain. Note that the sampling of all the musts (day 0) was done before the inoculation with the commercial *S. cerevisiae*. Therefore, six fermentation conditions were analysed: (a1) unripe and no cold maceration; (b1) unripe and cold maceration; (a2) ripe and no cold maceration; (b2) ripe and cold maceration; (a3) overripe and no cold maceration; and (b3) overripe and cold maceration.

Samples for the isolation and identification of yeasts were taken from each vinification at different stages: must; during the cold maceration (days 1 and 4); on the first day of fermentation; in the middle of fermentation (density 1050–1040 g L⁻¹); and at the end of the fermentation (density

995–993 g L⁻¹). Several dilutions of each sample were plated on two different media: a non-selective YEPDagar medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose and 2% agar, w/v; Cultimed, Barcelona, Spain); and a selective lysine-agar medium (Scharlau, Barcelona, Spain) which does not support the growth of *Saccharomyces* spp. (Angelo & Siebert, 1987). Twenty colonies were randomly isolated and purified from the lysine-agar plate for further identification.

2.2. DNA extraction

After overnight growth in YEPD medium in a 1.5-mL Eppendorf tube, DNA was extracted according to Querol *et al.* (1992) and diluted to 1–50 ng mL⁻¹. The concentration and purity of DNA were determined using a GenQuant spectrophotometer (Pharmacia, Cambridge, UK).

2.3. PCR conditions

Analysis using PCR-ISS was carried out in 50- μ L final volume containing 2 μ L of DNA template, 50 pmol of primer EI1 (50-CTGGCTTGGTGTATG-30), 32 mM of each dNTP, 2.5mM MgCl₂ and 0.2U of Taq DNA polymerase (ARK Scientific, Darmstadt, Germany). The amplification conditions were 33 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 45°C for 2 min, and extension at 74°C for 5 min (De Barros Lopes *et al.*, 1996). ERIC-PCR amplification was carried out in 25- μ L final volumes containing 3 μ L of DNA template, 15 pmol of each respective primer (ERIC 1R 50-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-30, ERIC 2 50- AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-30), 100 mM of each dNTP, 5 μ L 5XGB Buffer (Tris-HCl 1M, pH 8.8, (NH₄)₂SO₄ 1M, MgCl₂ 1M, EDTA 0.5 M, pH 8.8, b-mercapto-ethanol 14.4 M), 0.2 μ L of BSA (20 mg mL⁻¹), 2.5 μ L of DMSO and 2.5U of Taq DNA polymerase (ARK Scientific) (González *et al.*, 2004). The PCR conditions were 30 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 1 min, and extension at 65°C for 4min. The ITS region and the 5.8S-rRNA gene were amplified as described previously (Guillamón *et al.*, 1998). All the amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.4. Restriction of amplified DNA

Five microlitres of the ITS/5.8S-rRNA gene amplified product were digested with the restriction endonucleases *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the supplier's instructions.

2.5. Agarose gel electrophoresis and microchip electrophoresis

The products of the PCR-ISS and ERIC-PCR were analysed by electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel in 1X TBE buffer, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A 100-bp DNA ladder marker (Gibco BRL, Eggestein, Germany) was used as the size standard. The ITS/5.8S rRNA gene amplicons were electrophoresed on a 1.2% (w/v) agarose gel, and the restriction fragments were separated on a 3% (w/v) agarose gel.

Sizing by electrophoresis was compared with automated capillary electrophoresis using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, Germany). The DNA 12 000 LabChip[®] kit is a microchip that was used to size the amplified products and their restriction fragments. The bioanalyzer separated nucleic acid fragments by capillary electrophoresis in this microchip and automatically detected and sized these fragments. The instrument was equipped with a fluorescence detection system that led to greater detection sensitivity, and the DNA sample size was estimated by comparison with external standards (DNA sizing ladder; Agilent Technologies) and internal standards (DNA markers, Agilent Technologies), thus providing accurate and reproducible sizing (Panaro *et al.*, 2000; Nachamkin *et al.*, 2001).

2.6. Sequencing of the D1/D2 domain

The partial 26S-rRNA gene sequences (D1/D2 domains) were amplified using primers NL-1 (50-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-30) and NL-4 (50- GGTCCGTGTTTCAA GACGG-30) (Kurtzman & Robnett, 1998). PCR fragments were purified with the GFX[™] PCR DNA and Gel

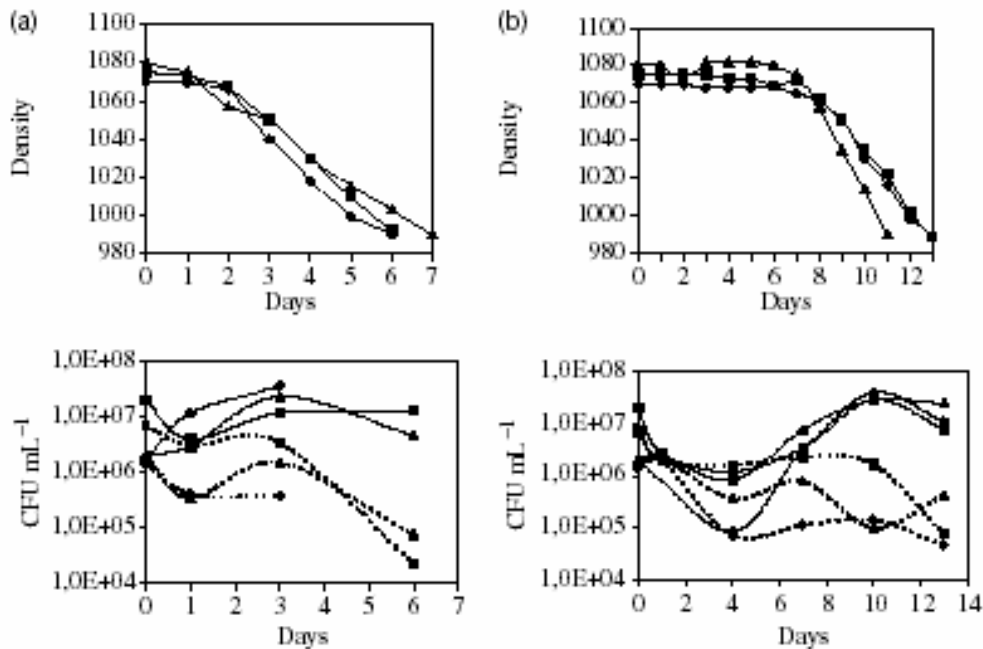
Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). DNA sequencing was performed using the ABIPrism 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) and the Prism Ready Reaction Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The BLAST search (Basic Alignment Search Tool, <http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>) was used to compare the sequences obtained with databases of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL). We considered identification to be correct when gene sequences showed identities of 98% or higher.

3. RESULTS

3.1. Fermentation kinetics and yeast counts

The fermentation kinetics were similar in the three musts with different degrees of ripening. The overripe fermentation ended slightly later. In all three fermentations, a slow beginning of the fermentation was detected, probably as a consequence of SO₂ addition (Fig. 1a). Cold maceration was effective at inhibiting the sugar consumption or the beginning of fermentation. Density reduction only started after the end of cold maceration and the inoculation of the commercial *Saccharomyces cerevisiae* strain. After that, sugar consumption was very fast in all the fermentations. The overripe must fermented in 3 days, while the unripe and ripe musts took 5 days (Fig. 1b).

Fig. 1. Evolution of density (g L^{-1}) (—), total yeast population (—) and non-*Saccharomyces* population (---) during the different fermentation conditions (a: no cold maceration; b: cold maceration; ● unripe grape-must; ■ ripe grape-must; ▲ overripe grape-must)



The total number of yeasts was ten times higher in the ripe must than in either of the other two musts. In all three musts, the non-*Saccharomyces* represented more than 75% of the total yeast population. However, this percentage dropped sharply as fermentation progressed, and was not higher than 10% during the final stages of the alcoholic fermentations. Unexpectedly, cold maceration caused no significant differences in population sizes. During this process the percentages of non-*Saccharomyces* yeasts were similar to those of the must. When cold maceration finished, the size of the yeast population increased in favour of the *Saccharomyces* strains. This increase could be accounted for by the inoculation of the commercial *S. cerevisiae* strain at the end of the maceration period (day 7).

3.2. Yeast species diversity

A total of 521 colonies isolated from the six fermentations were identified in this study (Table 2).

Table 2.. Total diversity of non-*Saccharomyces* yeast isolated from the different wine fermentations

Species	%	No of isolates	Intraespecific diversity	
			No of patterns obtained	No of patterns obtained
			by PCR-ISS	by ERIC-PCR
<i>C.stellata</i>	49.5	258	2	2
<i>H.uvarum</i>	24.4	127	4	1
<i>H.osmophila</i>	15.2	79	1	1
<i>Z.bisporus</i>	3.1	16	1	1
<i>I.orientalis</i>	2.5	13	1	1
<i>I.terricola</i>	1.7	9	2	2
<i>C.diversa</i>	1.5	8	1	1
<i>Z.hellenicus</i>	0.8	4	1	1
<i>I.hanoiensis</i>	0.6	3	1	1
<i>C.tropicalis</i>	0.6	3	1	1
<i>I.occidentalis</i>	0.2	1	1	1

These colonies were selectively isolated to prevent *Saccharomyces* strains from growing. Eleven species were identified, belonging to five genera. Half of the isolates were ascribed to *Candida stellata*. *Hanseniaspora uvarum* and *H. osmophila* were the second and third major species identified. Together the isolates of these three species accounted for 89% of the total identified colonies. The other isolates we identified belonged to an array of minor species belonging to the genera *Candida*, *Issatchenkia*, *Zygoascus* and *Zygosaccharomyces*.

3.3. Identification methods used

All the colonies were first identified by the recently reported methods for yeast identification, PCR-ISS and ERIC-PCR (Hiero *et al.*, 2004). In the present study, we obtained a total of 16 and 13 different patterns by PCR-ISS and ERIC-PCR, respectively. Most of them, however, did not correspond to any of the patterns of the reference strains characterized previously (Hiero *et al.*, 2004). The PCR-ISS technique ascribed four of these patterns to *H. uvarum*, two to *C. stellata* and two to *Issatchenkia terricola*. The ERIC-PCR technique ascribed two patterns each to *C. stellata* and *I. terricola* strains, but only a single pattern to all the *H. uvarum* strains investigated (Table 2). Using our previous work, we were not able to identify the remaining eight patterns. We then used the restriction analysis of the ITS 1 and ITS2 regions and the 5.8S-rRNA gene to identify these patterns (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). In this case, 11 patterns were obtained, which were shown to be characteristic of the 11 species that were finally identified. No intraspecific variability was detected. With this restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique, we confirmed that the patterns previously ascribed to *H. uvarum*, *C. stellata* and *I. terricola* had been correctly identified, and we were able to identify the patterns of *C. diversa*, *C. tropicalis*, *H. osmophila*, *Zygoascus hellenicus* and *Zygosaccharomyces bisporus* according to the published database (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). However, the patterns of *I. hanoiensis*, *I. occidentalis* and *I. orientalis* had not been reported and, obviously, we were not able to identify these species. Strains with these patterns were identified by sequencing analysis of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene. For the *I. hanoiensis* pattern, we also performed an extra RFLP analysis of the region spanning the ITS-5.8S-D1/D2 domains as proposed by Thanh *et al.* (2003). The restriction pattern obtained perfectly matched the one described by these latter authors, confirming that the identification was correct (data not shown). Likewise, several colonies of strains belonging to each one of the patterns obtained were also sequenced, and the analysis of the D1/D2 region sequences confirmed their identification. The D1/D2 sequences of the strains of the same species were identical, regardless of whether they

had shown intraspecific variability with the previous techniques. Table 3 shows the sizes of the PCR-ISS and ERIC-PCR banding patterns and the restriction fragments of the 5.8S/ITS region of all the species identified.

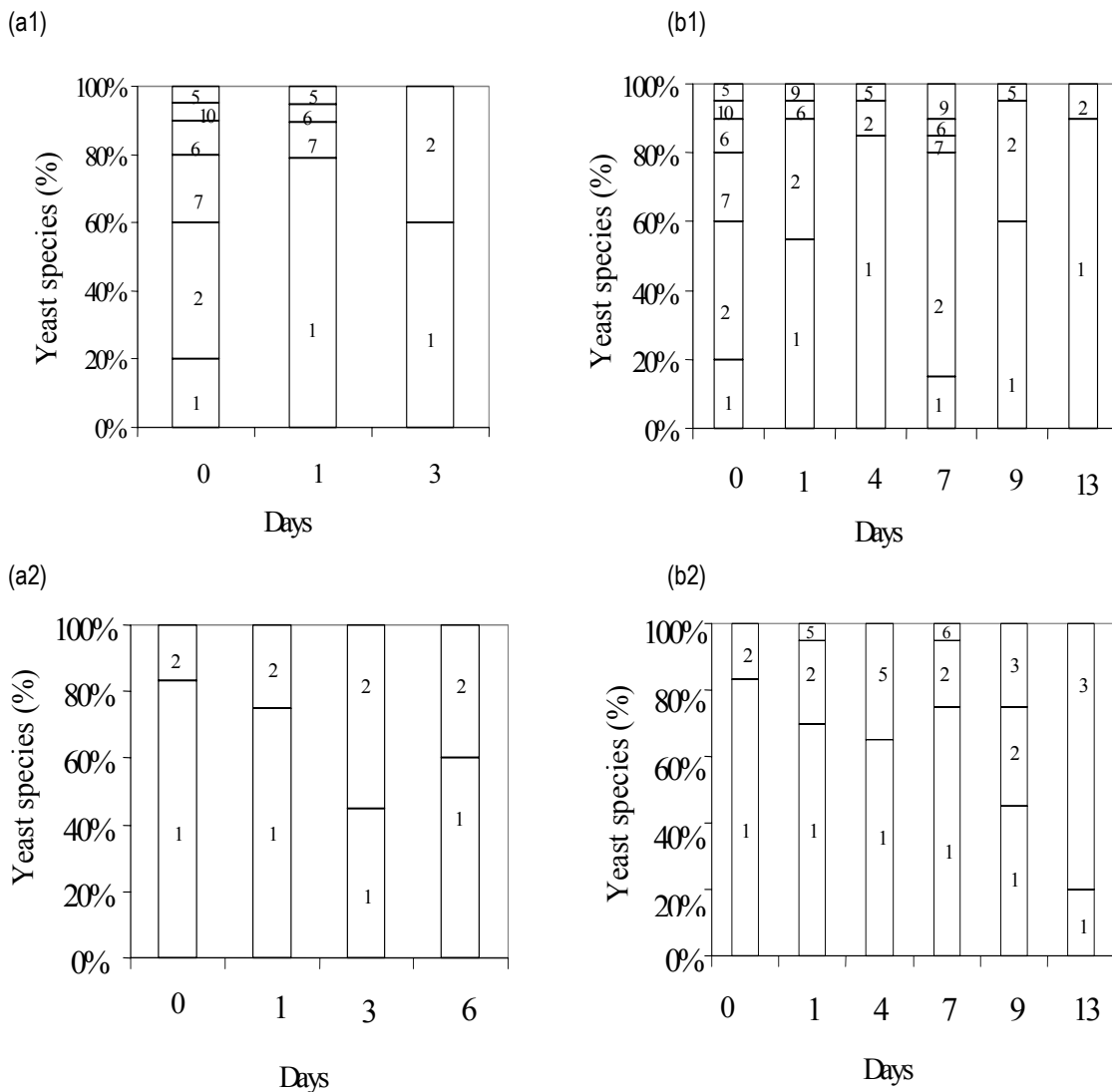
Table 3. Sizes of the PCR-ISS and ERIC-PCR banding patterns and the restriction fragments of the 5.8S/ITS region. AP, amplified product

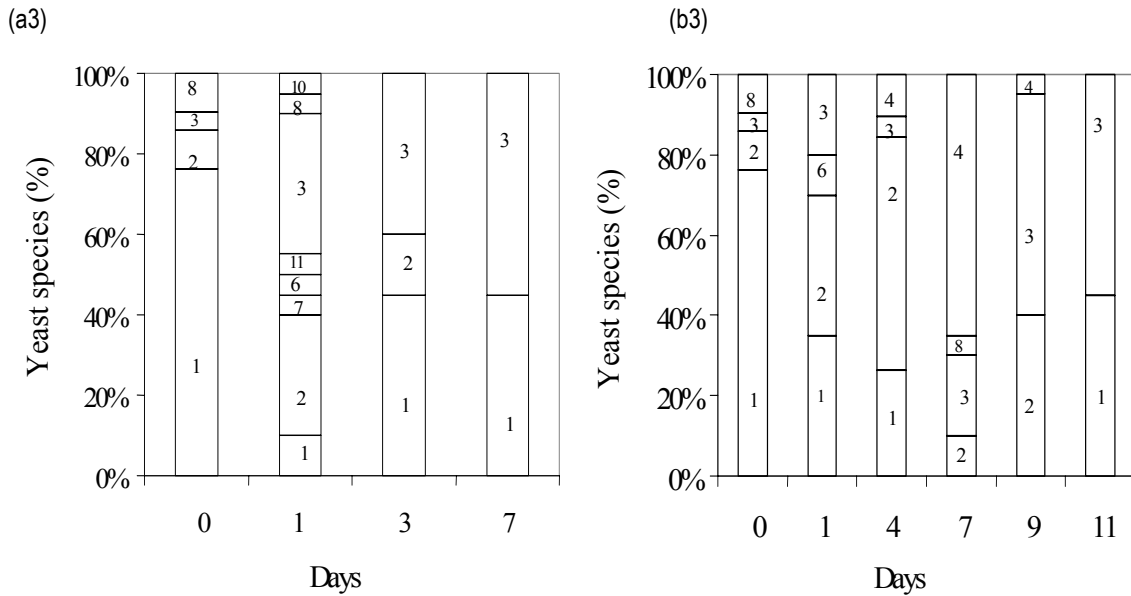
Species	RFLP-PCR				PCR-ISS Fragments (bp)	ERIC-PCR Fragments (bp)
	AP (bp)	Restriction fragments (bp)				
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinII</i>		
<i>C. diversa</i>	450	160+100+100+90	410	220+200	190+230+300+390+400+650+750	350+420+700+870+1000+1100+1350
<i>C. stellata</i>	475	215+110+80+60	475	235+235	285+630+875+900+980+1150+1500 460+590+630+950+1300+1750	350+420+450+700+900+1100+1400+1700 270+700+900+1400+1500
<i>C. tropicalis</i>	550	280+250	450+90	270+270	500+650+720+800+900+950+1550	300+390+700+820+950
<i>H. osmophila</i>	750	275+150+135+95+75	460+120+90+80	390+360	390+790+850+1250+1500	420+520+700+1050+1100
<i>H. uvarum</i>	750	320+310+105	750	350+200+180	370+500+620+1050+1350+1500 370+450+500+730+1050+1250+1250+1350+1500 370+450+470+500+620+730+1050+1350+1500 370+450+500+620+730+1050+1350+1500	340+480+500+590+700+1050+1350+1500
<i>I. hanoiensis</i>	450	150+120+90	300+150	250+210	250+550+750+850+900+1050+1350	450+550+700+850+1000
<i>I. terricola</i>	450	130+100+90+85+45	290+125	240+105+105	320+580+660+750+820+875+980+1150+1350 470+880+990+1100+1250+1450	400+1000+1090+1550+2000 340+400+700+1000+1250+1550+2000
<i>I. occidentalis</i>	450	220+105	300+90	280+110	550+680+800+1000+1200+1350+1500	240+250+350+450+500+580+630+690+830+1300
<i>I. orientalis</i>	450	205+190+95	390+95	210+170	370+500+580+600+630+900+1000+1450	450+500+550+750+850+1050+1550
<i>Z. bisporus</i>	790	300+275+110+90	690+100	390+225+150	580+690+820+1500	390+570+890+900+1100+1300+1350
<i>Z. hellenicus</i>	650	325+325	625	350+170+130	350+500+590+720+780+1000+1250	150+350+370+500+900+980+1050+1250+1500

3.4. Effect of ripeness on yeast population

The distribution of the various non-*Saccharomyces* species throughout the six fermentations is shown in Fig. 2.

Fig. 2. Evolution of yeast species during the different fermentation conditions (1 *C. stellata*; 2 *H. uvarum*; 3 *H. osmophila*; 4 *Z. bisporus*; 5 *I. orientalis*; 6 *I. terricola*; 7 *C. diversa*; 8 *Z. hellenicus*; 9 *C. tropicalis*; 10 *I. hanoiensis*; 11 *I. occidentalis*).





(a1: unripe and no cold maceration; b1: unripe and cold maceration; a2: ripe and no cold maceration; b2: ripe and cold maceration; a3: overripe and no cold maceration; b3: overripe and cold maceration).

The predominant species and the diversity of species changed with the degree of ripeness. The predominance of *C. stellata* in the must increased with the ripeness of the grape. *Candida stellata* and *H. uvarum* were the major species occurring in the must, along with a variety of minor species. Only in the case of unripe grape must did these minor species, such as *C. diversa* and *Issatchenkia* spp., represent a large percentage of the identified colonies. In contrast, in the overripe grape must this percentage of minor species was much lower, and the species were identified as *H. osmophila* and *Z. hellenicus*. The selective pressure brought about by the alcoholic fermentation arising from ethanol production, nutrient depletion, etc. favoured the predominance of *C. stellata* and *H. uvarum* even more. These species were the only ones isolated between the middle and the end of the fermentation, with the exception of *H. osmophila*. This species was isolated only from the overripe grape must and, in this context, increased its

presence throughout the fermentation and by the end of the process was the predominant non-*Saccharomyces* spp.

3.5. Effect of cold maceration on yeast population

The same grape musts with different degrees of ripeness were subjected to cold maceration for 7 days. This cold maceration prevented the fermentation from beginning but kept yeast viability at a high level (Fig. 1). The total yeast and the non-*Saccharomyces* yeast populations were almost of the same size. Apparently the cold maceration did not increase the proportion of *Saccharomyces* colonies. Although the cold maceration process did not change the predominance of *C. stellata* and *H. uvarum*, the minor species were isolated more frequently during this process. However, the alcoholic fermentation again selected and increased the abundance of *C. stellata*, *H. uvarum* and *H. osmophila*. The latter species was the major species by the end of the alcoholic fermentations of the ripe and overripe grape musts (Fig. 2).

4. DISCUSSION

The wine industry is continuously searching for new technological practices to improve wine quality. As these practices can modify yeast microbiota, it is interesting to analyse community changes, because these changes affect the quality of the final product. In the same cellar, a previous study had analysed the effect of two other widespread practices, namely SO₂ addition and yeast inoculation, on the yeast community (Constanti *et al.*, 1998). In the present study, we analysed the influence of grape ripeness and cold maceration on the diversity and development of non-*Saccharomyces* yeast species throughout fermentation. The cold maceration of red grape musts is a recently developed technique that has been shown to improve the analytical and sensory characteristics of wines as the result of a better extraction of polyphenolic compounds (Parenti *et al.*, 2004). Although there were some differences in the proportions and persistence of yeasts, a similar array of yeast species was observed in all the fermentation conditions.

The changes in the diversity and development of species during alcoholic fermentation have been extensively studied. Most studies have documented the predominance of the non-*Saccharomyces* yeasts in the initial stages of fermentation and the favourable effect that the selective pressure has on the most efficient fermentative species, *S. cerevisiae* (Pretorius, 2000). This predominance of *Saccharomyces* strains during the middle and final stages of fermentation generally prevents other species from being isolated, which gives the impression that the process is exclusively carried out by this species. However, the current application of direct molecular methods for ecological analysis has revealed the tremendous diversity of microorganisms, not previously detected by plating methods, in various habitats (Pace, 1997). In this study we used a culture method, but the colonies identified were isolated using a selective medium that prevents *Saccharomyces* yeasts from growing.

Non-*Saccharomyces* yeasts may affect wine fermentation both directly, by producing off-flavours, and indirectly, by modulating the growth or metabolism of the dominant *Saccharomyces* population (Mills *et al.*, 2002). *Candida stellata* was the predominant non-*Saccharomyces* spp. Previous studies have already reported the predominance of this species in the first stages of the fermentation in this cellar (Constanti *et al.*, 1997, 1998; Beltran *et al.*, 2002). The most interesting enological characteristic of this species is that it is highly fructophilic (Mills *et al.*, 2002). Ciani and Ferraro (1998) demonstrated that mixed fermentations containing *C. stellata* and *S. cerevisiae* exhibited more complete utilization of sugars, and postulated that this was caused by the preferential utilization of fructose by *C. stellata*. This means that this yeast is a biotechnologically important microorganism that can be used in mixed cultures with *S. cerevisiae* for stuck fermentations. Our results also support the association of this yeast with overripe and botrytized grape berries (Rosini *et al.*, 1982; Jackson, 2000), because its proportion in the must increased with the grape ripeness.

Hanseniaspora uvarum has also been widely reported as a major non-*Saccharomyces* yeast during the initial stages of wine fermentation (Pretorius, 2000). Some strains of this apiculate yeast have shown positive enological properties, and it has been suggested that they could be used in grape must fermentations to enhance the aroma and flavour profiles of the wines (Romano *et al.*, 2003). In our study, however, in some fermentation conditions other apiculate yeast species, such as *H. osmophila*, were more abundant than *H. uvarum* and *C. stellata*. There was a direct relation between high sugar concentration in the must (higher ripeness) and the presence of *H. osmophila*. The process of cold maceration also seemed to favour the increase of this species, which has always been considered as a species of minor importance, so the high proportion detected in our conditions is striking. Mills *et al.* (2002) compared the community analysis by traditional plating and by PCR-DGGE. They detected an active *H. osmophila* population of greater than 10^4 cells ml⁻¹ throughout fermentation with RT-PCR-DGGE analysis, a population that went unnoticed by the CFU analysis. As mentioned above, the high number of *Saccharomyces* strains may obscure the presence of non-*Saccharomyces* yeasts in the final stages of fermentation in the plating analysis. Granchi *et al.* (2002) compared the enological properties of *H. osmophila* with those of other *Hanseniaspora* spp. *Hanseniaspora osmophila* strains preferentially used glucose, unlike *H. uvarum* and *H. guilliermondii*, which are known to preferentially use fructose (Ciani & Fatichenti, 1999). *Hanseniaspora osmophila* was more ethanol-tolerant than *H. uvarum*. As for the secondary metabolites, *H. osmophila* strains yielded a lower concentration of glycerol and fusel alcohols than other apiculate yeasts, whereas the amounts of acetic acid and acetaldehyde were quite high and might affect the wine quality.

Although *C. stellata*, *H. uvarum* and *H. osmophila* were the major non-*Saccharomyces* species throughout the fermentations, the fact that minor species were isolated was remarkable because some of them had rarely been isolated previously from wine fermentations. *Zygosaccharomyces bisporus*, *Z. hellenicus* and *I. terricola* were isolated from the same cellar in a previous study

(Beltran *et al.*, 2002). However, the remaining *Issatchenkia* species have rarely been found in wine fermentations (Sabaté *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005). The case of *I. hanoiensis* is particularly interesting. This is a new yeast species discovered in the frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen (Thanh *et al.*, 2003), and it had never been isolated from other substrates.

The techniques of ERIC-PCR and PCR-ISS have been described previously as useful tools for typing bacterial and yeast strains, respectively (Versalovic *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1994; De Barros Lopes *et al.*, 1998). We used both techniques to differentiate yeast strains in our previous study (Hierro *et al.*, 2004). The fingerprints generated showed sufficient species-specific bands to make yeast identification possible, although some intraspecific polymorphism was detected. The application of these techniques in the present study shows that they can be useful for yeast identification. We also detected intraspecific polymorphism in strains of *H. uvarum*, *C. stellata* and *I. terricola*. This variability of patterns was clearly below the species level, because the sequences in the D1/D2 region did not distinguish between the isolates belonging to different ERIC-PCR and PCR-ISS patterns of the same species.

As already mentioned, the ultimate purpose of this work was to study the effect of grape maturity and cold maceration prior to alcoholic fermentation. Unfortunately, the climatic conditions did not allow us to obtain three very different grape musts, but we were able to draw some general conclusions. The higher the degree of ripeness, the higher the proportion of *C. stellata* in the grape must. *Z. hellenicus* and *H. osmophila* were only isolated from the overripe fermentation. Cold maceration seems to favour the presence of *H. osmophila*, *C. tropicalis* and *Z. bisporus*. The two latter species were only isolated from the unripe and overripe fermentations after cold maceration.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant (AGL2004-02307) from the Spanish Government. We thank John Bates from the Languages Services of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

5. REFERENCES

- Angelo, J. and Siebert, K.J. (1987) A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 45, 135-140.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.
- Charoenchai, C, Fleet, G.H., Henschke, P.A. and Todd, B.E.N. (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2-8.
- Ciani, M. and Fatichenti, F. (1999) Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 203-206.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 247-254.
- Clemente, J.M., Mingorance, L., Martínez, S., Las Heras, F.J. and Rodríguez, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21, 149-155.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. and Martinez, C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237-243.

- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. and Guillamón, J. M. (1997) Analysis of Yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Constantí, M., Reguant C., Poblet, M., Zamora F., Mas, A. and Guillamón, J. M. (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 169-175.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4514-4520.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 279-286.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.
- Fleet, G.H. (1993) The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Fleet, G.H. Ed.), pp 1-27. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeasts-growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Fleet, G.H. Ed), pp 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A. and Guillamón, J. M. (2004) Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 96, 853-860.

- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A. and Vicenzini, M. (2002) Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.* 2, 403-407.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Hierro, N., González, A., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2004) New PCR-based methods for yeast identification. *J. Appl. Microbiol.* 97, 792-801.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. and Sharp, P. M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 825-834.
- Jackson, R. S. (2000) Principles, Practice, Perception. In: *Wine Science*. San Diego, CA: Academic Press.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. and Pastor A. (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. and Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884-4893.
- Nachamkin, I., Panaro, N. J., Li, M., Ung, H., Yuen, P. K., Kricka, J. and Wilding, P. (2001) Agilent 2100 Bioanalyzer for Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *Campylobacter jejuni* Flagellin Gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 754-757.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276, 734-740.

- Panaro, N. J., Yuen, P. K., Sakazume, T., Fortina, P., Kricka, L. J. and Widing, P. (2000) Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clin. Chem.* 46, 1851-1853.
- Parenti, A., Spugnoli, P. Calamai, L., Ferrari, S. and Gori, C. (2004) Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 360-366.
- Pretorius I. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16, 675-729.
- Pretorius, I., van der Westhuizen, T. and Augustyn O. (1999) Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African J. Enol. Vitic.* 20, 61-74.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Ribéreau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Viticult.* 36, 1-10.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180.
- Rosi, I., Vinella, M. and Domizio, P. (1994) Characterization of β -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519-527.
- Rosini, G., Federici, F. and Martini, A. (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8, 83-89.
- Sabaté, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. and Guillamón, J.M. (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267-274.
- Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosome. *Nucl. Acids Res.* 18, 6503-6508.

- Soden, A., Francis, I. L., Oackey, H. and Henschke, P.A. (2000) Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21-30.
- Thanh, V.N., Hai, D.A. and Lachance, M.A. (2003). *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. *FEMS Yeast Res.* 4, 113-117.
- Van Belkum A, Boekhout T. and Bosboom R. (1994) Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J Clin Microbiol* 32:,2528–2532.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19, 6823-6831.

CAPÍTOL 3

Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription -QPCR (RT-QPCR) for detection and enumeration of total yeasts in wine

Núria Hierro, Braulio Esteve-Zarzoso, Ángel González, Albert Mas and José M. Guillamón

Unitat d'Enologia, Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments (CeRTA).

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili.

Marcelí Domingo. Tarragona, Spain.

Applied and Environmental Microbiology 72, 7148-7155 (2006)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ABSTRACT

Real-time, or quantitative, PCR (QPCR) has been developed to rapidly detect and quantify the total number of yeasts in wine without culturing. Universal yeast primers were designed from the variable D1/D2 domains of the 26S rRNA gene. These primers showed a good specificity with all the wine yeasts tested and they did not amplify the most representative wine species of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. Numerous standard curves were performed with different strains and species grown in YEPD medium or incubated in wine. The small standard errors with these replica proved that the assay is reproducible and highly robust. This technique was validated with artificially contaminated and natural wine samples. We also performed a reverse transcriptase QPCR (RT-QPCR) assay from rRNA for total viable yeast quantification. This technique had a low detection limit and was more accurate than QPCR because the dead cells were not quantified. As far as we know, this is the first time that RT-QPCR has been performed to quantify viable yeasts from rRNA. RT-QPCR is a rapid and accurate technique for enumerating yeasts during industrial wine fermentation and controlling the risk of wine spoilage.

1.INTRODUCTION

The wine industry needs rapid procedures for detecting and enumerating yeasts in order to monitor wine fermentation and detect contaminants. Traditional methods of yeast quantification rely on culturing (9). Although effective, these methods require several days and are therefore time-consuming. This is a problem for the winemaker because it means that decisions on wine processing are also delayed (20). Moreover, the presence of viable but non-culturable cells still makes it more difficult to detect all the metabolically active yeast cells in wine samples (18). In the last few years, researchers have used methods to directly identify yeasts from wine without the need for plating (5, 6, 14, 19, 20). Most of these methods rely on the direct amplification of yeast DNA from wine by PCR. Phister and Mills (20) highlighted two main advantages of the direct characterization of microorganisms over yeast enrichment and plating: first, regardless of their capacity to grow in a plate, all the yeast populations are detected and, second, analysis is fast. Because of its specificity and sensitivity, one of the most promising PCR techniques in food control is real-time, or quantitative, PCR (QPCR) (2). QPCR assays have been developed for detecting and enumerating various bacteria and fungi in food (1, 2, 10, 11). To date, this method has had limited application in the detection of microorganisms in wine (6, 17, 20, 21). With regard to yeasts, only the species *Dekkera bruxellensis* (or its anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) and *Saccharomyces cerevisiae* have been enumerated by QPCR in wine samples. The growth of *Dekkera* during the aging of wine in barrels or bottles is an absolute nightmare for the enologist. This yeast is involved in the production of volatile phenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol) and tetrahydropyridines, which are responsible for the unpleasant odors and tastes described as burnt plastic, smoky, horse sweat, leather and mousy (4, 6, 12). *S. cerevisiae* is the species of yeast with the highest fermentative capacity and is therefore the most important agent of alcoholic fermentation.

In our opinion, this method should be used to quantify other species of wine yeast. However, the wine industry is mostly interested in quantifying contaminant yeast, regardless of the species, in the wine before bottling. For this reason we have developed a QPCR assay for detecting and quantifying the total yeast population in a sample of wine. A possible problem with the direct use of microbial DNA from wine is the quantification of dead cells. The detection of RNA by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) is considered to be a better indicator of cell viability than the detection of DNA (23). We used a primer that was homologous to the 26S rRNA (15) in order to obtain its reverse transcription. We compared total yeast quantification using DNA as template with *Saccharomyces cerevisiae* quantification using RNA. As far as we know, this is the first time that RT-QPCR has been performed to quantify viable yeasts from rRNA.

The QPCR assays were first conducted on reference yeast strains from pure cultures to detect the specificity of the primers. We later validated this technique with artificially contaminated and natural samples of wine and, to determine effectiveness, compared the results with those obtained from plating.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Yeast isolation

The strains used in this study are listed in Table 1. All yeast strains were grown in YEPD media (1% yeast extract; 2% peptone and 2% glucose, w/v) at 28 °C. Yeast and bacterial strains were used to test the specificity of the primers (Table 1). Yeast strains *Candida stellata* 11046, 11110; *Dekkera bruxellensis* 1451^T, 1009; *Hanseniaspora uvarum* 1444^T, 11107 and *Saccharomyces cerevisiae* 1319, 1942^{NT} were specifically used to obtain the various standard curves.

2.2. Primer design.

Primers were designed by aligning of the variable D1/D2 domains of the 26S rRNA gene sequences from different yeast species. Sequences were obtained from the GenBank database

and alignment was performed with the Clustal W multiple sequence alignment (25). The final selection of the primers was performed using the ABI Primer Express program (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The BLAST search (Basic Alignment Search Tool, Internet address, <http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>) was used to check the specificity of each primer. The sequences of the universal-yeast primers were YEASTF 5'-GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC-3' and YEASTR 5'-TCTCTTTCCAAAGTTCTTTTCATCTTT-3', which produce a 124-bp fragment.

2.3. Specificity of PCR assays.

DNA samples from all yeasts were extracted according to Querol *et al.* (22). PCRs were carried out in 25 μ l final volume containing 5 μ l of DNA template (between 10 to 100 ng), 1 μ M of each respective primer, 100 μ M of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10X Buffer and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (ARK Scientific, Darmstadt, Germany).

The PCR conditions were an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. All amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The products of the PCR were analyzed by electrophoresis on a 3% (w/v) agarose gel in 1X TBE buffer stained with ethidium bromide and visualised under UV light. A 100 bp DNA Ladder marker (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) was used as the size standard.

2.4. DNA extraction for the QPCR assay.

Yeast cell suspensions were washed with sterile water and the pellets were resuspended in 700 μ l of AP1 buffer (DNeasy Plant minikit, Qiagen, Valencia, California) and transferred to a 2 ml conical-bottom microcentrifuge tube containing 1 g of 0.5 mm diameter glass beads. The tubes were shaken in a mini bead-beater (Biospec Products Inc., Bartlesville, Okla.) for 3 min at the

maximum rate and then centrifuged at 10,000 rpm for 1 min. The DNA in the supernatant was transferred to a sterile microfuge tube and purified using the DNeasy Plant minikit (Qiagen, Valencia, California) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Standard curves.

Standard curves were created by plotting the C_T (Cycle Threshold) values of the QPCR performed on dilution series of DNA or yeast cells (10^6 to 1 CFU ml⁻¹) against the log input cells ml⁻¹. Eight different strains belonging to four yeast species (as mentioned above) were serially diluted and used for the construction of the standard curves in YEPD, white wine and red wine.

A standard curve from RNA as template was also performed. Total RNA was isolated from pure culture of *S. cerevisiae* 1942^{NT} according to Sierkstra et al. (24). RNA was purified using a High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions and quantified using a GeneQuant spectrophotometer (Pharmacia, Cambridge, UK). A 10-fold dilution series of RNA isolated was prepared. cDNA was synthesised from each RNA dilution using primer NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (15) and Superscript™ II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a GenAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The protocol provided by the manufacturer was used. cDNA from each dilution was used as templates for QPCR assays in order to construct standard curves.

2.6. Artificial contaminated wine.

Different mixed cultures with known populations of *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *D. bruxellensis* were incubated for 24 h in Macabeo and Cabernet Sauvignon wine previously sterilised by filtration. These cultures were then serially diluted and their DNA was isolated and used in the QPCR reactions. These dilutions were also plated in YEPD-agar and incubated for 1 to 2 weeks

to obtain the number of CFU per milliliter. A WASP spiral plater (AES laboratorie, Combourg, France) was used for this CFU determination.

2.7. Natural fermentation samples.

Sampling was taken from two different wine fermentations (Malvasia for white fermentation and Cabernet Sauvignon for red fermentation) at different stages (must, middle fermentation (density 1050-1040 g l⁻¹) and final fermentation (density 1000-993 g l⁻¹)). Wine fermentations were carried out in the experimental cellar of the Enology Faculty in Tarragona during the 2005 vintage. Different samples of wine ageing in oak barrels were also analyzed. Each sample was plated on YEPD-agar and DNA was isolated and used in the QPCR reactions. RNA from wine samples was also isolated and used in the RT-QPCR reactions.

2.8. Quantitative PCR assays.

PCR amplification was performed in 25 µl final volume containing 5 µl of DNA or cDNA template, 0.2 µM of each respective primer and 12.5 µl of SybrGreen Master Mix (Applied Biosystems). All the amplifications were carried out in optical-grade 96-well plates on an ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with an initial step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15s, 60°C for 1 min and 72°C for 30s. Cycle threshold (C_T) was determined automatically by the instrument. All samples were analyzed in triplicate. The coefficients of efficiency (E) were calculated using the formula $E=(10^{-1/\text{slope}})-1$ (13). Confidence intervals were calculated by Student's *t* test with a significance level of 5% (7).

2.9. Heat inactivation of cultured *S. cerevisiae*.

The experiment was very similar to that one of Bleve et al. (2) with some modifications. An exponentially growing *S. cerevisiae* culture was diluted to a suspension containing 10⁵ CFU ml⁻¹. Heat treatment involved incubation of the dilution tube (5 ml) at 60°C in a water bath for 20 min.

Samples were taken during the treatment (after 10 min), at the end of the treatment, and during subsequent incubation at 25°C for 24 h (after 30 min and after 1, 12 and 24 h). Cell viability was analysed both by plate count and by fluorescence microscopy.

For the latter method, we used the commercial kit LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes, USA). The *BacLight* solution, which contained 100 μ M SYTO 9 and 600 μ M propidium iodide (PI), was mixed with an equal volume of the yeast solution. Sharp fluorescent images were produced with only 30 s of mixing. The intensities of SYTO 9 and PI were monitored at 480/500 nm and 488-540/617 nm respectively. Uptake of PI (orange/red fluorescence) indicated dead cells, while accumulation only of SYTO 9 (green fluorescence) indicated viable cells.

2.10. Statistical analysis.

The results were statistically analysed by one-way ANOVA and the Scheffé test from the statistical software package SPSS 13.0. The statistical degree of significance was set at $P < 0.05$. All the C_7 values are the average of at least three repetitions.

3. RESULTS

3.1. Primer design, specificity of PCR and sensitivity of QPCR.

The universal-yeast primers were designed from conserved sequences of the variable D1/D2 domains of the 26S rRNA gene. Sequences from virtually all known ascomycetous yeast species have been determined for this region (15), which facilitated the design and testing of the assays for species specificity. We determined the primer specificity by amplifying the yeasts and bacteria listed in Table 1 with the designed primers. A DNA fragment of the expected size was found with all the yeast species tested. However, these primers were not able to amplify DNA from other wine microorganisms such as lactic acid bacteria and acetic acid bacteria.

TABLE 1. Reference strains used in this study. Sources of strains are abbreviated as: CECT (Spanish Type Culture Collection, Universidad de Valencia), CBS (Centralalbureau voor Schimmelcultures, culture collection in Delft, the Netherlands), ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), MCYC (Microbiology Collection of Yeast Cultures, Universidad Politécnica de Madrid), IFI (International Fabricare Institute), LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium).

Microorganism	CECT Designation	Other designations	Isolation source	Yeast-specific PCR result
Yeasts				
<i>Candida boidinii</i>	1014 ^T	CBS 2428	Tanning fluid	+
	10029	MCYC 113	Milk	+
	10035	MCYC 124		+
			<i>Amygdalus communis</i>	
<i>Candida sake</i>	1044	CBS 617	Lambic beer	+
<i>Candida stellata</i>	11046	CBS 2649	Grape juice	+
	11110	CBS 843	Wine grapes	+
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1009	CBS 72	Lambic beer	+
	1451 ^T	CBS 74	Lambic beer	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1444 ^T	CBS 314	Muscat grape	+
	10389	MCYC 1857	Grape juice	+
	11105	CBS 2589	Grape must	+
	11106	CBS 5073	Wine grape	+
	11107	CBS 8130	Grapes	+
<i>Issatchenkia terricola</i>	11139	CBS 4715	Dregs of pressed grapes	+
	11176	CBS 2617	Soil	+
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1941 ^T	CBS 300	Beer	+

	1969	CBS 395	Juice of Ribes nigrum	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1171	CBS 1320	-	+
	1319	ATCC 26602	Sugar refinery	+
	1942 ^{NT}	CBS 1171	Beer	+
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1371	IFI 979	-	+
	1382	IFI 982	-	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>var. pombe</i>	1378	ATCC 24751	Millet beer	+
	1379	ATCC 26760	Grape must	+
	10685 ^T	CBS 356	-	+
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	1880	-	Wine	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11042	CBS 3014	Wine	+
	11043	CBS 4688	Grape must	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1230	CBS 741	Honey	+
	1232 ^T	CBS 732	Must of black grape	+
Bacteria				
<i>Acetobacter aceti</i>	298 ^T	ATCC 15973	wood of vinegar plant	-
<i>Gluconobacter oxydans</i>	360 ^T	LMG 1408 ^T	Beer	-
<i>Gluconobacter oxydans</i>	-	LMG 1414	Grapes	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	LMG 1553	Spoiled beer	-
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	-	LMG 1527 ^T	Vinegar	-
<i>Oenococcus oeni</i>	217 ^T	ATCC 23279	Wine	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	220	ATCC 8014	Corn silage	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	216	LMG 11401	Beer	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	4786 ^T	ATCC 8290	Wine	-
<i>Pediococcus parvulus</i>	813 ^T	ATCC 19371	Silage	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4695 ^T	ATCC 33316	Beer	-

To determine the sensitivity and detection limits of the QPCR, DNA obtained from an *S. cerevisiae* culture with a concentration of 10^6 CFU ml⁻¹ was serially diluted 10-fold. Each DNA dilution was used to construct a standard curve (Fig. 1). The assay was linear over 5 orders of magnitude and the detection limit was approximately 10^2 CFU ml⁻¹.

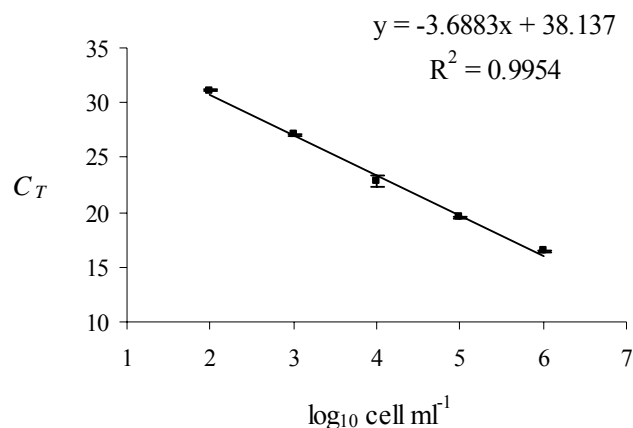


FIG. 1. Standard curve obtained from serially diluted *Saccharomyces cerevisiae* pure genomic DNA. C_T values are the average of three repetitions. Bars represents standard errors.

This result was lower than those of similar previous assays in which linearity was over six orders of magnitude (2, 17, 20). The lack of linearity of the samples at low cell concentrations is due to the fact that the non-template samples used as controls in the QPCR assay showed positive signals (C_T values of approximately 36). This was probably due to an accumulation of dimers of oligonucleotide primers to which SYBR Green molecules bound. The melting curve obtained for this non-specific product was different from that of the correct amplicon (results not shown). These C_T values of the non-template controls overlapped with the C_T value obtained for concentrations in cell number below 10^2 CFU ml⁻¹.

3.2. Quantification of total yeasts by QPCR.

A total of 8 individual standard curves were performed with different strains and species grown in YEPD medium in independent experiments. Likewise, 4 individual standard curves were constructed with different strains and species incubated in white wine and the same number in red wine. From these individual curves, we constructed a general standard curve for each matrix used (Figure 2).

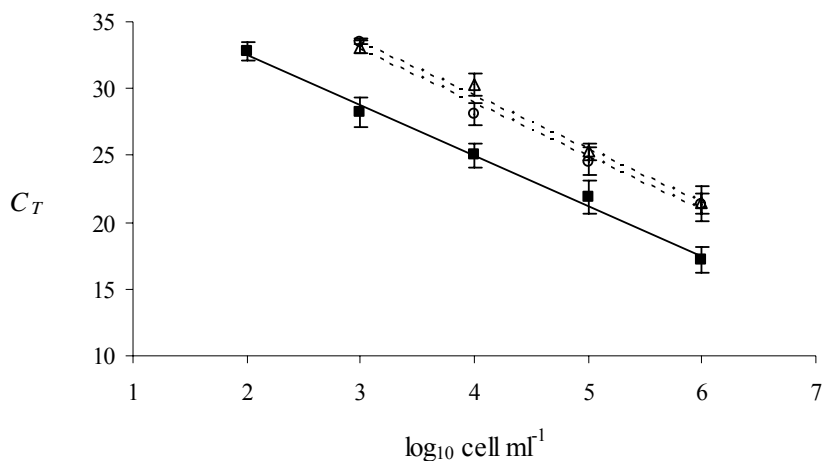


FIG. 2. Total-yeast standard curves obtained by QPCR from 10-fold serial dilution of *Candida stellata*, *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* grown in YEPD media (■, —) and incubated in white wine (○, ---) and red wine (△, ···). Correlation coefficient (R^2) values, slope and efficiency are shown in table 2. Detection limit was 10^2 and 10^3 cells ml^{-1} for YEPD media and wine, respectively. C_T values of standard curves from YEPD media, white wine and red wine are the average of eight, four and four individua

The small standard errors of these curves proved that all the strains were similarly useful for generating a standard curve. The correlation coefficients, slopes and efficiencies of the amplification for the standard curves are shown in table 2.

TABLE 2. Correlation coefficient (R^2), slope and efficiency of standard curves obtained from serial dilutions of yeast cells grown in YEPD media and yeast cells incubated in white and red wine.

^a Efficiency was estimated by the formula $E=(10^{-1/\text{slope}})-1$.

* represents statistically significant differences ($P < 0.05$)

Assay	R^2	Slope	Efficiency ^a (%)
Yeast cells from YEPD	0.9651±0.04	-3.374± 0.11*	98.01± 4.34*
Yeast cells from white wine	0.9710 ± 0.02	-4.003 ± 0.29	78.27 ± 7.46
Yeast cells from red wine	0.9742 ± 0.01	-3.984 ± 0.35	79.02 ± 9.11

The presence of the cells in a complex matrix such as wine influenced the amplification efficiency. Some major compounds of wine, such as polyphenols, are known to have an inhibitory effect on the PCR reaction. However, these compounds did not seem to be the main inhibitors of the amplification process because the efficiency in red wine, which has a much higher proportion of polyphenols, was very similar to that in white wine. Other possibility is that wine matrix interfered with the process of DNA extraction and purification. As a result of this decrease in the efficiency of amplification from cells incubated in wine, the C_T values were higher for the same cell concentration and the detection limit in wine was one log unit lower than those obtained by cells grown in YEPD.

We also tested the impact of a large amount of non-target DNA coming from other wine microorganisms (lactic acid bacteria and acetic acid bacteria) on the QPCR assay. For this purpose, *S. cerevisiae* cells (target microorganism) were serially diluted and supplemented with 10^6 cells of lactic acid bacteria ml^{-1} or 10^6 cells of acetic acid bacteria ml^{-1} (non-target microorganisms). The C_T value obtained for each dilution (with or without contaminating DNA) are shown in table 3. Statistical treatment by ANOVA test did not show significant differences in the

C_T obtained for the same dilutions with or without contaminating DNA. These results suggest that samples containing other non-target wine microorganisms did not significantly impact the QPCR assay.

TABLE 3. Determination of the C_T value for a dilution series of *S. cerevisiae* cells without or with the presence of 10^6 cells of lactic acid bacteria ml^{-1} (LAB) or 10^6 cells of acetic acid bacteria ml^{-1} (AAB).

\log_{10} yeast cells ml^{-1}	C_T determination		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> plus LAB	<i>S. cerevisiae</i> plus AAB
6	$19,4 \pm 0,7$	$19,5 \pm 0,5$	$18,4 \pm 0,3$
5	$22,3 \pm 0,1$	$22,5 \pm 0,2$	$21,5 \pm 0,4$
4	$25,3 \pm 0,4$	$25,2 \pm 0,1$	$24,5 \pm 0,2$
3	$29,4 \pm 0,1$	$29,1 \pm 0,1$	$29,1 \pm 0,3$
2	$31,3 \pm 0,,3$	$31,5 \pm 0,,3$	$30,6 \pm 0,,5$

The same white and red wines used for the standard curves were artificially contaminated with different mixtures of *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *D. bruxellensis* ranging from 10^4 to 10^7 CFU ml^{-1} . After 24 h of incubation, the samples were analyzed by QPCR. Results obtained from mixed cultures were compared to the standard curves generated from wine. The effectiveness of the quantification of the method was tested by correlating the cell number concentration estimated by the plate count in YEPD and QPCR (Figure 3). The results showed that the numbers obtained by QPCR did not differ significantly from those measured by plating.

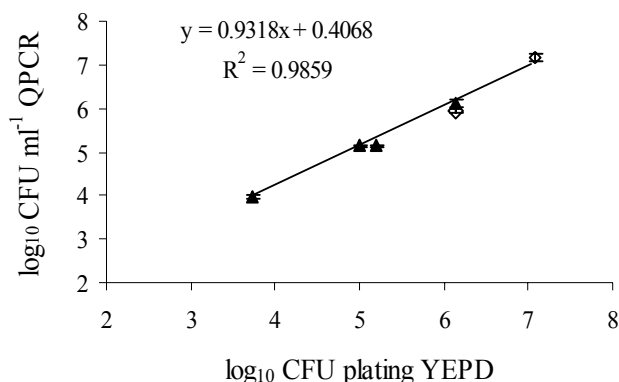


FIG. 3. Relationship between results of yeast quantification by QPCR and plating of artificially contaminated white wine samples (◇) and red wine samples (▲). C_T values are averages of results from three replicates. Bars represents standard errors.

We also analyzed natural samples during and after alcoholic fermentation. Sampling was taken from two different wine fermentations (Malvasia for white fermentation and Cabernet Sauvignon for red fermentation) at different stages (must, middle fermentation and final fermentation) and sampling was also taken from wine ageing in an oak barrel. Each sample was plated on YEPD-agar and DNA was isolated and quantified by QPCR. The correlation between the enumeration of the fermentation samples by QPCR and by plating was good (Table 4). Conversely, the enumeration of the oak barrel sample by QPCR was higher than the enumeration by plating as a result of viable but non-culturable yeasts or, more likely, to the presence of dead cells in the sample.

TABLE 4. Quantification of yeast populations in samples during and after alcoholic fermentation by plating and QPCR. ^a Middle fermentation (density 1050-1040 g l⁻¹); ^b Final fermentation (density 1000-993 g l⁻¹); * represents statistically significant differences with plating ($P < 0.05$)

		Plating (CFU ml ⁻¹)	QPCR (cells ml ⁻¹)
		YEPD-agar	Total yeasts
Malvasia	Must	7.1 ± 0.6 x 10 ⁶	5.0 ± 0.3 x 10 ⁶
	MF ^a	9.8 ± 1.4 x 10 ⁶	3.5 ± 0.3 x 10 ^{7*}
	FF ^b	5.0 ± 0.8 x 10 ⁶	6.3 ± 0.7 x 10 ⁶
Cabernet	Must	1.5 ± 0.1 x 10 ⁶	2.2 ± 0.4 x 10 ⁶
	MF ^a	9.4 ± 1.9 x 10 ⁶	1.9 ± 0.1 x 10 ^{7*}
	Sauvignon	5.4 ± 0.5 x 10 ⁶	2.5 ± 0.1 x 10 ^{7*}
Oak barrel		2.1 ± 0.8 x 10 ¹	1.7 ± 0.2 x 10 ^{2*}

3.3. Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by RT-QPCR.

To obtain more accurate quantification of viable yeasts, a RT-QPCR assay was developed. To construct the standard curves, RNA isolated from a *S. cerevisiae* YEPD culture with a concentration of 10⁶ CFU ml⁻¹ was serially diluted 10-fold. cDNA from each RNA dilution was synthesized using NL-4 primer, as described in Material and Methods. Synthesized cDNA was subjected to RT-QPCR assay. The same procedure was carried out with a culture of *S. cerevisiae* incubated for 24 h in Cabernet Sauvignon wine. These standard curves are shown in figure 4.

To verify that traces of DNA did not exist in RNA samples, a non-reverse-transcribed control (NRTC) was performed. No amplification was obtained in any NRTC sample. The detection limit of the RT-QPCR assay was of 10 CFU ml⁻¹ and the coefficient correlations were 0.9975 and

0.9777 in the standard curves obtained from YEPD and red wine, respectively. The efficiencies were 92.67% and 93.53%, respectively. These values of efficiency were better than those obtained using DNA as template. Wine did not interfere with RT-QPCR assays for quantifying total viable yeasts (Fig. 4).

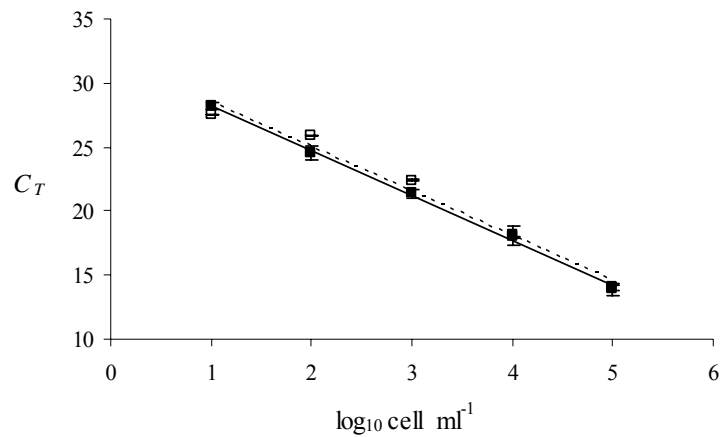


FIG. 4. Standard curves obtained from serially diluted RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae* grown in YEPD media (■, —) and incubated in red wine (□, - -). Correlation coefficient (R^2) values are as follows: YEPD media, 0.9975; red wine, 0.9777. C_T values are the average of three repetitions.

Samples from the Cabernet Sauvignon fermentation and from wine ageing in oak barrels were analyzed using RNA as template. The results obtained by RT-QPCR were compared with those obtained by QPCR and by plating (Table 5).

TABLE 5. Yeast enumeration by plating, QPCR and RT-QPCR in samples of Cabernet Sauvignon alcoholic fermentation and barrel ageing.

		Plating (CFU ml ⁻¹)	QPCR (cells ml ⁻¹)	RT-QPCR (CFU ml ⁻¹)
		YEPA-agar	Total yeasts	Total yeasts
Cabernet	Must	1.5 ± 0.1 x 10 ⁶	2.2 ± 0.4 x 10 ⁶	1.1 ± 0.05 x 10 ⁶
	MF	9.4 ± 1.9 x 10 ⁶	1.9 ± 0.1 x 10 ⁷ *	1.1 ± 0.1 x 10 ⁷ *
Sauvignon	FF	5.4 ± 0.5 x 10 ⁶	2.5 ± 0.1 x 10 ⁷ *	6.6 ± 0.2 x 10 ⁶ *
Oak barrel	B04	2.1 ± 0.8 x 10 ¹	1.7 ± 0.2 x 10 ² *	1.3 ± 0.2 x 10 ² *
	B05	8.8 ± 1.0 x 10 ²	4.1 ± 0.8 x 10 ³ *	9.0 ± 0.3 x 10 ²
	B06	2.1 ± 0.3 x 10 ²	4.7 ± 0.5 x 10 ² *	3.6 ± 0.1 x 10 ²
	B11	7.9 ± 2.3 x 10 ¹	3.0 ± 0.2 x 10 ² *	6.3 ± 0.5 x 10 ¹
	B13	5.4 ± 0.4 x 10 ¹	5.1 ± 0.5 x 10 ² *	4.8 ± 0.1 x 10 ² *

* represents statistically significant differences with plating ($P < 0.05$)

During alcoholic fermentation, although with significant differences, the counts obtained by the three methods were similar. However, in some oak barrel samples, the QPCR method detected up to 10-fold more population than the plating method. Instead, enumeration by RT-QPCR showed similar counts to enumeration by plating (B05 and B11) or to enumeration by QPCR (B04 and B13) depending on the samples. Assuming that the RT-QPCR technique may only have detected viable cells whereas the QPCR technique detected both viable and dead cells, differences in the enumeration by RT-QPCR and plating should be interpreted as the presence of viable but non-culturable yeasts whereas differences between RT-QPCR and QPCR should be due to the presence of dead cells in the sample.

3.4. Stability of 26S rRNA and rDNA in heat-dead cells.

The detection of RNA by RT-PCR is considered a better indicator of cell viability than the detection of DNA. However, this is mostly accepted with regard to messenger RNA while the stability of ribosomal RNA in yeasts has not been documented. To this aim we reproduced a similar experiment to that of Bleve et al. (2) in which the suitability of actine gene mRNA, in comparison with its DNA, was evaluated as an indicator of fungal cell viability. The stability of rRNA and rDNA was assessed by the C_T obtained in samples taken at various times during and after a heat treatment at 60°C for 20 min at a culture of 10^5 CFU ml⁻¹ of *S. cerevisiae* (Fig. 5).

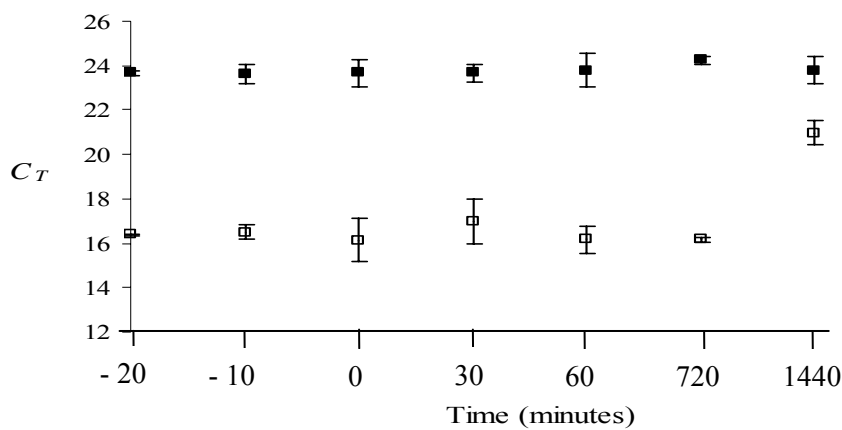


FIG. 5. Comparison of mean C_T values obtained by QPCR (with rDNA as template; ■) and by RT-QPCR (with rRNA as template, □) at different times during and after a heat treatment (60°C, 20 min) of a *S. cerevisiae* suspension. Time zero means the end of the heat treatment. C_T values are averages of results from three replicates. Bars represents standard errors.

Cell viability was simultaneously evaluated during and after the heat treatment by standard plate count and by microscopy fluorescence. After 10 minutes of heat treatment, no colonies were detected and 100% of the cells were stained in red, indicating lost of viability. C_T values from rRNA and rDNA did not change after 12 hours of the heat treatment, so both molecules were stable during this period. However, the C_T obtained from rRNA increased approximately from a

value of 16 to a value of 21 one day after the loss of cell viability. A 99% decrease in rRNA detection was therefore observed, since 3 units of C_T are approximately equivalent to 1 log unit. On the other hand, 100% of the DNA was detected during the same period. These results suggest that 26S rRNA was less stable than rDNA but more stable than mRNA (undetectable by RT-PCR amplification after 20 min of heat treatment, (2)).

4. DISCUSSION

Rapid and sensitive methods for detecting and enumerating yeasts are needed in the wine industry to enable winemakers to make decisions to control and avoid spoilage of their products. Real-time PCR (QPCR) is a suitable technique that has been applied in the last few years to detect and quantify microorganisms associated with food. Studies on the quantification of *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae* in wine by real-time PCR have been developed (6, 20), but we have used the technique to detect and enumerate the total number of yeasts in a wine sample. Controlling the contaminants of species that are particularly dangerous for wine spoilage (i.e. *D. bruxellensis*) is important. However, the most widespread microbiological analysis in the wine industry is the enumeration of total yeast in the final product (after bottling), regardless of the species contaminant.

To achieve this, universal-yeasts primers were designed from the variable D1/D2 domains of the 26S rRNA gene. This is one of the few gene sequences available for all known ascomycetous yeast species and the region has been used successfully in the past to develop QPCR methods for other yeasts (3, 20). These QPCR primers showed a good specificity with all the wine yeasts tested and did not amplify the most representative wine species of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. Moreover, standard curves constructed with different yeast strains and species showed similar efficiencies of amplification, which reinforced the specificity of the primers for yeast enumeration. It should be mentioned that launching a blast analysis of the sequence of the

designed primers against a nucleotide database, many filamentous fungi showed an identity of 100% with the sequence of both primers. Namely, *Botrytis cinerea*, a typical grape-spoilage fungi, only showed a mismatch with the sequence of the reverse primer. Therefore, in the case of contaminated grape with filamentous fungi, we should expect amplification of fungal DNA present in must samples along with yeast DNA. However, the selective pressure (anaerobic conditions, high sugar and ethanol concentrations) exerted during alcoholic fermentation make unfeasible the presence of fungi during and after this process.

We also determined the sensitivity, or detection limit, of the QPCR assay with the designed primers. Our QPCR analysis efficiently enumerated cell concentrations as low as 10^2 CFU ml⁻¹ when the standard curve was performed from YEPD medium and concentrations as low as 10^3 CFU ml⁻¹ when the standard curve was constructed from wine. These differences in sensitivity between the two systems should be attributed to the interference produced by the matrix wine on the PCR amplification or on the process of DNA extraction and purification. All authors who have used the QPCR technique for wine have reported problems of amplification with DNA directly isolated from wine (6, 17, 20). Wine is a complex matrix known to possess various PCR inhibitors (20, 26) such as polyphenols, tannins and polysaccharides. This is why we also constructed standard curves by the dilution of cells incubated in wine. Polyphenols and tannins are mostly responsible for this PCR inhibition because the inhibitory effect is stronger in red wines (higher polyphenol concentration) than in white wines (6, 17). However, this was not true in our case because we did not detect any significant differences between the two main types of wines. A common matrix interference must therefore be taken into account for wines and a standard wine-specific curve must be generated.

There are no legal limits for the content of yeast in wine: there are only recommendations by the OIV (the International Organization of Vine and Wine). The OIV recommends that the microbial

load should be less than 10^4 to 10^5 CFU ml⁻¹ for microorganisms that produce powdery sediments, or less than 10^2 to 10^3 CFU ml⁻¹ for microorganisms that produce flocculent sediments. Below these levels, bottled wine is clear and therefore acceptable (16, 17). If we take these numbers into account, our primers are useful for detecting the minimum cell number. However, the acceptable levels of microorganisms for the wine industry are much lower than those recommended by the OIV. Contamination with a small number of cells is a potential cause of spoilage during storage and before commercialization. The simplest way to decrease the detection limit is to concentrate the sample by centrifugation or filtration, which is not a problem for the volumes involved in the wine industry. As we explain below, these detection limits decreased when RNA was used as template.

The numerous replicas for obtaining the standard curves and the small standard errors among these replicas proved that the assay is reproducible and highly robust, even with DNA isolated from wine. In both YEPD medium and wine, we obtained a very good correlation between the predicted number of CFU per milliliter, as determined by QPCR, and the number of CFU per milliliter, as determined by plating. The QPCR assay also effectively enumerated the yeast population in the true wine samples and there was a good correlation with enumeration by plating. Only for the wine in the oak barrel, was the yeast population determined by plating much lower than that determined by QPCR. This may be due to the presence of viable but non-culturable cells, which are amplified by the QPCR. Millet and Lonvaud-Funel (18) have already reported the presence of microorganisms in this state during wine storage. However, this lack of correlation between plating and the QPCR assay may be also explained by the DNA amplification of dead cells.

Since RNA is less stable than DNA after cellular death, the detection of this molecule is considered to be a better indicator of cell viability than the detection of DNA (23). However,

QPCR systems based on reverse transcription have mostly used mRNA as template whereas our primers were designed to amplify rDNA. Our template for the reverse transcription reaction was therefore the 26S rRNA. Fontaine and Guillot (8) studied the stability of other ribosomal RNA (18S rRNA) by RT-QPCR as a possible marker of viability of *Cryptosporidium parvum* and concluded that 18S rRNA was more stable than mRNA but less stable than its encoding rDNA after a thermal shock. Similar conclusions are obtained from our study of the stability of the 26S rRNA in *S. cerevisiae*. We detected degradation equivalent to 99% of the 26S rRNA molecules 24 hours after cell death, while the DNA molecule remained stable. Therefore, 26S rRNA may be correlated with cell viability but with the restraint that the loss of viability did not produce an immediate degradation of this molecule. We should also point out that the instability of the mRNA should be considered advantageous for the rapid detection of cellular death but also that it involves problems of degradation during the extraction and manipulation of the samples, which may lead to an underestimation of the quantification of the samples. Furthermore the time length of the ageing, bottling and storing processes in the wine industry are long enough to discard as irrelevant the yeast death in one day period, which would be the method's error. More critical would be this underestimation during the alcoholic fermentation, where the changes are quicker.

However, conversely to DNA molecules, the use of an specific RNA (mRNA or rRNA) for microbial enumeration may have the problem of the variation of gene expression in response to various factors or growth phases. Yeasts in wines are found in different growth stages (lag, exponential and stationary phases) and variable rRNA copy number might influence the accuracy of the quantification. In order to check the impact of the growth stage on rRNA copy number, we collected 10^5 cells in lag, exponential and stationary phases and analysed them by RT-QPCR. We detected differences up to two *Ct* lower in the stationary phase samples than in the lag and exponential phase (data not shown). Despite this fluctuation, the differences are not dramatic and, therefore, we think that the use of the rRNA is adequate for yeast quantification. A promising

and easy-to-use alternative to the RNA-based quantification methods has been recently published (27). This method uses the DNA-intercalating dye ethidium monoazide bromide (EMA) which penetrates only into dead cells. Subsequent photoinduced cross-linking was reported to inhibit PCR amplification of DNA from dead cells. So far this selective removal of DNA from dead cells has been assayed with bacterial cells and it should be tested with other microorganisms.

In conclusion, QPCR is a fast, direct (without culturing), sensitive and reliable technique for quantifying the total yeast population in wine. QPCR can be used to enumerate yeasts during industrial wine fermentation and to rapidly control the risks of wine spoilage. A drawback of the quantification by using DNA as template is that live and dead cells are not differentiated. RT-QPCR using NL-4 primer may be useful for enumerating total viable yeast because it presents a low detection limit and, because only viable cells are quantified. The quantification by using RNA may have the problem of the variation of gene expression depending on the physiological state of the cell. As far as we know, this is the first time that RT-QPCR has been performed from rRNA to quantify viable yeasts.

5. REFERENCES

1. Blackstone, G M., J. L. Nordstrom, M. C. L. Vickery, M. D. Bowen, R. F. Meyer, and A. DePaola. 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53:149-155.
2. Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4116-4122.

3. Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman, and S. J. Vesper. 2003. Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1775-1782.
4. Chatonnet, P., D. Dubourdieu, J. N. Boidron, and M. Pons. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **60**:165-178.
5. Cocolin, L., L. F. Bisson, and D. A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:81-87.
6. Delaherche, A., O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **97**:910-915.
7. Draper, N.R., and H. Smith. 1981. *Applied regression analysis*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
8. Fontaine, M., and E. Guillot. 2003. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**:237-243.
9. Fugelsang, K. 1997. *Wine microbiology*. Chapman and Hall, New York, N. Y.
10. Haarman, M., and J. Knol. 2005. Quantitative Real-Time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2318-2324.
11. Hein, I., A. Lehner, P. Rieck, K. Klein, E. Brandl, and M. Wagner. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3122-3126.
12. Heresztyn, T. 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* **146**:96-98.

13. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030.
14. Ibeas, J. I., F. Lozano, F. Perdignes, and J. Jimenez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:998-1003.
15. Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73:331-371
16. Loureiro, V., and M. Malfeito-Ferreira. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol. Review.* 86:23-50.
17. Martorell, P., A. Querol, and M. T. Fernández-Espinar. 2005. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* species directly from wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6823-6830.
18. Millet, V., and A. Lonvaud-Funel. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:136-141.
19. Mills, D. A., E. A. Johannsen, and L. Cocolin. 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4884-4893.
20. Phister, T. G., and D. A. Mills. 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7430-7434.
21. Pinzani, P., L. Bonciani, M. Pazzagli, C. Orlando, S. Guerrini, and L. Granchi. 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Letters Appl. Microbiol.* 38:118-124.
22. Querol, A., E. Barrio, and D. Ramón. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:439-446.

23. Sheridan, G. E. C., C. I. Masters, J. A. Shallcross, and B. M. Mackey. 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1313-1318.
24. Sierkstra, L. N., J. M. A. Verbakel, and C. T. Verrips. 1992. Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2559-2566.
25. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
26. Zoecklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump, and F. S. Nery. 1999. *Wine analysis and production*. Aspen Publishers, New York, N.Y.
27. Nocker, A. and A. K. Camper. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1997-2004.

CAPÍTOL 4

Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR (QPCR).

Núria Hierro, Braulio Esteve-Zarzoso, Albert Mas and José M. Guillamón

Unitat d'Enologia, Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments (CeRTA).

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili.

Marcelí Domingo. Tarragona, Spain.

FEMS Yeast Research

(enviat)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ABSTRACT

Real-time PCR (QPCR) was developed for the rapid quantification of two of the most important yeast groups in alcoholic fermentation (*Saccharomyces* spp. and *Hanseniaspora* spp.). Specific primers were designed from the region spanning the internal transcribed spacer ITS2 and the 5.8S rRNA gene. To confirm the specificity of these primers, they were tested with different yeast species, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria. These are common microorganisms in winery. Amplification was detected only for the species of these yeast genera. This technique was performed on reference yeast strains from pure cultures and validated with both artificially contaminated wines and real wine fermentation samples. To determine the effectiveness of the technique, the QPCR results were compared with those obtained by plating. The design of new primers for other important wine yeast species will enable to monitor yeast diversity during industrial wine fermentation and to detect the main spoilage yeasts in wine.

1.INTRODUCTION

Alcoholic fermentation is a complex microbial process that is characterised by a succession of different species of yeasts (Fleet, 1993). Yeasts with low fermentation activity, such as *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. and *Kluyveromyces* spp., are predominant in grape musts and during the early stages of fermentation. Subsequently, *Saccharomyces cerevisiae* proliferates, dominating and completing the wine fermentation (Fleet & Heard, 1993; Beltran *et al.*, 2002). *Hanseniaspora* species have been widely reported as major non-*Saccharomyces* yeasts associated with grape microbiota (Sabaté *et al.*, 2002) and during the initial stages of wine fermentation (Pretorius, 2000). Some strains of these apiculate yeasts have shown positive oenological properties and it has been suggested that they can be used in grape-must fermentations to enhance the aroma and flavour profiles of the wines (Romano *et al.*, 2003; Capece *et al.*, 2005). It was thought, however, that this contribution was limited to the first few days of fermentation because the growth of these yeasts was suppressed by the rapid development of the *Saccharomyces* strains (Pretorius, 2000). The dominance of this fermentative species in the middle and final stages of the process was so overwhelming that it was highly unlikely that other non-*Saccharomyces* species would be isolated. Pérez-Nevado *et al.* (2006) have studied the mechanism involved in the cellular death of two *Hanseniaspora* wine strains (*H. guillermondii* and *H. uvarum*) during mixed fermentations with *S. cerevisiae* under oenological growth conditions. When *S. cerevisiae* reached cell densities of around 10^7 CFU mL⁻¹, a strong reduction in the *Hanseniaspora* population was observed regardless of the ethanol concentration. The authors hypothesised that one or more toxic compounds produced by *S. cerevisiae* triggers the early death of the *Hanseniaspora* cells, though it has not yet been possible to identify the nature of these compounds. Conversely, using a direct molecular method, Mills *et al.* (2002) detected an active population of *Hanseniaspora* strains throughout fermentation that went unnoticed by the plating method. We also recently detected a permanent population of *H. uvarum*

and *H. osmophila* strains throughout different fermentations (Hierro *et al.*, 2006a). In our opinion, however, a still unanswered question in most studies of yeast is to what extent these minor species contribute to the total yeast population during wine fermentation. The application of plating-independent molecular methods may reveal the real diversity during wine fermentation.

In the last few years, researchers have used methods to directly identify yeasts from wine without the need for plating (Ibeas *et al.*, 1996; Cocolin *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2002; Phister & Mills, 2003; Delaherche *et al.*, 2004). Most of these methods rely on the direct amplification of yeast DNA from wine by PCR. Phister & Mills (2003) highlighted two main advantages of the direct characterization of microorganisms over yeast enrichment and plating: first, regardless of their capacity to grow in a plate, all the yeast populations are detected and, second, analysis is fast.

Because of its specificity and sensitivity, one of the most promising PCR techniques in food control is real-time, or quantitative, PCR (QPCR) (Bleve *et al.*, 2003). QPCR assays have been developed to detect and enumerate various bacteria and fungi in food (Hein *et al.*, 2001; Blackstone *et al.*, 2003; Bleve *et al.*, 2003; Haarman & Knol, 2005), but also to detect microorganisms in wine (Phister & Mills, 2003; Delaherche *et al.*, 2004; Pinzani *et al.*, 2004; Martorell *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Hierro *et al.*, 2006b; Rawsthorne & Phister, 2006).

In this study we develop a method for rapidly and accurately quantifying two of the main populations of yeasts during alcoholic fermentation, *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* strains. For the quantification of both *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* strains, the primers were designed from the region spanning the internal transcribed spacer ITS2 and the 5.8S rRNA gene. The QPCR assays were first conducted on reference yeast strains from pure cultures to detect the specificity of the primers. We later validated this technique with both artificially contaminated

and natural samples of wine fermentation and, to determine effectiveness, compared the results with those obtained from plating.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Yeast strains

The strains used in this study, all of which were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT), are listed in Table 1. All yeast strains were grown in YEPD media (1% yeast extract; 2% peptone and 2% glucose, w/v) at 28 °C. Yeast and bacterial strains were used to test the specificity of the primers (Table 1).

Table 1. Reference strains used in this study. Sources of strains are abbreviated as: CECT (Spanish Type Culture Collection, Universidad de Valencia), CBS (Centralalbureau voor Schimmelcultures, culture collection in Delft, the Netherlands), ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), MCYC (Microbiology Collection of Yeast Cultures, Universidad Politécnica de Madrid), IFI (International Fabricare Institute), LMG (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium).

Microorganism	CECT ^a Designation	Other designations	Isolation source	<i>Saccharomyces</i> - specific PCR results	<i>Hanseniaspora</i> - specific PCR results
Yeasts					
<i>Candida boidinii</i>	1014 ^T	CBS ^b 2428	Tanning fluid	–	–
	10029	MCYC ^c 113	Milk	–	–
	10035	MCYC 124		–	–
			<i>Amygdalus communis</i>		
<i>Candida sake</i>	1044	CBS 617	Lambic beer	–	–
<i>Candida stellata</i>	11046	CBS 2649	Grape juice	–	–
	11110	CBS 843	Wine grapes	–	–
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1009	CBS 72	Lambic beer	–	–
	1451 ^T	CBS 74	Lambic beer	–	–
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1444 ^T	CBS 314	Muscat grape	–	+

	10389	MCYC 1857	Grape juice	-	+
	11105	CBS 2589	Grape must	-	+
	11106	CBS 5073	Wine grape	-	+
	11107	CBS 8130	Grapes	-	+
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	11027	MCYC 2380	Grape must	-	+
	11029	CBS 465	Infected nail	-	+
	11102	CBS 1972	Grape juice	-	+
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	11206	CBS 313	Ripe Riesling grape	-	+
	11207	CBS 105	Grape	-	+
<i>Hanseniaspora vineae</i>	1471	CBS 6555	Grape juice	-	+
<i>Issatchenkia terricola</i>	11139	CBS 4715	Dregs of pressed grapes	-	-
	11176	CBS 2617	soil	-	-
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1941 ^T	CBS 300	Beer	+	-
	1969	CBS 395	Juice of Ribes nigrum	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1171	CBS 1320	-	+	-
	1319	ATCC ^d 26602	Sugar refinery	+	-
	1942 ^{NT}	CBS 1171	Beer	+	-
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1371	IFI ^e 979	-	-	-
	1382	IFI 982	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe var. pombe</i>	1378	ATCC 24751	Millet beer	-	-
	1379	ATCC 26760	Grape must	-	-
	10685 ^T	CBS 356	-	-	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1880	-	Wine	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	11042	CBS 3014	Wine	-	-
	11043	CBS 4688	Grape must	-	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1230	CBS 741	Honey	-	-
	1232 ^T	CBS 732	Must of black grape	-	-
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	1967 ^T	CBS 2514	Soil of citrus orchard	-	-
Bacteria					
<i>Acetobacter aceti</i>	298 ^T	ATCC 15973	Beech-wood shavings of vinegar plant	-	-
<i>Oenococcus oeni</i>	217 ^T	ATCC 23279	Wine	-	-

The strain *Lipomyces kononenkoae* 1967^T was used as external reference because this species has been never isolated from a wine source. Aliquots of known cell quantities (10^5 cells) of *L. kononenkoae* 1967^T were added to each cell dilution of different yeast strains used to generate standard curves.

2.2. Primer design

S. cerevisiae, *H. uvarum* and *L. kononenkoae* specific-primer sets were designed by aligning the region spanning the internal transcribed spacer ITS2 and the 5.8S rRNA gene. Three alignments were made that included sequences of the target species (*S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *L. kononenkoae*, respectively) and those of the most common wine yeast species. Sequences were obtained from the GenBank database and alignment was performed with the Clustal W multiple sequence alignment (Thompson *et al.*, 1994). The final selection of the primers was performed using the ABI Primer Express program (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The BLAST search (Basic Alignment Search Tool, Internet address: <http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>) was used to check the specificity of each primer. The sequence of primers and amplicon size generated are shown in Table 2.

Table 2. Primer sequences developed for rt-PCR assays.

Target species	Primer	Sequence 5'-3'	PCR product size (bp)
<i>S. cerevisiae</i>	SCER-R	CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA	175
	CESP-F	ATCGAATTTTTGAACGCACATTG	
<i>H. uvarum</i>	HUV-R	AACCCTGAGTATCGCCCACA	121
	CESP-F	ATCGAATTTTTGAACGCACATTG	
<i>L. kononenkoae</i>	LIP-R	TAGAAGCCAGATATGTGCCCATC	117
	CESP-F	ATCGAATTTTTGAACGCACATTG	

2.3. Specificity of PCR assays

DNA samples from all yeasts were extracted according to Querol *et al.* (1992). PCRs were carried out in 25 μ l final volume containing 5 μ l of DNA template (between 10 and 100 ng), 1 μ M of each respective primer, 100 μ M of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10X Buffer and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (ARK Scientific, Darmstadt, Germany).

The PCR conditions were an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. All amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The products of the PCR were analyzed by electrophoresis on a 3% (w/v) agarose gel in 1X TBE buffer stained with ethidium bromide and visualised under UV light. A 100 bp DNA Ladder marker (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) was used as the size standard.

2.4. DNA extraction for the QPCR assay

Yeast cell suspensions were washed with sterile water and the pellets were resuspended in 700 μ l of AP1 buffer (DNeasy Plant minikit, Qiagen, Valencia, California) and transferred to a 2 ml conical-bottom microcentrifuge tube containing 1 g of 0.5 mm diameter glass beads. The tubes were shaken in a mini bead-beater (Biospec Products Inc., Bartlesville, Okla.) for 3 min at the maximum rate and then centrifuged at 10,000 rpm for 1 min. The DNA in the supernatant was transferred to a sterile microfuge tube and purified using the DNeasy Plant minikit (Qiagen, Valencia, California) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Standard curves

Standard curves were created by plotting the C_T (Cycle Threshold) values of the QPCR performed on dilution series of DNA or yeast cells (10^6 to 1 cells mL⁻¹) against the log input cells

mL⁻¹. Yeast strains *H. uvarum* 1444^T and 11107 and *S. cerevisiae* 1171, 1319 and 1942^{NT} were used to achieve *Hanseniaspora*-specific and *Saccharomyces*-specific standard curves, respectively. These standard curves were generated from cells grown in YEPD and from cells incubated in wine. Aliquots of *L. kononenkoae* 1967^T containing 10⁵ cells were added to each dilution as external reference.

2.6. Artificially contaminated wine

Different mixed cultures with known populations of *S. cerevisiae* plus *H. uvarum* were incubated for 24 h in Macabeo and Cabernet Sauvignon wine previously sterilised by filtration. Several dilutions of each mixed cultures were plated on two different media: the non-selective YEPD-agar medium and the selective lysine-agar medium (Oxoid), which does not support the growth of *Saccharomyces* species (Angelo & Siebert, 1987). DNA from each mixture was isolated as described above and quantified by QPCR.

2.7. Wine fermentations and sampling

Wine fermentations were carried out in the experimental cellar of the Oenology Faculty in Tarragona (Spain) during the 2006 vintage. Macabeo was the grape variety chosen for the vinifications. The grape must obtained was separated into two 100-L tanks after sulphitation (60 mg L⁻¹) and settling. Both fermentations performed spontaneously (no yeast inoculation). The only difference was that one was fermented at low temperature (13°C) and the other was fermented at optimum temperature (25°C). Samples were taken at different stages of wine fermentation. Each sample was plated on YEPD-agar and the selective lysine-agar medium (Oxoid), which does not support the growth of *Saccharomyces* species (Angelo & Siebert, 1987). DNA from each mixture was isolated as described above and quantified by QPCR to enumerate *Hanseniaspora* and *Saccharomyces* populations. These data were also complemented with the

enumeration of total yeast population by QPCR, as described in our previous work (Hierro *et al.*, 2006b).

2.8. Quantitative PCR assays

PCR amplification was performed in 25 μ l final volume containing 5 μ l of DNA, 200nm of each respective primer and 12.5 μ l of SybrGreen Master Mix (Applied Biosystems). All amplifications were carried out in optical-grade 96-well plates on an ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with an initial step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15s, 60°C for 1 min and 72°C for 30s. The cycle threshold (C_T) was determined automatically by the instrument. All samples were analyzed in triplicate. The coefficients of efficiency (E) were calculated using the formula $E=(10^{-1/\text{slope}})-1$ (Higuchi *et al.*, 1993).

RESULTS

3.1. Primer design, specificity and sensitivity of QPCR

The primers for the quantification of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* were designed from the 5.8S ribosomal gene and the internal transcribed spacer 2 (ITS2). The forward primer was common for both groups of species and was homologous to a conserved region of the 5.8S ribosomal gene. Therefore, the specificity was determined by the reverse primer, complementary to specific sequences of *Saccharomyces* spp. and *Hanseniaspora* spp., respectively.

We determined primer specificity by amplifying the yeasts and bacteria listed in Table 1 with the designed primers. The *Saccharomyces*-specific primers yielded an amplicon of 175 bp with the *S. cerevisiae* and *S. bayanus* strains tested but these primers were not able to amplify DNA from other wine yeasts, lactic acid bacteria or acetic acid bacteria. This level of specificity was also obtained for the *Hanseniaspora*-specific primers, which only yielded an amplicon of 121 bp for *H. uvarum*, *H. osmophila*, *H. guillermondii* and *H. vineae* strains.

To determine the sensitivity and detection limits of the QPCR for the designed primers, DNA obtained from a *S. cerevisiae* 1942^{NT} culture and a *H. uvarum* 1444^T culture with concentrations of 10⁶ CFU mL⁻¹ were serially diluted 10-fold. Each DNA dilution was used to construct a standard curve (Fig. 1). The assay was linear over 6 orders of magnitude and the detection limit was approximately 10 CFU mL⁻¹ in both species. Although the C_T values were higher for *H. uvarum* in the same cellular concentration, the values of efficiency of amplification were close to 100% in both species (105% and 108% for *S. cerevisiae* and *H. uvarum*, respectively).

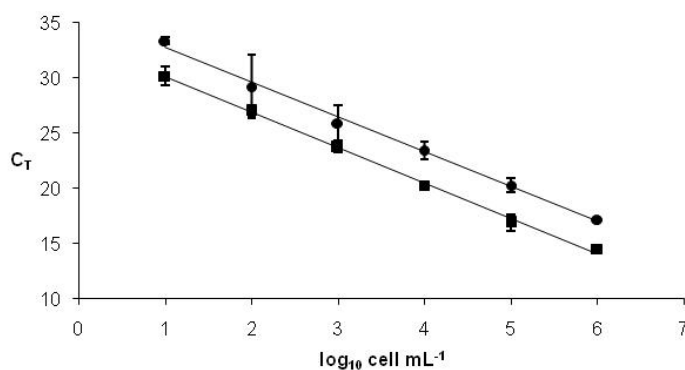


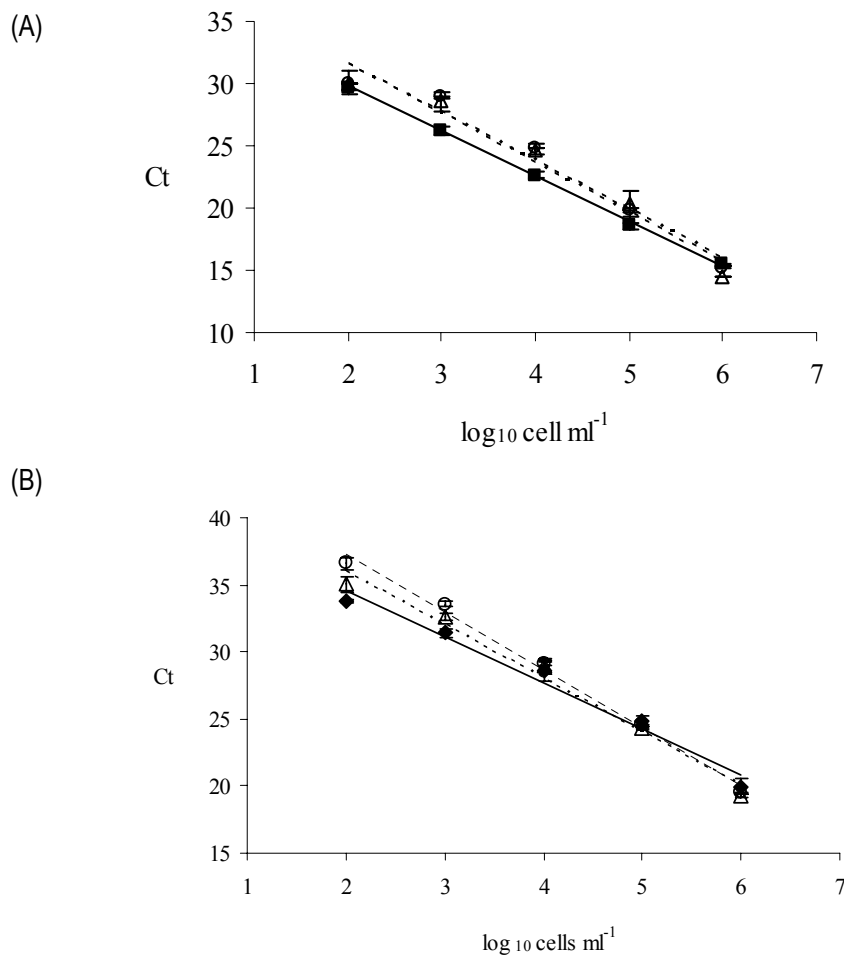
Fig. 1 Standard curves obtained from serially diluted *Saccharomyces cerevisiae* (■) ($y = -3.2018x + 33.301$; $r^2 = 0.9978$) and *Hanseniaspora uvarum* (●) ($y = -3.1429x + 35.9$; $r^2 = 0.9947$) pure genomic DNA. C_T values are the average of three repetitions. Bars represent standard errors.

3.2. Quantification of *Hanseniaspora* and *Saccharomyces*

In our opinion, wine samples must be quantified using standard curves constructed by cellular dilution rather than DNA dilution. We therefore used *H. uvarum* 1444^T and *S. cerevisiae* 1942^{NT} to generate species-specific standard curves. From overnight YEPD cultures, 10-fold serial dilution

of these yeasts was performed and DNA from each dilution was isolated and quantified by QPCR using the corresponding species-specific primer set (Fig 2).

Fig. 2 Species-specific standard curves obtained by QPCR from 10-fold serial dilution of (A) *Saccharomyces cerevisiae* grown in YEPD media (■, —) and incubated in white wine (○,---) and red wine (□, ---) and (B) *Hanseniaspora uvarum* grown in YEPD media (◆, —) and incubated in white wine (○,---) and red wine (□, ---). Correlation coefficient (R^2) values, slope and efficiency are shown in table 2. Bars represent standard errors.



In all cases, the detection limit was approximately 10^2 cells mL⁻¹ and the assays were linear over 5 orders of magnitude. The correlation coefficients, slopes and efficiencies of the amplification for the standard curves are shown in Table 3. All values of efficiency were lower than those of the standard curves constructed by DNA dilution. This decrease in the efficiency of the QPCR reaction had to be taken as a lower efficiency of the DNA extraction process from the cell dilutions. At this point we used an external reference to evaluate whether the efficiency of the DNA extraction was constant. Aliquots of *Lipomyces kononenkoae* 1967^T containing 10^5 cells were added to each of the dilutions used to construct the standard curve. Each dilution was amplified using a *Lipomyces*-specific primer set and in all dilutions we obtained the expected C_T value (Ct = 23.43 ± 0.77 , n=32). DNA recovery was therefore uniform in all samples, which means that this DNA extraction process is both reliable and reproducible for the QPCR assay.

Table 3. Correlation coefficient, slope and efficiency of standard curves obtained from serial dilutions of yeast cells grown in YEPD media and yeast cells incubated in white and red wine

	Media	R ²	Slope	Efficiency ^a (%)
<i>S.cerevisiae</i>	YEPD	0.9968 ± 0.003	-3.662 ± 0.108	87.63 ± 3.49
	white wine	0.9641 ± 0.001	-3.863 ± 0.017	81.51 ± 0.46
	red wine	0.9571 ± 0.005	-3.934 ± 0.139	79.66 ± 3.72
<i>H.uvarum</i>	YEPD	0.9771 ± 0.01	-3.522 ± 0.203	92.68 ± 7.6
	white wine	0.9922 ± 0.003	-4.310 ± 0.045	70.62 ± 0.95
	red wine	0.9830 ± 0.001	-3.986 ± 0.123	78.27 ± 3.182

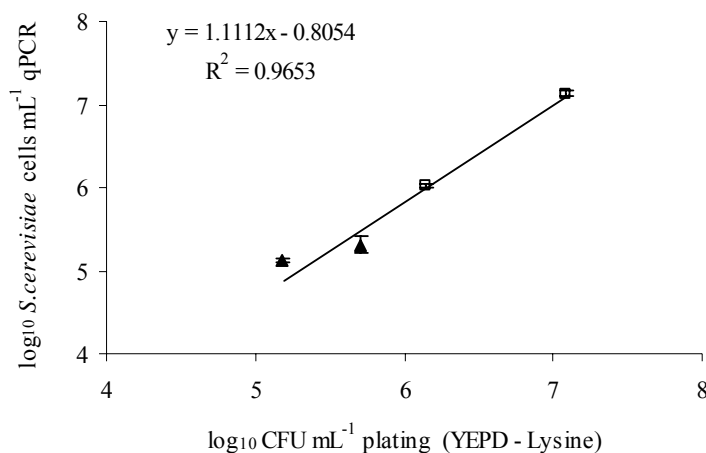
^a Efficiency was estimated by the formula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$.

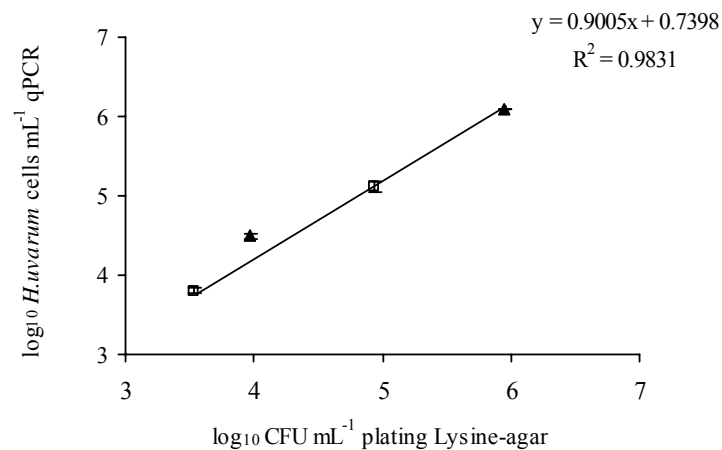
With regard to the effect of the matrix, the samples incubated in wine also showed a slight decrease in amplification efficiency. Some major compounds of wine, such as polyphenols, are

known to have an inhibitory effect on the PCR. However, this decrease in efficiency was not very important and the detection limit was the same for both matrices. This technique may therefore be useful to quantify *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations in wine samples.

The same white and red wines used for the standard curves were artificially contaminated with different mixtures of *S. cerevisiae* and *H. uvarum* ranging from 10^3 to 10^7 CFU mL⁻¹. After 24 h of incubation, samples were analysed by QPCR. The enumeration of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations from these mixed cultures was calculated using the standard curves generated from wine. The method's quantification effectiveness was tested by correlating the cell number concentration estimated by plate count and QPCR (Figure 3).

Fig. 3 Relationship between results of yeast quantification by QPCR and plating of artificially contaminated white wine samples (□) and red wine samples (▲). C_T values are averages of results from three replicates. Bars represent standard errors.





Each mixed culture was plated on two different media: the non-selective YEPD-agar medium and the selective lysine-agar medium, which does not support the growth of *Saccharomyces*. Therefore, the UFC mL⁻¹ counted on lysine-agar medium are equivalent to *Hanseniaspora* colonies and the *Saccharomyces* UFC mL⁻¹ are obtained by subtracting the UFC mL⁻¹ counted on lysine-agar from the UFC mL⁻¹ counted on YEPD. Our results showed that the numbers obtained by QPCR did not significantly differ from those measured by plating.

3.3. Monitoring wine fermentations

We also analysed the evolution of the *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation. To do so, we monitored the same grape must fermented at low temperature (13°C) and optimum temperature (25°C). Both fermentations proceeded spontaneously because no yeast inoculum was added. Samples from must, alcoholic fermentations and wines were plated on YEPD and lysine-agar media (Table 4) and quantified by QPCR (Table 5). The latter technique was used to enumerate the *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations with the primers designed in this study but also to enumerate the total yeast population using the primers designed in our previous study (Hierro *et al.*, 2006b).

Table 4. Enumeration by plating of yeast in samples from the same Macabeo must fermented at low (13°C) and optimum (25°C) temperature. ^a Must is the same for both fermentations (density 1095 g L⁻¹); ^b Clear-must is must after settling and racking; ^c IF = Initial fermentation (density of 1070 g L⁻¹); ^d MF = Middle fermentation (density 1040 g L⁻¹); ^e FF = Final fermentation (density 1000 g L⁻¹); ^f Wine < 2 g L⁻¹ of sugars.

	YEPD-agar		Lysine-agar	
	13°C	25°C	13°C	25°C
Must ^a	1.3 ± 0.1 x 10 ⁵		1.3 ± 0.4 x 10 ⁵	
Clear-must ^b	4.0 ± 1.3 x 10 ⁵	4.0 ± 1.1 x 10 ⁵	3.6 ± 3.5 x 10 ⁵	3.6 ± 2.1 x 10 ⁵
IF ^c	1.5 ± 0.7 x 10 ⁷	2.9 ± 1.3 x 10 ⁷	8.5 ± 0.7 x 10 ⁵	9.3 ± 3.1 x 10 ⁵
MF ^d	1.4 ± 0.7 x 10 ⁷	1.3 ± 0.6 x 10 ⁷	2.7 ± 0.2 x 10 ⁵	1.3 ± 1.1 x 10 ⁵
FF ^e	9.5 ± 0.1 x 10 ⁶	9.5 ± 0.2 x 10 ⁶	0	5.8 ± 1.0 x 10 ⁴
Wine ^f	4.9 ± 0.1 x 10 ⁶	1.9 ± 0.2 x 10 ⁶	0	0

Table 5. Quantification by QPCR of yeast in samples from the same Macabeo must fermented at low (13°C) and optimum (25°C) temperature. ^a Must is the same for both fermentations (density 1095 g L⁻¹); ^b Clear-must is must after settling and racking; ^c IF = Initial fermentation (density of 1070 g L⁻¹); ^d MF = Middle fermentation (density 1040 g L⁻¹); ^e FF = Final fermentation (density 1000 g L⁻¹); ^f Wine < 2 g L⁻¹ of sugars.

	Total-Yeasts		<i>Saccharomyces</i>		<i>Hanseniaspora</i>	
	13°C	25°C	13°C	25°C	13°C	25°C
Must ^a	9.5 ± 1.5 x 10 ⁶		3.9 ± 0.2 x 10 ³		1.2 ± 0.5 x 10 ⁵	
Clear-must ^b	3.7 ± 0.4 x 10 ⁶	6.7 ± 0.9 x 10 ⁶	6.7 ± 0.8 x 10 ⁵	3.3 ± 0.2 x 10 ⁶	6.2 ± 0.7 x 10 ⁵	6.6 ± 0.3 x 10 ⁵
IF ^c	1.8 ± 0.1 x 10 ⁷	1.6 ± 0.2 x 10 ⁷	9.8 ± 0.5 x 10 ⁶	1.5 ± 0.2 x 10 ⁷	1.0 ± 0.7 x 10 ⁵	4.1 ± 0.9 x 10 ⁴
MF ^d	1.1 ± 0.1 x 10 ⁷	1.1 ± 0.1 x 10 ⁷	6.7 ± 0.7 x 10 ⁶	1.2 ± 0.2 x 10 ⁷	8.9 ± 2.0 x 10 ⁴	4.0 ± 0.5 x 10 ⁴
FF ^e	7.6 ± 1.0 x 10 ⁶	6.3 ± 0.1 x 10 ⁶	5.3 ± 0.9 x 10 ⁶	3.0 ± 0.2 x 10 ⁶	5.4 ± 0.8 x 10 ⁴	3.8 ± 0.7 x 10 ⁴
Wine ^f	1.15 ± 0.2 x 10 ⁶	4.21 ± 0.6 x 10 ⁶	1.16 ± 0.2 x 10 ⁶	4.98 ± 1.7 x 10 ⁶	1.50 ± 0.3 x 10 ⁴	7.71 ± 2.0 x 10 ³

A clear advantage of QPCR is that it enables microorganisms present at low population sizes to be enumerated (Table 5). This is the case of *Saccharomyces*, which represented approximately one thousandth of the total population in the must sample. In this sample, the *Hanseniaspora* population was two orders of magnitude higher than the *Saccharomyces* population but this only represented approximately one per cent of the total population. Other non-*Saccharomyces* species are therefore more abundant in the must sample. The clear-must sample is the must after sulphitation, natural-settling for 24 hours and racking in the fermenting vats. This process led to a decrease in total yeasts because of the antimicrobial effect of the SO₂ and the decanting of microorganisms during settling. However, sulphitation and settling led to a large increase in the *Saccharomyces* population and a slight increase in the *Hanseniaspora* population. As expected, the fermentation process led to increases in yeast populations that decreased in the last phase of fermentation and in the wine. This decrease is mostly a consequence of the toxic effects of the ethanol together with the deposition of the yeasts in the bottom of the vat. This increase in yeast populations should be accounted for by the increase in the *Saccharomyces* population, which showed the same trend during alcoholic fermentation. The peak for the *Saccharomyces* population led to a decrease in the *Hanseniaspora* population, though a low concentration of *Hanseniaspora* was detected throughout fermentation. At this point we should stress that, as the QPCR technique does not discriminate viable cells from dead cells, it is a good idea to compare the QPCR and plating counts.

The total-yeast counts of the must and clear-must samples were much higher with QPCR than with plating (YEPD-agar). This may be due to a large presence of viable but non-culturable (VBNC) populations in the must or to the overestimation of yeasts by the amplification of DNA from dead yeast cells. Both of these arguments may also explain the inability of the *Hanseniaspora* population, detected by QPCR in the final fermentation and wine samples, to grow in lysine-agar medium.

Regarding the effect of temperature on yeast populations, although not very important differences were detected, a low fermentation temperature led to a lower proportion of *Saccharomyces* in favour of the non-*Saccharomyces* population. This was confirmed by the larger *Hanseniaspora* populations in the low-temperature samples.

4.DISCUSSION

Rapid and sensitive methods for detecting and enumerating yeasts are needed in the wine industry to enable winemakers to make decisions to control and avoid spoilage of their products. Real-time PCR (QPCR) is a promising technique for quantifying microorganisms associated with food. We recently used this technique to detect and enumerate the total number of yeasts in wine samples (Hierro *et al.*, 2006b). In our present study, we have designed *Saccharomyces*- and *Hanseniaspora*-specific primers to enumerate these important species in the wine making processes. The primers were designed from the internal transcribed spacer ITS2 and the 5.8S rRNA gene. The forward primer, selected from the 5.8S rRNA gene, was common to both species. The reverse primers were homologous to the ribosomal intergenic spacer region (ITS2). These intergenic spacers of the ribosomal genes are first transcribed in a 37S ribosomal precursor RNA (including the 18S, 5.8S and 28S rRNAs and the two intergenic spacers ITS1 and ITS2) and then processed and eliminated from the mature ribosomal RNAs. This means that the ITS regions are less evolutionarily conserved than the rRNA coding genes and that they are therefore valuable regions for finding interspecific differences (Guillamón *et al.*, 1998).

Comparison of the specificity, sensitivity and efficiency of these specific primers and of the universal yeast primers designed in our previous study revealed some similarities and some differences. The specific primers amplified for the intended group of species and none of the PCR assays was positive for any other wine microorganisms of those listed in table 1. QPCR analysis with both *Saccharomyces*- and *Hanseniaspora*-specific primers efficiently enumerated cells at

concentrations as low as 10^1 cells mL⁻¹ when the standard curve was constructed by DNA dilution and at concentrations as low as 10^2 cells mL⁻¹ when the standard curve was constructed from cells incubated in wine. This sensitivity is higher than that for the universal yeast primers in which the detection limit was 10^3 cells mL⁻¹ for wine samples (Hierro *et al.*, 2006b). One similarity with our previous study is that the amplification efficiency was lower in the samples from wine. Wine is a complex matrix that is known to possess several PCR inhibitors (Phister & Mills, 2003; Delaherche *et al.*, 2004; Martorell *et al.*, 2005) such as polyphenols, tannins and polysaccharides. These authors reported that the inhibitory effect was stronger in red wines (which have a higher polyphenol concentration) than in white wines. However, this was not so in our case because we detected a common matrix interference that did not depend on the type of wine. This matrix interference justified the construction of standard curves from cells incubated in wine. In this study we also tested the efficiency of the cell lysis and DNA extraction by adding the same cell concentration of the yeast *Lipomyces kononenkoae* to the various samples analysed. The similar C_T values obtained for this external reference showed that the DNA extraction method was good. All of this enabled a good correlation between the predicted number of cells per millilitre, as determined by QPCR, and the number of CFU per millilitre, as determined by plating, which proves that the assay is reproducible and highly robust.

In this study we have used this sensitive and independent-culture method to monitor the evolution of the major fermentative species, *S. cerevisiae*, and that of the major non-*Saccharomyces* species, *Hanseniaspora* spp., during industrial alcoholic fermentations. Alcoholic fermentation is a complex microbial process that is characterised by a succession of different species of yeasts (Fleet, 1993). Most studies of the diversity and development of species during alcoholic fermentation have documented the predominance of the non-*Saccharomyces* yeasts in the initial stages of fermentation and the favourable effect of the selective pressure on the most efficient fermentative species, *S. cerevisiae* (Pretorius, 2000). Non-*Saccharomyces* yeasts may affect

wine fermentations directly, by producing off-flavours, and indirectly, by modulating the growth or metabolism of the dominant *Saccharomyces* population (Mills *et al.*, 2002). Although five *Hanseniaspora* species have been isolated from wine (*H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *H. occidentalis*, *H. osmophila* and *H. vineae*) (Capece *et al.*, 2005), *H. uvarum* (and its anamorph *Kloeckera apiculata*) has been widely reported as a major non-*Saccharomyces* yeast during the initial stages of wine fermentation (Pretorius, 2000). Some strains of this apiculate yeast have shown positive oenological properties and it has been suggested that they can be used in grape-must fermentations to enhance the aroma and flavour profiles of wines (Romano *et al.*, 2003).

Most of these ecological studies were based on the isolation and identification of colonies plated on general or selective solid media. The limitations of plating are that it is difficult to isolate minor species against major species and that populations subjected to strong stress conditions may go into a viable but non-culturable state that prevents their detection (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). In fact, the current application of direct molecular methods for ecological analysis has revealed the tremendous diversity of microorganisms in various habitats that were not previously detected by plating methods (Pace, 1997) even in the oenological environment. Mills *et al.* (2002) used RT-PCR-DGGE analysis to detect an active *Hanseniaspora osmophila* population of over 10^4 cells per mL throughout fermentation that had gone unnoticed by CFU analysis.

In our present study, the correlation between quantification by plating and quantification by QPCR in alcoholic fermentation samples was good but with some divergences. The total-yeast counts of the must and clear-must samples were much higher with QPCR than with plating (YEPD-agar). This may be due to a large presence of viable but non-culturable (VBNC) populations in the must or to an overestimation of yeasts by the amplification of DNA from dead yeast cells. A comparison of *Hanseniaspora* quantification by QPCR and non-*Saccharomyces* quantification in lysine-agar showed that *Hanseniaspora* represented practically 100% of the non-*Saccharomyces* strains in

the must and clear-must samples, but this relative importance decreased in the fermentation samples. No CFU was detected in samples of the final fermentation or wine in the lysine-agar medium, whereas a *Hanseniaspora* population of approximately 10^4 cells mL⁻¹ was quantified by QPCR. As we mentioned earlier, this divergence may be due to the amplification of dead cells or the inability of these cells to be cultured in a solid medium. In our previous study (Hierro *et al.*, 2006b), we used the reverse transcription of the 26S ribosomal RNA as a template for the QPCR reaction as a better indicator of cell viability than the detection of DNA (Sheridan *et al.*, 1998). However, this strategy can't be used with the primers designed in this study. The reverse specific primers for both species were complementary to sequences of the ITS2 and this region is rapidly processed and eliminated from the mature ribosomal RNA. It is therefore impossible to obtain a reverse transcript or cDNA of this region for further amplification. We are currently assaying a promising and easy-to-use alternative method to RNA-based quantification that uses the DNA-intercalating dye ethidium monoazide bromide (EMA) (Nocker & Camper, 2006).

We would like to stress that we have been able to quantify the *Saccharomyces* population from the must to the wine. This population has so far been difficult to quantify by plating in the first phases of fermentation because of the major presence of the non-*Saccharomyces* strains. Our results also showed that *Saccharomyces* strains were the most competitive ones in the process, increasing their population by four orders of magnitude in a few days. The toxicity of ethanol and other metabolites was also revealed by a decrease in this population in the later phases of the process. The increase in the *Saccharomyces* population also matched a large decrease in the *Hanseniaspora* population. The mechanism involved in the early elimination of the non-*Saccharomyces* strains has recently been studied (Pérez-Nevaldo *et al.*, 2006) and it seems that this mechanism is independent of the concentration of ethanol or nutrients. These authors showed that the death of *Hanseniaspora* strains during mixed fermentations with *S. cerevisiae* always began when the *S. cerevisiae* population reached a cell density of around 10^7 CFU mL⁻¹,

regardless of the ethanol concentration. Conversely, the number of viable cells in *Hanseniaspora* single cultures remained high (10^7 - 10^8 CFU mL⁻¹) even when the ethanol concentrations of cultures were significant (up to 60-70 g L⁻¹).

Several authors have suggested that some non-*Saccharomyces* species, e.g. those of *Hanseniaspora*, have a better chance of growing at low temperature than *Saccharomyces* (Sharf & Margalith, 1983; Heard & Fleet, 1988). Our results support this hypothesis because the counts of *Saccharomyces* were always higher at 25°C, while the counts of *Hanseniaspora* were higher at 13°C. However, other non-*Saccharomyces* species may also have been actively growing in the low-temperature fermentation because the decrease in the *Saccharomyces* population was not accounted for by the increase in the *Hanseniaspora* population. Low-temperature fermentation has been associated with an enhancement of aroma in the final wines. It has recently been shown that low temperatures modify the metabolism of *Saccharomyces*, thus increasing the synthesis of some aroma compounds (Beltran *et al.*, 2006). However this aroma enhancement may also be explained by a major contribution of the non-*Saccharomyces* species throughout wine fermentation.

In conclusion, QPCR is a fast, direct (without culture), sensitive, and reliable technique for quantifying wine yeasts. This method has so far been applied for the enumeration of total yeasts (Hierro *et al.*, 2006b) and individual yeasts (Phister & Mills, 2003; Martorell *et al.*, 2005; Rawsthorne & Phister, 2007). The design of new primers for other important wine yeast species will enable yeast diversity to be monitored during industrial wine fermentation and determine the main spoilage yeasts in wine. An important drawback of quantification using DNA as the template, however, is that live and dead cells are not differentiated. Therefore, to overcome this problem alternative strategies are needed in future studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant AGL2004-02307/ALI from the Spanish Government. We thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

5. REFERENCES

- Angelo J & Siebert KJ (1987) A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J Am Soc Brew Chem* 45: 135-140.
- Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamon JM, Rozes N & Mas A (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 25: 287-293.
- Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamon JM, 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.
- Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MCL, Bowen MD, Meyer RF & DePaola A (2003) Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Methods* 53: 149-155.
- Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F & Torriani S (2003) Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl Environ Microbiol* 69: 4116-4122.
- Capece A, Fiore C, Maraz A & Romano P (2005) Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J Appl Microbiol* 98: 136-144.
- Cocolin L, Bisson LF & Mills DA (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 189: 81-87.

- Delaherche A, Claisse O & Lonvaud-Funel A (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 97: 910-915
- Fleet GH (1993) The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Fleet, G.H. ed.), pp 1-27. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet GH & Heard GM (1993) Yeasts-growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Fleet, G.H. Ed), pp 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- González A, Hierro N, Poblet M, Mas A & Guillamón JM (2006) Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCRA and nested-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 254: 123-128.
- Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J & Querol A (1998) Rapid identification of wine species based on RFLP analysis of the ribosomal its regions. *Arch Microbiol* 169: 387-392.
- Haarman M & Knol J (2005) Quantitative Real-Time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 71: 2318-2324.
- Heard GM & Fleet GH (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J Appl Bacteriol* 65: 23-28.
- Hein I, Lehner A, Rieck P, Klein K, Brandl E & Wagner M (2001) Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl Environ Microbiol* 67: 3122-3126.
- Hierro N, Gonzalez A, Mas A & Guillamón JM (2006a) Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentations: Effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res* 6: 102-111.

- Hierro N, Esteve-Zarzoso B, Gonzalez A, Mas A & Guillamón JM. (2006b) Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl Environ Microbiol* 72: 7148-7155.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Ibeas JI, Lozano F, Perdignes F & Jimenez J (1996) Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol* 62: 998-1003.
- Martorell P, Querol A & Fernández-Espinar MT (2005) Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* species directly from wine by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71: 6823-6830.
- Millet V & Lonvaud-Funel A. (2000) The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett Appl Microbiol* 30: 136-141.
- Mills DA, Johannsen EA & Cocolin L (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl Environ Microbiol* 68: 4884-4893.
- Nocker A & Camper AK (2006) Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* 72: 1997-2004.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T & Girio F (2006) Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 108: 336-345.
- Phister TG & Mills DA (2003) Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Environ Microbiol* 69: 7430-7434.
- Pinzani P, Bonciani L, Pazzagli M, Orlando C, Guerrini S & Granchi L (2004) Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett Appl Microbiol* 38: 118-124.

- Pretorius I (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Querol A, Barrio E & Ramón D (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst Appl Microbiol* 15: 439-446.
- Rawsthorne H & Phister TG (2006) A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *Int J Food Microbiol* 122: 1-7.
- 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.
- Sabaté J, Cano J, Esteve-Zarzoso B & Guillamón JM (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res* 157: 267-274.
- Sharf R & Margalith P (1983) The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 17: 311-313.
- Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA & Mackey BM (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol* 64: 1313-1318.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

DISCUSSIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

Els llevats no-*Saccharomyces* són de gran importància durant el procés fermentatiu perquè poden aportar una millora qualitativa al vi, augmentant la complexitat aromàtica d'aquest o poden actuar de manera perjudicial, conferint al vi greus defectes tant aromàtics com gustatius. Però l'interès per aquests llevats en Enologia ha estat escàs degut a què són espècies minoritàries durant la fermentació alcohòlica. Aquestes només tenen certa importància al principi de la vinificació i el principal protagonista és *S. cerevisiae*, que esdevé el llevat conductor de la fermentació alcohòlica. És per aquest motiu, que la majoria de tècniques de caracterització, identificació i enumeració desenvolupades i d'estudis ecològics realitzats han estat enfocats a l'espècie majoritària durant la fermentació, *S. cerevisiae*. A excepció d'algunes espècies com *D.bruxellensis*, que ha tingut una atenció especial degut a les greus alteracions organolèptiques que és capaç de produir.

Tenir un coneixement més detallat de tot el procés de vinificació ens pot portar a la introducció de millores en el procés de producció i a resoldre possibles problemes derivats de l'acció dels llevats i d'aquesta manera augmentar la qualitat del vi. Per tant, aprofundir en el coneixement dels llevats no-*Saccharomyces* resulta imprescindible. En conseqüència, és necessari disposar d'unes tècniques per detectar, identificar i quantificar llevats no-*Saccharomyces* de manera ràpida i senzilla i poder aplicar aquestes tècniques de manera efectiva en estudis de dinàmica poblacional. I aquest va ser l'objectiu general d'aquesta tesi.

De manera més específica, el nostre primer objectiu va ser desenvolupar i validar tècniques moleculars ràpides i senzilles que ens permetessin la caracterització i identificació de llevats no-*Saccharomyces* a nivell d'espècie i també de soca. En taxonomia microbiana, la unitat taxonòmica bàsica és l'espècie. Per tant, per classificar taxonòmicament un microorganisme aïllat, el nivell més baix a què podem agrupar-lo és l'espècie. Però l'aparició de tècniques d'anàlisi molecular aporten nova informació que permeten la definició de nous criteris d'agrupació

com són les soques. La detecció de polimorfismes per sota del nivell d'espècie ens permet d'obtenir informació sobre aspectes ecològics (origen de les soques, seguiment i modificacions en les poblacions) i també obtenir informació d'interès tecnològic.

L'interès pels llevats no-*Saccharomyces* radica en la seva facultat per produir compostos volàtils i sintetitzar enzims durant el procés de vinificació, però aquestes capacitats presenten gran heterogeneïtat entre les diferents soques d'una mateixa espècie com s'ha demostrat en múltiples estudis (Federici, 1983; Romano *et al.*, 1996; 1997; Egli *et al.*, 1998; Henick-Kling *et al.*, 1998). Per tant, és necessari disposar de mètodes que ens permetin discriminar a nivell d'espècie però també a nivell de soca, i poder identificar aquelles soques capaces de produir compostos d'interès industrial. Conèixer exactament quins són aquells llevats no-*Saccharomyces* que provoquen les anomalies organolèptiques més importants i poder aplicar a temps mesures correctives i de la mateixa manera, també conèixer quines són aquelles soques que aporten al vi una millora qualitativa per tal de poder utilitzar-les en fermentacions mixtes i aconseguir vins amb una complexitat aromàtica que difícilment s'aconseguiria amb la utilització de *S. cerevisiae* com a únic inòcul.

Actualment, entre les tècniques admeses per a la classificació taxonòmica d'espècies tenim la seqüenciació i la hibridació DNA-DNA. Aquestes tècniques, encara que força utilitzades en la identificació de llevats són massa complexes i tedioses per ser utilitzades de manera rutinària en estudis de diversitat poblacional de llevats. Entre les alternatives útils per a ser emprades a nivell rutinari, està la tècnica de l'anàlisi de perfils restricció (RFLPs) del rDNA. Aquesta tècnica, encara que fiable i senzilla, presenta una metodologia que pot resultar massa llarga per estudiar la diversitat microbiana i monitoritzar canvis en la població durant una fermentació alcohòlica. Els dos passos necessaris per a la realització de la tècnica RFLPs, una amplificació mitjançant PCR i posterior digestió amb diversos enzims de restricció, queden reduïts a un sol pas amb les

tècniques PCR-ISS, ERIC-PCR i REP-PCR desenvolupades en aquesta tesi. Amb una reacció de PCR obtenim uns perfils d'amplificació simples que ens permeten distingir sense problemes les diferents espècies de llevats víncics. Per tant, les tècniques PCR-ISS, ERIC-PCR i REP-PCR esdevenen una millor alternativa per a la identificació d'espècies no-*Saccharomyces* que els RFLPs. No obstant, problemes de reproduïbilitat de la tècnica REP-PCR desaconsellen la utilització d'aquesta com a mètode rutinari d'identificació.

L'anàlisi de perfils restricció (RFLPs) també ha estat utilitzat per diferenciar algunes espècies pertanyents al grup *Saccharomyces sensu stricto*. Guillamón *et al.* (1998) va utilitzar aquesta tècnica per distingir entre *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *S. pastorianus*, però sense poder separar *S. bayanus* i *S. pastorianus* i amb tan sols un dels tres enzims de restricció utilitzats, el *HaeIII*, aconseguia diferenciar *S. cerevisiae* de les altres dues espècies. Posteriorment, Fernández-Espinar *et al.* (2000) van utilitzar un nombre major d'enzims (*AluI*, *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaII*, *NdeI* i *SrfI*) però amb el mateix resultat, tan sols l'enzim *HaeIII* presentava poder de discriminació. En canvi, tant amb la tècnica PCR-ISS com amb la ERIC-PCR, amb tan sols una reacció de PCR s'obtenen perfils d'amplificació que difereixen totalment entre *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, essent així la identificació de cada una d'aquestes espècies senzilla, inconfusible i ràpida. Restaria analitzar si amb aquestes dues tècniques seriem també capaços de diferenciar entre *S. bayanus* i *S. pastorianus*, tal com aconsegueixen Fernández-Espinar *et al.* (2003) amb la tècnica RAPD-PCR.

Encara que amb la identificació a nivell d'espècie queda demostrat que PCR-ISS i ERIC-PCR són una bona alternativa a les tècniques existents, no hem d'oblidar que el nostre objectiu era el desenvolupament de tècniques que ens permetessin arribar a un grau més de discriminació, diferenciar soques d'una mateixa espècie no-*Saccharomyces*. La tècnica PCR-ISS desenvolupada per De Barros *et al.* (1996; 1998) permetia amb un sol pas detectar certa

variabilitat intraespecífica de determinats llevats (*S. cerevisiae* i *H. uvarum*). Per tant, vam considerar interessant aplicar aquesta tècnica per a la identificació de soques de llevats no-*Saccharomyces*. Però, malauradament, no aconseguirem tenir èxit amb totes les soques no-*Saccharomyces* avaluades. Tan sols érem capaços de diferenciar soques de les espècies *C. boidinii*, *C. stellata*, *I. terricola*, *S. bayanus*, *H. uvarum* i *Z. rouxii*. Per altra banda, les tècniques ERIC-PCR i REP-PCR havien estat utilitzades amb èxit per a identificar soques de diversos grups de bacteris (Nanda *et al.*, 2001; González *et al.*, 2004). Per aquest motiu vam decidir desenvolupar aquestes dues tècniques per a la caracterització i identificació de soques de llevats vínics. El resultat obtingut no fou l'esperat. Amb la tècnica REP-PCR no va ser possible la diferenciació de soques d'una mateixa espècie i amb la tècnica ERIC-PCR, tan sols en algunes espècies (*C. boidinii*, *C. stellata* i *I. terricola*) es va poder diferenciar soques. Per tant, podem concloure que les tècniques PCR-ISS, ERIC-PCR i REP-PCR són efectives, ràpides i senzilles per a la identificació d'espècies de llevats no-*Saccharomyces*, però no són totalment resolutives per a la identificació a nivell de soca d'aquests llevats.

No obstant la seva limitació, la PCR-ISS i la ERIC-PCR esdevindrien una millor opció a l'hora de caracteritzar i identificar soques de determinats llevats no-*Saccharomyces* que algunes de les tècniques existents en l'actualitat, les quals es podrien descartar com a tècniques d'aplicació rutinària per ser massa complexes i tedioses, com és el cas de l'anàlisi de cariotip o per mostrar problemes de reproduïbilitat com la tècnica RAPD-PCR. Ni la PCR-ISS ni la ERIC-PCR presenten cap d'aquests inconvenients; són ràpides, simples, reproduïbles i no és necessari un coneixement previ de la seqüència per poder aplicar-les. L'anàlisi de restricció del mtDNA també podria ser una alternativa senzilla per a la identificació a nivell de soca, però tal com succeeix amb PCR-ISS i ERIC-PCR, no és eficient en totes les espècies de llevats no-*Saccharomyces* (Pramateftaki *et al.*, 2000). Així, queda palesa la mancança d'una tècnica ideal que permeti la identificació a nivell de soca de totes les espècies no-*Saccharomyces*. Un treball futur a realitzar

seria el desenvolupament d'aquesta tècnica. Els microsatèl·lits i la tècnica AFLPs podrien esdevenir una bona opció, ja que s'han realitzat amb èxit alguns treballs d'identificació de soques d'algunes espècies no-*Saccharomyces* (Caruso *et al.* 2002; Capece *et al.* 2003; De Barros Lopes *et al.*, 1999; Flores Berrios *et al.*, 2005; Curtin *et al.*, 2007). Actualment, el nostre grup de treball està treballant en el desenvolupament de la tècnica AFLPs per a la identificació a nivell de soca de llevats no-*Saccharomyces* amb uns resultats força prometedors. S'han aconseguit notables millores de la tècnica com la reducció del temps d'anàlisi i la simplificació en l'obtenció de resultats.

En la identificació de llevats amb les tècniques PCR-ISS i ERIC-PCR, cal remarcar un fet molt interessant i que pot esdevenir força útil. Els patrons d'amplificació que obtenim amb aquestes tècniques són diferents per a cadascuna de les soques, però presenten unes bandes específiques comunes a l'espècie. Aquestes bandes es podrien seqüenciar i utilitzar com a seqüència diana per a la detecció i quantificació de manera específica d'aquestes espècies mitjançant PCR a temps real. O també es podrien utilitzar per al disseny de sondes de DNA. Aquestes sondes marcades amb un fluorocrom serien útils per a la identificació d'aquests llevats amb la tècnica FISH, permetent així la identificació simultània de múltiples espècies en una mescla de poblacions.

El següent pas després de desenvolupar tècniques per a la caracterització i identificació de llevats no-*Saccharomyces*, va ser validar la utilitat d'aquestes tècniques en l'anàlisi de la dinàmica poblacional. Per això, es van aplicar les tècniques PCR-ISS i ERIC-PCR en l'estudi de l'evolució de les diferents soques i espècies de llevats al llarg de la fermentació alcohòlica analitzant l'efecte de la maduració del raïm i l'efecte de la maceració pel·licular en fred sobre aquestes poblacions de llevats.

En aquest estudi ecològic realitzat, per una banda hem comprovat la validesa de les tècniques PCR-ISS i ERIC-PCR en l'anàlisi de mostres reals i per altra banda, hem confirmat que la presència de llevats no-*Saccharomyces* no tan sols es produeix durant els primers estadis de la fermentació alcohòlica sinó que en estadis avançats també trobem una important presència d'aquests llevats tal com s'apuntava en altres estudis ecològics (Ciani i Picciotti, 1995; Torija *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2002). Per tant, la influència dels llevats no-*Saccharomyces* en la composició qualitativa del vi, no tan sols es dona al principi de la fermentació. L'existència d'aquests llevats al final del procés de vinificació segurament també exerceix alguna influència en la composició aromàtica i per tant, s'haurien de tenir en compte quines són les espècies majoritàries (i també quines soques) en aquest últim tram de la fermentació i quin efecte, ja sigui positiu o bé negatiu, tenen sobre el producte final. Aquesta seria una informació molt útil per tal de tenir un major control sobre la fermentació. Així mateix, la recent descoberta de noves espècies aïllades per primera vegada en el vi, com *Candida zemplinina* (Sipicki, 2003), *Candida hyderabadensis* (Rao *et al.*, 2007) o *Issatchenkia hanoiensis*, aïllada en l'estudi ecològic realitzat en aquesta tesi (capítol 2); demostren la escassetat d'estudis poblacionals sobre llevats no-*Saccharomyces*. Aquest fet deixa al descobert aspectes encara no abordats en el món de l'enologia, com són la selecció d'aquelles soques no-*Saccharomyces* que influencien positivament en l'aroma del vi i així poder posteriorment aprofitar el seu potencial en fermentacions mixtes. En aquestes fermentacions mixtes, seria important poder controlar que realment les soques de *S.cerevisiae* i no-*Saccharomyces* inoculades s'imposen durant el transcurs de la vinificació. Fins ara, per determinar la imposició de la soca de *S.cerevisiae* inoculada s'utilitza, per la seva rapidesa i fiabilitat, l'anàlisi de restricció del mtDNA (Querol *et al.*, 1990, 1992). Però aquesta tècnica, encara que utilitzada amb èxit per a la identificació de soques d'algunes espècies no-*Saccharomyces* (Ibeas *et al.*, 1996; Guillamón *et al.*, 1997; Esteve-Zaroso *et al.*, 2003), no és vàlida per a la caracterització de totes les espècies de llevats no-*Saccharomyces*. Espècies tan importants com *H. uvarum* per la seva capacitat de síntesi de

compostos volàtils i producció d'enzims (Romano *et al.*, 1996; 1997; Manzanares *et al.*, 1999, 2000), no és possible identificar a nivell de soca mitjançant l'anàlisi de restricció del mtDNA (Pramateftaki *et al.*, 2000). En canvi, amb la PCR-ISS les diferents soques de *H. uvarum* es poden diferenciar fàcilment. De la mateixa manera, un altre dels llevats més proposats per a la realització de fermentacions mixtes com és *C.stellata* (Soden *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003; Ciani i Comitini, 2006), també podria ser identificat a nivell de soca tant amb la tècnica PCR-ISS com amb la ERIC-PCR.

La realització d'un estudi ecològic de vinificacions amb diferents condicions de fermentació no tan sols es realitzava per validar les tècniques de caracterització i identificació desenvolupades, també responia a un interès per estudiar l'efecte que pot tenir el grau de maduració del raïm i la pràctica de la maceració en fred sobre la dinàmica poblacional de la fermentació alcohòlica. No podem arribar a conclusions molt clares de com afecta el grau de maduració del raïm en la fermentació. En principi es podria afirmar que no hi ha diferències significatives ni en cinètica fermentativa ni en diversitat microbiològica entre els diferents graus de maduració. Però aquestes conclusions podrien ser relatives ja que per problemes climàtics, les diferències en els temps de verema de les tres vinificacions no van ser molt grans. Tot i això, cal destacar que la fermentació amb raïm sobremadur és la que presenta major diversitat microbiològica respecte a les altres fermentacions i que únicament en aquesta fermentació es van aïllar les espècies *H.osmophila*, *Z.hellenicus* i *I.occidentalis*. Quant a la maceració en fred, podem concloure que aquesta pràctica no modifica la microbiota existent. Les tres espècies no-*Saccharomyces* majoritàries continuen sent *C.stellata*, *H.uvarum* i *H.osmophila*. Un fet força curiós, és que durant el període de maceració en fred no hi ha un descens en la població de llevats no-*Saccharomyces*, a excepció potser de la fermentació realitzada amb raïm verd. No es produeix una disminució d'aquesta població fins a la inoculació de *S.cerevisiae* al setè dia. Això podria confirmar la tolerància a baixes temperatures dels llevats no-*Saccharomyces*. Però el fet més

interessant observat en tot l'estudi ecològic, és que encara que totes sis fermentacions van ser sulfitades (40 mg/L de SO₂), no es produeix una supressió total dels llevats no-*Saccharomyces*. Algunes espècies d'aquests llevats van sobreviure a l'addició de SO₂ i a la imposició de la soca *S.cerevisiae* inoculada.

El segon objectiu d'aquesta tesi fou desenvolupar i validar un mètode de detecció i quantificació de llevats vínics sense la necessitat de creixement en placa. Es va desenvolupar la PCR a temps real per a la quantificació de llevats totals, *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. amb uns límits de detecció força bons (10³ cèl./ml per a llevats totals i 10² cèl./ml per a *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp.), encara que no tant com els obtinguts en altres treballs. Phister i Mills (2003) en la quantificació de *D.bruxellensis* van arribar a detectar fins a 1 cèl./ml i Martorell *et al.* (2005) amb *S.cerevisiae* van aconseguir nivells de detecció de tan sols 5 cèl./ml. Després d'haver desenvolupat amb èxit la QPCR, el següent pas era avaluar si aquesta tècnica era vàlida per aplicar en mostres víniques reals. Es van quantificar llevats totals, *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. de diverses mostres de diferents vinificacions en blanc i en negre i també de diverses barriques. En tots els casos, els valors obtinguts per QPCR respecte a aquells obtinguts per creixement en placa, presentaven una bona correlació. En aquest punt, cal esmentar que la determinació de microorganismes directament de vi podria portar certs problemes degut a la complexa matriu que és el vi i de manera especial el vi negre. Els compostos fenòlics presents en el vi són inhibidors de la PCR i perquè no suposin un problema en la quantificació es podria utilitzar PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) per tal d'eliminar-los. En el nostre cas, en la determinació de llevats totals observem cert efecte de la matriu vínica però no inhibint la reacció de PCR (ja que obtenim eficiències similars), sinó interferint amb el procés d'extracció de DNA. Tenint present aquest fet, la quantificació de llevats totals s'hauria de realitzar sempre amb una recta patró construïda amb la mateixa matriu vínica que la mostra problema per així controlar

l'efecte de la matriu sense la necessitat de tractaments previs de la mostra amb PVPP que allargarien el temps d'anàlisi.

Una particularitat de la tècnica RT-QPCR desenvolupada per a la detecció i quantificació de llevats totals viables, és fer servir rDNA enlloc de mRNA. Per una banda, es podria pensar que utilitzar una molècula molt més estable que el mRNA (vida mitjana de 20 minuts) podria dur a errors de sobreestimació en els recomptes de cèl·lules viables. Mitjançant la realització d'un tractament de xoc tèrmic es va demostrar que el rRNA era menys estable que el rDNA però més estable que el mRNA, ja que fins 24 hores el rRNA no es va degradar. No obstant, hem de dir que aquest fet no suposa un contratemps ja que en enologia 24 hores no suposa un temps excessiu degut a què molts processos són molt més llargs que un dia, com és el cas de l'envelliment. En qualsevol cas, els nostres resultats mostren una bona correlació entre la quantificació de llevats mitjançant creixement en placa i mitjançant RT-QPCR i per tant, considerem la utilització de 26S rRNA per a la quantificació de viables com a correcta, encara que puguem tenir certes fluctuacions en els valors de Ct. Aquesta mateixa estratègia no va ser possible per a la quantificació de *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. ja que vam dissenyar un parell de primers, un homòleg a la regió conservada 5.8S rRNA i l'altre homòleg a la regió intergènica ITS2, que ens impossibilita l'obtenció de cDNA d'aquesta regió. Per tant, l'única opció per quantificar viables seria utilitzar altres mètodes de quantificació com són l'epifluorescència, la citometria de flux i la impedància. Aquestes tècniques, encara que utilitzades en la quantificació de llevats obtenint resultats altament reproduïbles (Millet i Lonvaud-Funel, 2000; Malacrino *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2004), presenten l'inconvenient de no poder quantificar les diferents espècies de llevats existents en una mateixa mostra. A més, l'anàlisi d'impedància presenta una altra limitació degut a què aquesta tècnica es basa en la mesura de l'activitat metabòlica de manera indirecta. Així que, la quantificació dels llevats està en funció de les tasses específiques de creixement que posseeixen els diferents llevats. Per tant, la millor

alternativa per enumerar diferents llevats viables en una mateixa mostra, seria combinar la tècnica QPCR amb l'ús d'un agent intercalant anomenat EMA (ethidium monoazide bromide) el qual només penetra en cèl·lules mortes unint-se al DNA i en conseqüència inhibint la posterior amplificació per PCR. Aquesta tècnica QPCR-EMA ha estat emprada únicament en la quantificació de bacteris (Rudi *et al.*, 2005a, b; Lee i Levin, 2006), però es podria avaluar la seva utilitat en llevats i esdevenir així una alternativa a la tècnica RT-QPCR. Amb aquesta millora en la quantificació de microorganismes viables es podria ampliar la detecció de microorganismes del vi dissenyant sondes específiques per a altres llevats vínics d'interès com és *C. stellata* o per a la quantificació d'espècies de llevats alterants com *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces...* o per a la detecció de determinades espècies de bacteries acètiques i làctiques. Amb això obtindríem una tècnica de gran eficiència i sensibilitat per a l'anàlisi i control microbiològic de mostos i vins i amb la que es podrien realitzar diversos estudis sobre determinades pràctiques enològiques com l'efecte de diferents antimicrobians del vi (SO₂, sòrbic, liozima...) sobre les poblacions dels principals microorganismes implicats en la fermentació alcohòlica, ja que s'ha postulat que l'addició de SO₂ no elimina la població de determinats microorganismes com *Brettanomyces* o bacteries acètiques, sinó que els manté en un estat viable però no cultivable (Du Toit *et al.*, 2005).

Totes les tècniques descrites en aquesta tesis han estat desenvolupades per a la detecció, identificació i quantificació de llevats en el vi; però la importància dels llevats no només radica en la indústria enològica. Els llevats també són de gran rellevància en altres disciplines com per exemple la tecnologia dels aliments, ja sigui bé pel seu paper com a productors com pel seu paper contaminant. Per tant, és important poder detectar, identificar i quantificar els llevats en una mostra alimentària tant per veure el paper que tenen aquests en l'aliment com per poder estimar el risc de contaminació. *S.cerevisiae* i determinades espècies de no-*Saccharomyces* (*D.bruxellensis*, *I.orientalis*, *Z.baillii*, *T.delbrueckii...*) han estat descrites com a llevats alterants

d'aliments (Tudor and Board, 1993). Tampoc podem oblidar l'existència d'un gran nombre de llevats patògens com són *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anomala*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula* spp. etc. I també hem de tenir en compte que els llevats estan considerats indicadors de qualitat ambiental (Hagler, 2006). Per tant, les tècniques d'identificació i quantificació de llevats vínics desenvolupades en aquesta tesi, podrien també aplicar-se amb èxit en totes aquestes altres disciplines tal com ja han fet alguns autors. Brinkman *et al.* (2003) va utilitzar la PCR a temps real per a la detecció i quantificació de llevats clínics i Bleve *et al.* (2003) per a la quantificació de llevats en aliments.

En conclusió, hem desenvolupat i validat un seguit de tècniques ràpides, fiables i sensibles que ens permeten identificar llevats vínics a nivell d'espècie i en algun cas a nivell de soca, i quantificar i detectar la seva presència en vi sense necessitat de creixement en placa. D'aquesta manera, posem en disposició de la indústria enològica un seguit d'instruments que faciliten un major control microbiològic de la fermentació alcohòlica i així preveure possibles dificultats durant la vinificació i actuar a temps per evitar-les. En aquesta tesi, hem donat resposta a alguns punts no tractats en enologia que ens havíem proposat resoldre i a la vegada, hem destapat altres aspectes importants encara a cobrir obrint les portes a futures línies d'investigació.

Referències

- Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. (2003) Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4116-4122.
- Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman, and S. J. Vesper. (2003) Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1775-1782.

- Capece, A., Salzano, G. and Romano, P. (2003). Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 33-39.
- Caruso, M. Capece, A., Salzano, G. and Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 323-328.
- Ciani, M. and Comitini, F. (2006). Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotech.* 22, 619-623.
- Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making process. *Biotechnol. Lett.* 17, 1247-1250.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W. and de Barros, M.A: (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* (*in press*).
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4514-4520.
- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Martens, A. L., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 279-286.
- De Barros Lopes, M. A., Rainieri, S., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 915-924.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.J. and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pastorianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862-871.

- Egli, C. M., Efinger, W. D., Mittrakul, C. M. and Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789.
- Esteve-Zarzoso, B., Zoman, T., Belloch, C., and Querol, A. (2003). Molecular characterization of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 404-411.
- Federici, F. (1983). Extracellular enzymes production in yeasts. *Ann. Microbiol.* 33, 93-97.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78, 87-97.
- Fernandez-Espinar, M.T., Barrio, E. and Querol, A. (2003). Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* 20, 1213-1226.
- Flores Berrios, E.P., Alba Gonzalez, J.F., Arrizon Gavino, J.P., Romano, P., Capece, A. and Gschaedler Mathis, A. (2005). The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 147-152.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 96, 853-860.
- Guillamón, J. M., Sánchez, I. and Huerta, T. (1997) Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 267-272.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine species based on RFLP analysis of the ribosomal its regions. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.

- Hagler, A.N. (2006). Yeasts as indicators of environmental quality. In Biodiversity and Ecophysiology of yeasts. Ed: Carlos E. Rosa and Gábor Péter. Publisher Springer Berlin Heidelberg. pp:515-532.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84, 865-876.
- Ibeas, J., Lozano, J., Perdignes, L. and Jiménez, J. (1996). Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. Appl. Environ. Microbiol. 62, 998-1003.
- Lee, J.L. and Levin, R.E. (2006). Use of ethidium monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods. 67, 456-462.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S. and Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. J. Microbiol. Methods. 45, 127-134.
- Manzanares, P., Ramón, D. and Querol, A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. Int. J. Food Microbiol. 46, 105-112.
- Manzanares, P., Rojas, V. Genovés, S. and Vallés, S. (2000). A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int. J. Food Sci. Technol. 35, 95-103.
- Martínez, M., Yuste, M., Esteve, B., Álvarez, J.F., Cantarero, J., Bobet, R. and Rubires, X. (2004). Application de l'impédance électrique pour le contrôle microbiologique des vins embouteillés. Rev. Fr. Oenol. 205, 123-128.
- Martorell, P., Querol, A. and Fernández-Espinar, M. T. (2005). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* species directly from wine by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6823-6830.

- Millet, V., and A. Lonvaud-Funel (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136-141.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. and Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884-4893.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. and Murooka, Y. (2001) Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 986-990.
- Phister, T.G., and Mills, D.A.. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430-7434.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. and Typas, M.A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* 89, 236-248.
- Querol, A. and Barrio, E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 18, 1657.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Rao, R.S., Bhadra, B., Kumar, N.N. and Shivaji, S. (2007). *Candida hyderabadensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from wine grapes. *FEMS Yeast Res.* (in press).
- Romano, P. and Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 309-315.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. and Maifreni, M. (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 82, 615-618.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180.

- Rudi, K., Moen, B., Drómtorp, S.M. and Holck, A.L. (2005a). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1018-1024.
- Rudi, K., Naterstad, K., Drómtorp, S.M and Holo, H. (2005b). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 301-306.
- Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2079-2083.
- Soden, A., Francis, I. L., Oackey, H. and Henschke, P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21-30.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: a comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 345-352.
- Tudor, E.A. and Board, R.G. (1993). Food-spoilage yeasts. In *The Yeasts*, vol 5: Yeast Technology. Ed A.H. Rose and J.S. Harrison. 2nd edn., Academic Press, pp: 435-516.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

CONCLUSIONS GENERALS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

1. Les tècniques PCR-ISS, ERIC-PCR i REP-PCR són útils per a la caracterització i identificació de llevats a nivell d'espècie. Aquestes tècniques són ràpides, senzilles i fiables.
2. S'ha demostrat que aquestes tres tècniques són més ràpides i simples que altres tècniques utilitzades en la diferenciació d'espècies com l'anàlisi dels perfils de restricció (RFLPs) del rDNA.
3. És la primera vegada que oligonucleòtids dissenyats per l'amplificació d'elements repetitius en bacteris han estat utilitzats amb èxit en la identificació i tipificació de llevats.
4. Aquestes tècniques no són totalment efectives per diferenciar soques d'una mateixa espècie. No obstant, la tècnica ERIC-PCR ens permet detectar polimorfismes intraespecífics en les espècies *Candida boidinii*, *Candida stellata* i *Issatchenkia terricola*. I amb la tècnica PCR-ISS també detectem variabilitat intraespecífica en aquestes espècies i a més en *Saccharomyces bayanus*, *Hanseniaspora uvarum* i *Zygosaccharomyces rouxii*.
5. Les tècniques PCR-ISS i ERIC-PCR han mostrat també ser efectives en la diferenciació de llevats aïllats d'una fermentació alcohòlica i per tant, poden ser aplicades en anàlisis rutinaris d'identificació de llevats.
6. Hem desenvolupat la tècnica de la PCR a temps real (QPCR) per a la detecció i quantificació de llevats totals, *Saccharomyces* spp. i *Hanseniaspora* spp. de manera ràpida i exacta.

7. També s'ha desenvolupat amb èxit la tècnica RT-QPCR per enumerar llevats totals viables mitjançant la detecció de cDNA sintetitzat a partir del 26S rRNA.
8. Tant la tècnica QPCR com la RT-QPCR desenvolupades han mostrat ser eficients per a la detecció i quantificació de llevats directament de mostres víniques sense la necessitat de realitzar creixement previ en medi de cultiu.
9. En els estudis ecològics realitzats, s'ha vist que no existeix una supressió total de llevats no-*Saccharomyces* durant la fermentació alcohòlica. En alguns casos, a meitat i final de la fermentació s'observa una població considerablement superior a la descrita de forma general en altres estudis.
10. La pràctica de la maceració en fred no modifica la diversitat i evolució de les espècies que es produeix durant la fermentació alcohòlica.
11. Amb la tècnica QPCR hem pogut quantificar poblacions de *Saccharomyces* en el most. Aquesta detecció és difícil realitzar-la amb altres tècniques degut a la presència majoritària dels llevats no-*Saccharomyces* respecte a *Saccharomyces*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ANNEX 1

Material i Mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ÍNDEX

1. Medis de cultiu.	
1.1. YEPD.....	225
1.2. YEPD-agar.....	225
1.3. Medi Agar-Lisina.....	225
2. Seguiment de les fermentacions i les poblacions de llevats.	
2.1. Mesura de la densitat.....	226
2.2. Mesura de la densitat òptica.....	226
2.3. Recompte de llevats totals.....	227
2.4. Recompte de viables.....	227
3. Extracció i purificació d'àcids nucleics.	
3.1. Extracció de DNA (Querol <i>et al.</i> , 1992).	
3.1.1. Reactius necessaris.....	228
3.1.2. Protocol d'extracció.....	228
3.2. Extracció de DNA mitjançant trencament mecànic.....	229
3.3. Purificació de DNA.....	229
3.4. Extracció de RNA (Sierkstra <i>et al.</i> , 1992).	
3.4.1. Reactius necessaris.....	229
3.4.2. Preparació H ₂ O-DEPC.....	230
3.4.3. Protocol d'extracció.....	230
3.5. Purificació de RNA.....	231
4. Tècniques de Biologia Molecular.	
4.1. Anàlisi perfils de restricció (RFLPs) del rDNA (Guillamón <i>et al.</i> , 1998).	
4.1.1. Realització de PCR.....	231
4.1.2. Digestió de l'amplificat.....	232

4.1.3. Electroforesi.....	233
4.2. PCR-ISS (PCR-Intron splice sites). (De Barros <i>et al.</i> 1996).	
4.2.1. Realització de PCR.....	233
4.2.2. Electroforesi.....	234
4.3. REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR).	
4.3.1 Realització de PCR.....	234
4.3.2. Preparació tampó GB 5x (Kogan <i>et al.</i> 1987).....	235
4.3.3. Electroforesi.....	236
4.4. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus -PCR).	
4.4.1 Realització de PCR.....	236
4.4.2. Electroforesi.....	237
4.5. Anàlisi del domini D1/D2 de la regió ribosomal (Kurtzman i Robnett, 1998).	
4.5.1 Realització de PCR.....	237
4.5.2. Seqüenciació.....	238
4.5.3. Anàlisi de seqüències.....	239
4.6. Electroforesi.	
4.6.1. Reactius necessaris.....	239
4.6.2. Procediment.....	239
4.7. Electroforesi amb microxips mitjançant Agilent 2100 Bioanalyzer.....	240
4.8. Síntesi de cDNA (Retrotranscripció o RT).....	240
4.9. Quantificació de llevats mitjançant PCR quantitativa a temps real (QPCR).....	242
5. Bibliografia.....	243

1. Medis de cultiu.

1.1. YEPD (Yeast Extracte Peptone Dextrose).

Composició:

Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Extracte de llevat	10 g
H ₂ O destil·lada	1000 ml

La mescla s'autoclava a 120°C durant 15 minuts.

1.2. YEPD-agar (Yeast Extracte Peptone Dextrose-Agar).

Composició:

Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Extracte de llevat	10 g
Agar	20 g
H ₂ O destil·lada	1000 ml

La mescla s'autoclava a 120°C durant 15 minuts i es dispensa en plaques Petri (15-20 ml per placa).

1.3. Medi Agar-Lisina (Morris i Eddy, 1957).

Composició:

Lactat potàssic	4 ml	18 ml àcid làctic al 85%

Lisina-agar (Oxoid)	66 g
Àcid làctic 10%	1ml
H ₂ O destil·lada	1000 ml

Preparar la solució de lactat potàssic (18 ml d'àcid làctic 85% + 14 g KOH) i afegir 4 ml d'aquesta solució a 1L d'aigua destil·lada. Afegir els 66 g de Lisina-agar i escalfar la mescla fins dissoldre, agitant contínuament per evitar sobreescalfament. Posteriorment es refreda fins uns 50°C en un bany i s'afegeix 1 ml d'àcid làctic 10% per ajustar el pH aproximadament a 5.0. Finalment, distribuir el medi en plaques Petri (15-20 ml per placa).

2. Seguiment de fermentacions i poblacions de llevats.

2.1. Mesura de la densitat.

El mètode habitualment utilitzat per realitzar el seguiment de la fermentació alcohòlica és la mesura de la densitat, la qual està relacionada en un 99% amb la concentració de sucres reductors del most (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). La corba de disminució de la densitat al llarg de la fermentació és directament proporcional a la corba de consum de sucres.

En les fermentacions industrials, la densitat es mesura mitjançant un aeròmetre, que mesura la densitat directament en escala de Beaumé. En les fermentacions de laboratori la mesura de densitat es realitza per pesada de 5 ml de medi (prèviament centrifugat i desgasificat), en una balança de precisió. Aquesta pesada es fa per triplicat i el valor que s'obté s'utilitza per calcular-ne la densitat del medi en mg/l.

2.2. Mesura de la densitat òptica (D.O.).

La mesura d'absorbància a 600nm ens dóna un valor directament proporcional a la biomassa del llevat. Aquest fet es basa en la capacitat de les cèl·lules i partícules en general d'absorbir i/o dispersar la llum que incideix sobre elles. Un cultiu cel·lular apareix tèrbol perquè les cèl·lules

dispersen la llum que travessa la suspensió. Per tant, quan major sigui la turbidesa del cultiu, menor serà la quantitat de llum no dispersada.

La mesura de la D.O. es realitza mitjançant un espectrofotòmetre.

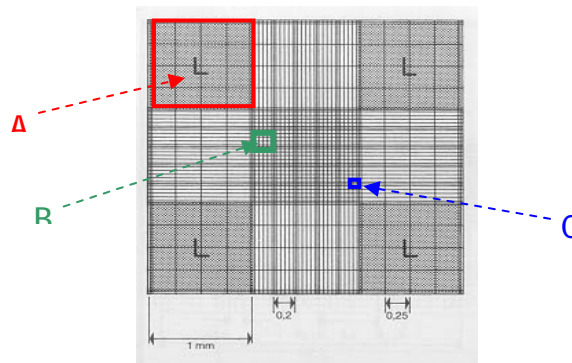
2.3. Recompte de llevats totals.

El nombre de llevats totals es determina per recompte al microscopi òptic utilitzant la cambra de Neubauer.

$$A = 16 B$$

$$B = 25 C$$

$$\text{Profunditat} = 0.1 \text{ mm}$$



$$\text{Volum A} = 1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

$$\text{Volum B} = 0.25 \times 0.25 \times 0.1 \times 10^{-3} = 6.25 \times 10^{-6} \text{ ml}$$

$$\text{Volum C} = 0.05 \times 0.05 \times 0.1 \times 10^{-3} = 2.5 \times 10^{-7} \text{ ml}$$

$$(\text{N}^\circ \text{ cèl·lules} \times \text{dilució}) / (\text{N}^\circ \text{ quadres} \times \text{Volum quadre}) = n^\circ \text{ cells/ml}$$

2.4. Recompte de viables.

El nombre de llevats viables es determina per recompte de les colònies cresques en medi de creixement sòlid després d'un temps d'incubació adequat. Cada colònia formada correspon a nombre d'unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml).

3. Extracció i purificació d'àcids nucleics.

3.1. Extracció de DNA (Querol *et al.*, 1992).

3.1.1. Reactius necessaris.

Els reactius necessaris per realitzar l'extracció de DNA són:

- ▶ Tampó 1 0.9 % Sorbitol
 0.1 M EDTA, pH = 7.5

- ▶ Tampó 2 50 mM Tris, pH = 7.4
 20 mM EDTA

- ▶ Zymoliasa 60 000 U (1.5 mg en 1300 µl tampó 1)

- ▶ SDS 10% (p/v)

- ▶ Acetat potàssic 5 M

- ▶ Isopropanol

- ▶ Etanol 70% (v/v)

- ▶ TE 10 mM Tris, pH = 7.4
 1 mM EDTA, pH = 8

3.1.2. Protocol d'extracció.

El protocol d'extracció de DNA és el següent:

- Rentar les cèl·lules amb 1 ml d'aigua destil·lada.
- Centrifugar durant 2 minuts a 10 000 rpm i eliminar el sobrenedant.
- Resuspendre el *pellet* amb 0.5ml de Tampó 1.
- Afegir 30 µl de Zymoliasa i incubar la suspensió durant 20 minuts en un bany a 37°C.
- Centrifugar durant 2 minuts a 10 000 rpm i eliminar el sobrenedant.

- Resuspendre el *pellet* amb 0.5ml de Tampó 2.
- Afegir 13 µl de SDS 10% i agitar vigorosament. Incubar durant 5 minuts en un bany a 65°C.
- Afegir 200 µl d'Acetat potàssic i agitar bé. Posteriorment, incubar 5 minuts en gel.
- Centrifugar durant 10 minuts a 12 000 rpm a 4°C.
- Transferir el sobrenedant a un altre eppendorf i afegir 700 µl d'Isopropanol. Incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar durant 2 minuts a 10 000 rpm i eliminar el sobrenedant.
- Rentar el *pellet* amb 500 µl d'Etanol 70%.
- Centrifugar durant 5 minuts a 12 000 rpm i eliminar el sobrenedant.
- Eixugar el *pellet* al buit. Resuspendre el DNA en 13 µl de TE.

3.2. Extracció de DNA mitjançant trencament mecànic.

- Les cèl·lules es resuspenen amb el tampó de lisis AP1 del kit DNeasy Plant minikit (Qiagen, Valencia, California) i la suspensió es transfereix a eppendorfs de 2ml que continguin 1g de perles de vidre de 0.5mm de diàmetre.
- Les mostres es col·loquen al rotor del mini bead-beater (Biospec Products Inc., Bartlesville, Okla.) i s'agiten durant 3 minuts a velocitat màxima. Cada minut s'atura l'aparell i es refreden les mostres en gel per evitar sobreescalfaments.

3.3. Purificació de DNA.

La purificació del DNA es va realitzar mitjançant el kit DNeasy Plant minikit (Qiagen, Valencia, California) seguint les instruccions del fabricant.

3.4. Extracció de RNA (Sierkstra *et al.*, 1992).

3.4.1. Reactius necessaris.

Els reactius necessaris per realitzar l'extracció de RNA són:

- ▶ Extraction Buffer 100 mM Tris-HCl, pH = 7.4
100 mM LiCl
0.1 mM EDTA

- ▶ Vortex Buffer 100 mM LiCl
10 mM EDTA
0.5% LitiumDodecylSulfat, pH = 7.4

- ▶ Fenol/Cloroform/Alcohol isoamílic 25:24:1 (v/v)
- ▶ Cloroform / Alcohol isoamílic 24:1 (v/v)
- ▶ Acetat de sodi 3M, pH = 5.6
- ▶ Etanol absolut
- ▶ Etanol 70%
- ▶ H₂O-DEPC

3.4.2. Preparació H₂O-DEPC

Per realitzar l'extracció de RNA s'ha de tenir sempre en compte treballar en condicions lliures de RNAses. Per tant, totes les solucions necessàries per realitzar l'extracció es prepararan amb H₂O-DEPC.

El DEPC és un reactiu molt tòxic i per això s'ha de treballar sempre amb guants i a la campana extractora. S'afegeix a l'aigua 0,1% de DEPC i s'agita vigorosament per a què es barregi bé. Es deixa tota la nit a la campana extractora i al dia següent s'autoclava per degradar el DEPC.

3.4.3. Protocol d'extracció.

El protocol d'extracció de RNA és el següent:

- Rentar les cèl·lules amb 1ml d'Extraction Buffer.
- Centrifugar 5 minuts a 10 000rpm a 4°C i eliminar el sobrenedant.

- Resuspendre el *pellet* en 0.5 ml de Vortex Buffer i transferir la suspensió en eppendorfs de 2ml que continguin 1g de perles de vidre de 0.5mm de diàmetre.
- Trencar mecànicament les cèl·lules amb mini bead-beater (Biospec Products Inc., Bartlesville, Okla.) en intervals de 30 segons d'agitació màxima i 30 segons en gel (5 cops).
- Afegir 500 µl de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1) i agitar 2 segons al vòrtex.
- Centrifugar durant 5 minuts a 10 000rpm a 4°C.
- Extreure la fase aquosa i repetir l'extracció amb fenol/cloroform/alcohol isoamílic fins que no s'observi interfase.
- L'últim pas d'extracció es realitzar amb cloroform/alcohol isoamílic (24:1).
- Centrifugar 5 minuts a 10 000rpm a 4°C i afegir a la fase aquosa 1/10 del volum de NaAc 3M i 2.5 del volum d'etanol absolut fred.
- Precipitar el RNA durant 15 minuts a -80°C.
- Centrifugar durant 30 minuts a 10 000rpm a 4°C.
- Rentar el *pellet* amb 500 µl d'etanol 70% fred.
- Centrifugar 5 minuts a 10 000rpm a 4°C.
- Assecar el RNA a l'aire i resuspendre en 100 µl d'aigua-DEPC durant una nit.

3.5. Purificació de RNA.

La purificació del RNA extret es realitza mitjançant un kit comercial de purificació, High Pure Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany), seguint el protocol proporcionat per la casa comercial.

4. Tècniques de Biologia Molecular.

4.1. Anàlisis dels perfils de restricció (RFLPs) del rDNA (Guillamón *et al.*, 1998).

4.1.1. Realització de PCR.

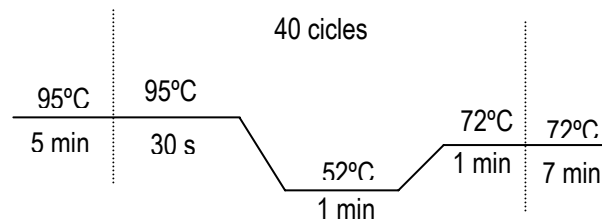
- Els primers utilitzats són:

ITS1 5'- TCCGTACGTGAACCTGCGG - 3'
ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

- Per cada mostra s'afegeix:

Primer ITS1 (10 µM)	1 µl
Primer ITS4 (10 µM)	1 µl
dNTPs (32 µM)	4 µl
MgCl ₂ (2.5 mM) (Ecotaq)	3 µl
Tampó Taq 10x, sense Mg. (Ecotaq)	5 µl
Taq DNA polymerasa (ARK Scientific) (0.2 U)	0.5 µl
H ₂ O milli-Q	33 µl
DNA extret	2.5 µl
Volum total final = 50 µl	

- Les condicions del programa de PCR són:



4.1.2. Digestió de l'amplificat.

La digestió del DNA amplificat es realitza normalment amb aquestes tres endonucleases *CfoI*, *HaeIII* i *HinfI* (Roche Diagnostics GmbH). Per cada enzim i mostra es realitza la següent mescla:

Enzim	1.5 µl
Tampó corresponent segons l'enzim	2 µl
H ₂ O milli-Q	8.5 µl
DNA amplificat	8 µl
Volum total final = 20 µl	

S'han d'incubar les mostres durant un mínim de 3 hores en un bany a 37°C. Normalment es deixa la digestió durant tota la nit.

4.1.3. Electroforesi.

Tant amb el producte de la PCR com amb el de les digestions, es realitza una electroforesi (veure procediment a l'apartat 4.6).

Per a la visualització de l'amplificat, es realitza un gel d'agarosa del 1.2 % (p/v) i per estimar els tamanys de les bandes s'utilitza el marcador de pes molecular Ladder 100bp DNA (Gibco BRL).

Per al producte de les digestions es realitza un gel d'agarosa del 2 % (p/v) i també s'utilitza el marcador Ladder 100bp DNA (Gibco BRL) per estimar les mides de les bandes.

4.2. PCR-ISS (PCR-Intron splice sites). (de Barros *et al.* 1996).

4.2.1. Realització de PCR.

- El primer utilitzat és:

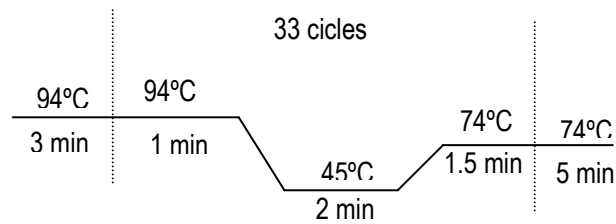
EI1 5'- CTGGCTTGGTGTATG - 3'

- Per cada mostra s'afegeix:

Primer EI1 (50 µM)	1 µl
dNTPs (32 µM)	1 µl
MgCl ₂ (2.5 mM) (Ecotaq)	2.5 µl

Tampó Taq 10x, sense Mg. (Ecotaq)	5 µl
Taq DNA polymerasa (ARK Scientific) (0.2 U)	0.5 µl
H ₂ O milli-Q	38 µl
DNA extret	2 µl
Volum total final = 50 µl	

- Les condicions del programa de PCR són:



4.2.2. Electroforesi.

El producte de PCR es visualitza mitjançant un gel d'agarosa del 1.5 % (p/v) (veure procediment a l'apartat 4.6). Per estimar el tamany de les bandes, s'utilitza el marcador de pes molecular Ladder 100bp DNA (Gibco BRL).

4.3. Tècnica REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR).

4.3.1 Realització de PCR.

- Els primers utilitzats són:

REPIR-1	5'- IIIICGICGICATCIGGC - 3'
REP2-I	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC - 3'

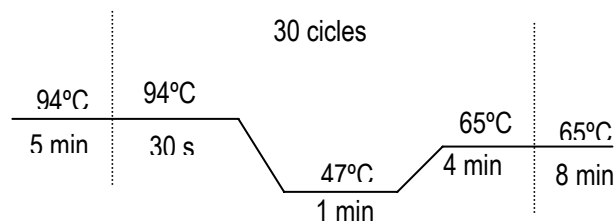
- Per cada mostra s'afegeix:

Primer REPIR-1 (50 µM)	1 µl
------------------------	------

Primer REP2-I (50 μ M)	1 μ l
dNTPs (32 μ M)	1.25 μ l
Tampó GB 5x (*)	5 μ l
BSA (20 mg/ml)	0.2 μ l
DMSO comercial	2.5 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerasa (ARK Scientific) (0.2 U)	0.5 μ l
H ₂ O milli-Q	10.55 μ l
DNA extret	3 μ l
Volum total final =	25 μ l

(*) Veure la preparació del tampó a l'apartat 4.3.1

- Les condicions del programa de PCR són:



4.3.2. Preparació tampó GB 5x (Kogan *et al.* 1987).

- Els reactius necessaris per preparar el tampó GB 5x són:

1M (NH₄)₂ SO₄

1M Tris- HCl (pH = 8,8)

1M MgCl₂

0,5M EDTA (pH = 8,8)

14,14M β -mercaptoetanol (stock comercial)

- Els medis s'han d'autoclavar per separat.

- Per preparar una solució de 200 ml:

16.6 ml	1M (NH ₄) ₂ SO ₄
67 ml	1M Tris- HCl (pH = 8,8)
6.7 ml	1M MgCl ₂
1.3 ml	Dil. 1:100 de 0,5M EDTA (pH = 8,8)
2.08 ml	14,14M β-mercaptoetanol (stock comercial)
106 ml	H ₂ O milli-Q

- El tampó GB 5X s'ha de guardar a 4°C.

4.3.3. Electroforesi.

Amb el producte de la PCR es realitza un gel d'agarosa del 1.5 % (p/v) (veure procediment a l'apartat 4.6). I per estimar els tamanys de les bandes s'utilitza el marcador de pes molecular Ladder 100bp DNA (Gibco BRL).

4.4.Tècnica ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR).

4.4.1 Realització de PCR.

- Els primers utilitzats són:

ERIC 1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'
ERIC 2	5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3'

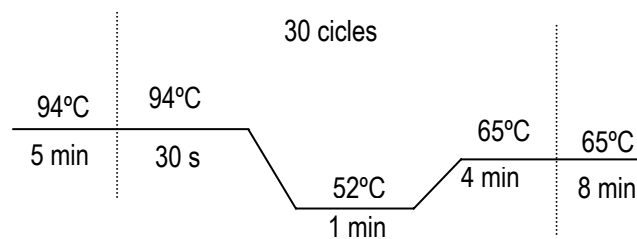
- Per cada mostra s'afegeix:

Primer ERIC 1R (50 μM)	1 μl
Primer ERIC 2 (50 μM)	1 μl

dNTPs (32 μ M)	1.25 μ l
Tampó GB 5x (*)	5 μ l
BSA (20 mg/ml)	0.2 μ l
DMSO comercial	2.5 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerasa (ARK Scientific) (0.2 U)	0.5 μ l
H ₂ O milli-Q	10.55 μ l
DNA extret	3 μ l
Volum total final = 25 μ l	

(*) Veure la preparació del tampó a l'apartat 4.3.1

- Les condicions del programa de PCR són:



4.4.2. Electroforesi.

Amb el producte de la PCR es realitza un gel d'agarosa del 1.5 % (p/v) (veure procediment a l'apartat 4.6). I per estimar els tamanys de les bandes s'utilitza el marcador de pes molecular Ladder 100bp DNA (Gibco BRL).

4.5. Anàlisi del domini D1/D2 de la regió ribosomal (Kurtzman i Robnett, 1998)

4.5.1. Realització de PCR

- Els primers utilitzats són:

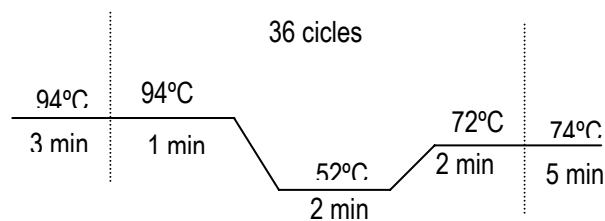
NL-1 5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3'

NL-4 5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG – 3'

- Per cada mostra s'afegeix:

Primer NL-1 (50 µM)	1 µl
Primer NL-4 (50 µM)	1 µl
dNTPs (32 µM)	1 µl
MgCl ₂ (2.5 mM) (Ecotaq)	2.5 µl
Tampó Taq 10x, sense Mg. (Ecotaq)	5 µl
Taq DNA polymerasa (ARK Scientific) (0.2 U)	0.5 µl
H ₂ O milli-Q	37 µl
DNA extret	2 µl
Volum total final = 50 µl	

- Les condicions del programa de PCR són:



4.5.2. Seqüenciació.

El producte de PCR serà una única banda la qual es purificarà i es seqüenciarà. Per a la purificació es va utilitzar el kit Gel Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) i la seqüenciació es va realitzar en un servei científic extern.

4.5.3. Anàlisi de seqüències.

El programa d'alineament BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>) va ser utilitzat per comparar les seqüències obtingudes amb la base de dades European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

4.6. Electroforesi.

4.6.1. Reactius necessaris.

- ▶ Tampó TBE 89 mM Tris base
 89 mM Àcid bòric
 2 mM EDTA, pH = 8

- ▶ Tampó de càrrega (solució 0.25 % (p/v) blau de bromofenol 10x)
 - 1 % (p/v) SDS
 - 20 % (v/v) glicerol
 - 0.1 M Na₂EDTA, pH = 8

- ▶ Agarosa MP (Boehringer Mannheim)
- ▶ Bromur d'etidi
- ▶ Marcadors de pes molecular

4.6.2. Procediment.

- Pesar l'agarosa MP adequada per preparar el gel del percentatge desitjat.
- Dissoldre l'agarosa amb tampó TBE mitjançant escalfament.
- Afegir 1 µl de bromur d'etidi per cada 25 ml de solució (concentració final 0.4 µg/ml).
- Abocar la solució a una safata d'electroforesi i ficar-hi la pinta per a què es formin els pous de càrrega.
- Un cop solidificat el gel, posar-lo dins una cubeta d'electroforesi cobert amb tampó TBE.

- Afegir tampó de càrrega a la mostra, 2 μ l aproximadament.
- Carregar al gel d'agarosa els marcadors de pes molecular i les mostres.
- Ajustar el voltatge adequat per fer córrer les mostres.

Un cop l'electroforesi ha finalitzat, els resultats es miren mitjançant un transil·luminador de llum UV.

4.7. Electroforesi amb microxips mitjançant Agilent 2100 Bioanalyzer.

Per realitzar l'electroforesi amb microxips s'utilitzen uns kits (LabChip[®] kits, Agilent Technologies) que contenen la matriu, el colorant i els marcadors moleculars. Segons els fragments de DNA a analitzar podem escollir entre els diferents kits existents:

Kit	Rang de tamanys
DNA 500 assay	25-500 pb
DNA 1000 assay	25-1000 pb
DNA 7500 assay	100-7500 pb
DNA 1200 assay	100-12000 pb

En l'electroforesi tan sols és necessari 1 μ l de mostra i per dur-la a terme es segueixen les instruccions del manual del fabricant.

4.8. Síntesi de cDNA (Retrotranscripció o RT).

La reacció de retrotranscripció (RT) consisteix en sintetitzar DNA (cDNA) a partir de RNA extret prèviament. Aquest cDNA sintetitzat serà complementari a la seqüència de RNA. La reacció RT es du a terme mitjançant un termociclador.

Per cada mostra es realitzaran dues reaccions, RT i no-RT. La reacció no-RT és un control per determinar les possibles restes de DNA genòmic que puguin haver quedat en l'extracció de RNA. En aquest control no-RT s'afegeixen tots els reactius excepte l'enzim transcriptasa inversa i el primer.

Reacció RT

2.5 µl mostra

1 µl primer

[OligodT (0.1µg-Invitrogen) o NL-4 (10 µM)]

8.5 µl H₂O-DEPC

Reacció no-RT

2.5 µl mostra

9.5 µl H₂O-DEPC

- Incubar en el termociclador 5 minuts a 70°C.
- Deixar refredar 1 minut en gel.
- Afegir a cada tub de reacció:

4 µl 5xPCR Buffer (Invitrogen)

1 µl dNTPs 10mM

2 µl DTT 0.1 M (Invitrogen)

- Incubar en el termociclador 5 minuts a 42°C.
- Afegir als tubs de reacció:

Reacció RT

1 µl Superscript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase
(Invitrogen)

Reacció no-RT

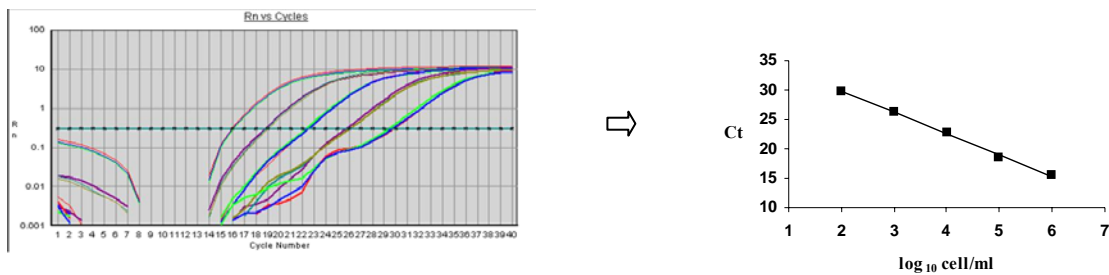
1 µl H₂O-DEPC

- Incubar en el termociclador 50 minuts a 42°C.
- Finalment, per aturar la reacció s'incuba en el termociclador durant 15 minuts a 70°C.

4.9. Quantificació de llevats mitjançant PCR quantitativa a temps real (QPCR).

En la tècnica QPCR es fa un seguiment de la reacció a temps real mitjançant la monitorització del senyal de fluorescència que emet un fluorocrom present en la reacció (SYBR Green I, Applied Biosystems). Aquest compost s'intercala específicament al DNA de doble cadena i en aquestes condicions emet fluorescència. Per tant el senyal emès durant cada cicle de la PCR és proporcional a la quantitat de DNA que s'està amplificant, és a dir, a la quantitat inicial de DNA motlle.

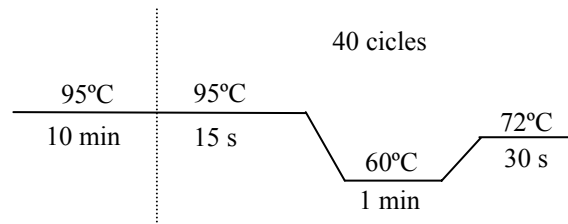
Per poder determinar la quantitat de DNA o el número de cèl·lules d'una mostra, és necessari construir una recta patró. La recta patró es construeix a partir de les dilucions d'una mostra de concentració de DNA o número de cèl·lules coneguda. Per a cada concentració de DNA o cada número de cèl·lules, s'obté un valor C_T a partir dels quals es pot construir una recta patró.



Per a la reacció de PCR es fa un mix amb:

- 12.5 µl SybrGreen Master Mix (Applied Biosystems).
- 0.75 µl primer forward (7µM)
- 0.75 µl primer reverse (7µM)
- 6 µl H₂O destil·lada
- 5 µl mostra (DNA o cDNA)

Les condicions de PCR utilitzades són:



5. Bibliografia.

- De Barros Lopes, M. A., Soden, A., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4514-4520.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Kogan, S.C., Doherty, M. and Gitschier J.(1987). An improved method for pre-natal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to haemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 317, 985-990.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Morris, E.O. and Eddy, A.A. (1957). Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *J. Inst. Brew.* 63, 34-35.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000). *Handbook of Enology. The Microbiology of wine and vinifications*. Vol. I. West Sussex, England: Wiley.
- Sierkstra, L.N., Verbakel, J.M.A. and Verrips C.T. (1992). Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2559-2566.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

ANNEX 2

Abreviacions i Nomenclatura

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Núria Hierro Crivillé

Quantificació, Identificació i Tipificació de llevats mitjançant l'ús de diferents tècniques moleculars.

ISBN: 978-84-691-2428-4 / D.L: T.254-2008

AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
BLAST	Basic Alignment Search Tool
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementari al RNA
CECT	Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus
C _T	Threshold cycle (cicle umbral)
DEPC	Dietil pirocarbonat
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Desoxinucleòtids trifosfat
DTT	Dithiothreitol
D.O.	Densitat òptica
EDTA	Àcid etilendiamino tetraacètic
EMA	Ethidium monoazide bromide
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
GB	Gitschier Buffer
ISS	Intron Splice Sites
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilobase
LSA	Llevat Sec Actiu
MGB	Minor Groove Binder
mRNA	RNA missatger
mtDNA	DNA mitocondrial
NAC	No amplification Control
NT	Soca neotipus

NTC	No Template Control
OIV	Office International de la Vigne et du Vin
ORF	Open Reading Frame
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PNA	Peptide nucleic acid
QPCR	PCR quantitativa a temps real
R ²	Coefficient de correlació
RNA	Àcid ribonucleic
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	DNA ribosòmic
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism
rRNA	RNA ribosòmic
RT	retrotranscripció
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SSRs	Simple Sequence Repeats
T	Espècie tipus
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T _m	Temperatura de Melting
U	Unitats
UFC o CFU	Unitats formadores de colònies
UV	Llum ultravioleta