

**Eduardo Andrés CABALLERO VALDÉS**

**DINÁMICA DE POBLACIONES DE CEPAS DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN FERMENTACIONES  
ALCOHÓLICAS A PARTIR DE PIES DE CUBA A  
DISTINTAS CONDICIONES DE TEMPERATURA Y  
CONTENIDO DE SULFUROSO Y ETANOL**

**TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

**dirigido por María del Carmen Portillo Guisado**

**Máster en BEBIDAS FERMENTADAS**

**Facultat d'Enologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona  
12 de junio de 2023**

**TÍTULO: DINÁMICA DE POBLACIONES DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* EN FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS A PARTIR DE PIES DE CUBA A DISTINTAS CONDICIONES DE TEMPERATURA Y CONTENIDO DE SULFUROSO Y ETANOL**

Autor: Eduardo Andrés Caballero Valdés

*Dirección: Dra. M. Carmen Portillo. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. Campus Sescelades. Marcel·lí Domingo, s/n. 43007 Tarragona*  
*e-mail: eduardoandres.caballero@estudiants.urv.cat*

Palabras clave: Dinámica de poblaciones, pie de cuba, sulfito, fermentación espontánea

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Biotecnología Enológica del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Enología. Universidad Rovira y Virgili.

## Índice

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Introducción  | 1  |
| 1.1.   | Fermentación alcohólica en la producción de vino  | 1  |
| 1.2.   | Diversidad microbiana en la producción de vino  | 1  |
| 1.3.   | Factores para la modulación de la diversidad microbiológica autóctona                   | 3  |
| 2.     | Materiales y métodos  | 5  |
| 2.1.   | Trabajo preliminar del grupo de investigación   | 5  |
| 2.2.   | Trabajo realizado   | 6  |
| 2.3.   | Medios de cultivo   | 7  |
| 2.3.1. | YPD   | 7  |
| 2.3.2. | Agar WLN  | 8  |
| 2.3.3. | Mosto sintético   | 8  |
| 2.4.   | Caracterización de cepas  | 8  |
| 2.4.1. | Extracción de ADN desde colonias  | 8  |
| 2.4.2. | Análisis 5,8s-ITS   | 9  |
| 2.4.3. | Análisis inter-delta  | 9  |
| 2.4.4. | Software GelJ v 2.0   | 10 |
| 2.5.   | Evaluación de la resistencia a dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )                     | 10 |
| 2.6.   | Cinéticas de crecimiento a distintas concentraciones de SO <sub>2</sub> en medio YPD    | 10 |
| 2.7.   | Fermentaciones alcohólicas con cepas seleccionadas                                      | 10 |
| 2.8.   | Monitoreo de la fermentación alcohólica   | 11 |
| 2.8.1. | Densidad  | 11 |
| 2.8.2. | Conteo de células al microscopio  | 11 |
| 2.8.3. | Conteo de colonias en placa   | 12 |
| 2.8.4. | Análisis de HPLC  | 12 |
| 3.     | Resultados y discusión  | 13 |
| 3.1.   | Resultados preliminares   | 13 |
| 3.2.   | Optimización de muestras para PCR inter-delta y electroforesis                          | 14 |
| 3.3.   | PCR de colonias seleccionadas de fermentaciones y selección para realizar el dendograma | 17 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4. Dinámica de poblaciones de <i>S. cerevisiae</i> durante fermentaciones alcohólicas espontáneas  | 20 |
| 3.5. Selección de cepas de cada grupo para evaluación de tolerancia a SO <sub>2</sub>  | 22 |
| 3.6. Competitividad fermentativa de 2 cepas de <i>Saccharomyces</i> autóctonas de alta y baja tolerancia a SO <sub>2</sub> y <i>S. bacillaris</i> a distintas concentraciones de SO <sub>2</sub> | 23 |
| 4. Conclusiones  | 29 |
| 5. Proyecciones de estudio   | 30 |
| Referencias  | 31 |
| Anexos   | 34 |

## Resumen

Las levaduras presentan gran diversidad en fermentaciones alcohólicas espontánea, lo que puede resultar en una mayor complejidad sensorial de vinos. No obstante, durante las fermentaciones espontáneas no hay control microbiológico, posibilitando características organolépticas indeseables o paradas de fermentación. Por este motivo, se estudio el efecto la temperatura, sulfatación y fortificación con etanol sobre la dinámica de poblaciones de levaduras *Saccharomyces* aisladas de fermentaciones de mosto de natural iniciadas con pies de cuba (de fermentación espontánea). Se caracterizaron 115 cepas aisladas identificadas como *Saccharomyces*, se optimizó el protocolo de tratamiento de muestras para el PCR inter-delta, resultando en 33 perfiles distintos, de los que 14 clusters se obtienen mediante un dendograma elaborado al 90% de similitud. La variable que más afectó a la diversidad de cepas de *Saccharomyces* fue la adición de SO<sub>2</sub> y etanol en los pies de cuba, aumentando la diversidad a ambas temperaturas, en comparación con las fermentaciones con pie de cuba sin tratamiento. Por otro lado, se evaluó la tolerancia a SO<sub>2</sub> en medio YPD mediante análisis de curvas de crecimiento de 27 cepas a diferentes niveles de sulfitación. Así, un gráfico de mapa de calor con los distintos tiempos de latencia o fase lag de las cepas, mostró que cepas aisladas del pie de cuba poseen menores tiempos de latencia a concentraciones moderadas de SO<sub>2</sub> (0-80 mg/L). No obstante, para cepas aisladas del final de fermentación, los tiempos de latencia suelen ser mayores, pero en algunos casos se mantienen incluso a 160 mg/L de SO<sub>2</sub>. Finalmente, dos cepas de *Saccharomyces*, seleccionadas por su alta y baja tolerancia a SO<sub>2</sub>, se usaron para realizar co-inoculaciones entre ellas o con una cepa de *Starmarella bacillaris* en mosto sintético observando diferencias tanto a nivel de cinéticas de poblaciones como en las concentraciones de algunos de los principales productos de fermentación.

## Abstract

Yeasts present great diversity in spontaneous alcoholic fermentations, which can result in a greater sensory complexity of wines. However, during spontaneous fermentations there is no microbiological control, allowing undesirable organoleptic characteristics or fermentation stops. For this reason, the effect of temperature, addition of SO<sub>2</sub> and ethanol fortification on the dynamics of *Saccharomyces* yeast populations isolated from natural must fermentations started with *pie de cuve* (spontaneous fermentation) was studied. 115 isolated strains identified as *Saccharomyces* were characterized, the sample treatment protocol for the inter-delta PCR was optimized, resulting in 33 different profiles, of which 14 clusters were obtained by means of a dendrogram prepared with 90% similarity. The variable that most affected the diversity of *Saccharomyces* strains was the addition of SO<sub>2</sub> and ethanol in the *pie de cuve*, increasing diversity at both temperatures, compared to fermentations with untreated *pie de cuve*. On the other hand, the tolerance to SO<sub>2</sub> in YPD medium was evaluated by analysis of growth curves of 27 strains at different levels of SO<sub>2</sub>. Thus, a heat map graph with the different latency times or lag phase of the strains, showed that strains isolated from *pie de cuve* have shorter latency times at moderate SO<sub>2</sub> concentrations (0-80 mg/L). However, for strains isolated from the end of fermentation, latency times are usually longer, but in some cases, they are even maintained at 160 mg/L SO<sub>2</sub>. Finally, two strains of *Saccharomyces*, selected for their high and low tolerance to SO<sub>2</sub>, were used to co-inoculate with each other or with a *Starmerella bacillaris* strain in synthetic must, observing differences both at the level of population kinetics and concentrations of some of the main fermentation products.

# 1. Introducción

## 1.1. Fermentación alcohólica en la producción de vino

La elaboración de bebidas fermentadas es una de las prácticas más antiguas en la historia de la humanidad y las primeras evidencias de su elaboración datan del 2000 A.C. en la Antigua Persia (Pretorius, 2000). No fue hasta que Louis Pasteur reconoció a las levaduras como responsables de la fermentación del vino (Barnett, 2000), que el proceso se comenzó a estudiar a nivel biotecnológico. Así, la fermentación alcohólica consiste en la biotransformación de los azúcares presentes en uvas, principalmente glucosa y fructosa, en etanol y dióxido de carbono (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Además de azúcares, las uvas contienen otros elementos como aminoácidos, polifenoles o ácidos, siendo también algunos de estos compuestos, metabolizados por las levaduras en metabolitos volátiles, los que tienen un impacto en el aroma y sabor de los vinos como producto final (Pretorius, 2016).

## 1.2. Diversidad microbiana en la producción de vino

Dentro de las fuentes de diversidad microbiana en viticultura, la superficie de las uvas es uno de los microambientes principales, albergando una microbiota de hongos filamentosos, levaduras y bacterias que pueden tener un impacto tanto en la uva como en la calidad del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Los cambios en la superficie de la uva (generalmente daños físicos, compactación del racimo, exceso de humedad o infección por fitopatógenos) alteran la diversidad o equilibrio de poblaciones de la microbiota, pudiendo desembocar en una alteración del proceso de vinificación y del producto final (Steel et al., 2013). Las levaduras son microorganismos unicelulares pertenecientes a la clase *fungi* y géneros *ascomicetos*. La levadura es un organismo anaerobio facultativo y está presente en ramas, hojas, flores y bayas de uvas de los viñedos. Se han aislado diferentes levaduras de mosto fermentado de uva, donde se han encontrado más de 40 especies (Jolly et al., 2014). Las levaduras autóctonas encontradas en uva o su mosto previo a la fermentación de vínica, se dividen principalmente en dos categorías, las *Saccharomyces* y las especies no-*Saccharomyces*, que engloban de forma general a todas las que no pertenecen al género *Saccharomyces*. Dentro de las tres principales especies en los mostos de uva durante la fermentación destacan: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *Starmerella bacillaris* (sinónimo de *Candida zemplinina*) (Alessandra et al., 2015; Wang et al., 2015).

No obstante, las fermentaciones alcohólicas son procesos ecológicamente complejos con una sucesión variable de especies de levaduras que pueden proporcionar distintas características a la fermentación y al producto final (Fleet, 2003). Se han investigado y monitoreado las dinámicas de poblaciones durante

fermentaciones con especies de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. De acuerdo con análisis dependientes de cultivo, las especies de no-*Saccharomyces* solo son aisladas durante etapas tempranas de la fermentación, puesto que etapas posteriores de la fermentación están dominadas por especies de *Saccharomyces* (Fleet, 2008; Taylor et al., 2014; Morrison-Whittle et al., 2015; Varela et al., 2017). *S. cerevisiae* ha sido universalmente considerada como la “levadura del vino” por su habilidad de prevalecer a lo largo del proceso de vinificación a pesar de las difíciles condiciones ambientales (bajo pH, alta presión osmótica, alta concentración de etanol y ácidos orgánicos) y porque transforma rápida y eficientemente los azúcares a bajos valores de pH del mosto, aunque esto podría generar una menor variedad de aromas y sabores en el vino (Fleet, 2008; Bisson, 1999; Albergaria y Arneborg, 2016). No obstante, la competencia inicial por nutrientes de *S. cerevisiae* con levaduras no-*Saccharomyces*, podría tener un impacto en la cinética de fermentación, impidiendo su correcta finalización o afectando en los aromas y sabores del vino final. De acuerdo con lo anteriormente mencionado, es esencial entender la composición y comportamiento de estos microorganismos durante la fermentación con el propósito de expandir el entendimiento de los problemas de la vinificación, mejorando el control del proceso fermentativo con el propósito de obtener productos finales con las características organolépticas deseadas.

Dentro de las dinámicas de población a nivel microbiológico, se debe tener en consideración que algunas especies de levaduras se seleccionan y actúan debido a determinantes ecológicos y otras responden a parámetros tecnológicos durante el proceso de vinificación (Ciani et al., 2010). Sin embargo, las fermentaciones espontáneas pueden detenerse y estar acompañadas por la producción de metabolitos desfavorables (Capozzi et al., 2011). De este modo, el propósito de los inóculos comerciales de levaduras es estandarizar la calidad del vino y asegurar que el proceso de fermentación se complete. No obstante, esto disminuye la complejidad del vino, limitando parcialmente la diversidad de aromas y sabores que puede ofrecer el producto final, lo que podría mejorarse al incluir cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (Lui et al., 2023). Al respecto, existen aproximadamente 20 géneros de levaduras no-*Saccharomyces* que son relevantes en procesos de vinificación (Kurtzman y Fell, 1998). Dentro de los géneros encontrados, algunas de las que son fermentativas son: *Metschnikowia spp.* y *Starmerella bacillaris*. Dentro de estas últimas, su aspecto positivo a nivel enológico se centra en la reducción de la concentración de etanol, generar baja acidez volátil, alta producción de glicerol, la disminución de etilacetatos, ácidos grasos volátiles y ácido málico. También produce compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* (Englezos et al., 2018; Lemos Junior et al., 2016; Nisiotou et al., 2018). Específicamente, en la región de Priorat, las principales especies de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas del mosto de uva son *Hanseniaspora uvarum* y *S. bacillaris* (Mas et al., 2016; Padilla et al., 2016). Dicha tendencia en la

aparición de levaduras no-*Saccharomyces* también se repite en mostos de uva Barbera en la región de Piamonte en Italia (Alessandria et al., 2015). Por otra parte, al usar técnicas independientes de cultivo, se destaca que las poblaciones de no-*Saccharomyces* viables, pueden ser cuantificadas en etapas tardías de la fermentación (Wang et al., 2014) dando sustento a que puedan tener un rol también hacia el final del proceso fermentativo. De acuerdo con los antecedentes mencionados, se hace relevante entender los factores que tienen incidencia en diversidad microbiológica durante los procesos fermentativos.

### 1.3. Factores para la modulación de la diversidad microbiológica autóctona

Como se mencionó anteriormente, si bien existe un equilibrio entre los microorganismos presentes en la uva durante fermentaciones espontáneas, existe el riesgo de que el equilibrio favorezca a microorganismos que, si bien son buenos fermentadores, podrían otorgarle características sensoriales no deseables al vino o que simplemente no puedan finalizar la fermentación. Una alternativa es el uso de inóculos comerciales de levaduras, normalmente *S. cerevisiae*, para controlar la fermentación alcohólica confiriendo estabilidad microbiológica. No obstante, esta opción puede resultar en vinos más homogéneos y estándares, ya que las características principales que reflejan son las de la levadura inoculada.

Otra opción para dejar actuar las levaduras autóctonas es la realización de fermentaciones con pie de cuba (*pie de cuve*) que consiste en un protocolo tradicional para introducir levaduras o iniciar la fermentación desde un mosto ya en fermentación. Se usa un volumen de entre un 5-10% del volumen total a fermentar. El fermento inicial debe tener una alta concentración de levadura activa (entre  $10^7$  y  $10^8$  células/mL) para iniciar con mayor facilidad y rapidez la fermentación del nuevo mosto (Clavijo et al., 2011; Li et al., 2012; Moschetti et al., 2016). El pie de cuba puede ser preparado desde una levadura comercial o desde un mosto fermentado de forma espontánea. En este último caso, el pie de cuba es resultado de un inóculo mezclado y el vino final reflejaría la complejidad y la tipicidad del *terroir* microbiano. No obstante, existen escasos estudios respecto a la inoculación con pie de cuba. Uno de ellos, muestra las diferencias en el vino final partiendo del mismo mosto (Bely et al., 2005), llegando a obtener un vino con menor contenido de ácido acético al fermentar con una levadura aislada de una fermentación espontánea que con una levadura comercial rehidratada. Otro aspecto para considerar es que en estudios recientes se describió que los resultados del uso de un pie de cuba preparado con levaduras derivadas del viñedo eran altamente dependientes de la adición de sulfito y de la composición microbiana del inóculo (Morgan et al., 2019).

Respecto a la adición de  $\text{SO}_2$ , su uso está bien documentado en la tecnología del vino y ha sido una práctica común desde el siglo XIX. La adición de sulfito en las distintas etapas del proceso de vinificación está

relacionada con distintas funciones (Giacosa et al., 2019) siendo las más relevantes su capacidad antioxidante, sus propiedades antisépticas y la habilidad de mejorar las cualidades sensoriales (al reaccionar con compuestos que contienen grupos carbonilo) (Makhotkina & Kilmartin, 2013). Aunque el vino posee antioxidantes de forma natural debido a la presencia de compuestos fenólicos, para evitar la degradación oxidativa, es necesario una adición exógena de antioxidantes como el SO<sub>2</sub> (Burns et al., 2001; Manzocco, Mastrocola & Nicoli, 1998). Al pH típico del vino, entre 3 y 4, el SO<sub>2</sub> produce un equilibrio ácido-base de tres formas: SO<sub>2</sub> molecular, bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e ion sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (McArdle y Hoffmann, 1983). Como se puede observar, dichas propiedades se enfocan en evitar la oxidación y contaminación del producto y/o mejorar sus cualidades sensoriales, sin embargo, según lo estudiado por Morgan et al (2019), también podría usarse como estrategia para impactar en el equilibrio de levaduras presentes en fermentaciones espontáneas y modular la dinámica de población microbiana para impactar positivamente en el perfil sensorial del producto final.

Aunque aún no son conocidas en profundidad las causas por las cuales las fermentaciones se detienen, algunos de los factores de importancia son: la composición del mosto (determinada por la variedad de uva y el clima) y las prácticas tecnológicas como la clarificación del mosto y la temperatura de fermentación (Ingledey y Kunkee, 1985; Ayestaran et al., 1995). De hecho, la temperatura es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo de fermentaciones alcohólicas, afectando tanto la cinética del proceso en términos de duración y velocidad de fermentación, así como la calidad final del vino, por ejemplo, en la producción de metabolitos secundarios (Lafon-Lafourcade, 1983; Fleet y Heard, 1993). De hecho, algunos metabolitos como el etanol, ácido acético, acetaldehídos y ácidos grasos de cadena media pueden tener un efecto tóxico en *Saccharomyces cerevisiae* (Bisson, 1999).

De este modo, el **objetivo principal** del presente estudio será estudiar cómo los factores de concentración de SO<sub>2</sub>, temperatura y fortificación con etanol modulan la dinámica de poblaciones de cepas de *S. cerevisiae* tanto en la fermentación preliminar (usada como pie de cuba) como en la principal. Para ello, se usará mosto natural de la vendimia de 2022 y se caracterizarán las cepas presentes mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo tanto en pie de cuba realizado en las distintas condiciones como en las fermentaciones principales. Así mismo, de forma preliminar, se evaluará la tolerancia a SO<sub>2</sub> de algunas cepas y su potencial para ser usadas en fermentaciones completas tanto aisladas como co-inoculadas.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Trabajo preliminar del grupo de investigación

En un trabajo previo del grupo de Biotecnología Enológica (Departamento de bioquímica y Biotecnología) se llevaron a cabo fermentaciones a pequeña escala en la bodega experimental Mas del Frares de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona), donde se utilizó mosto fresco de Moscatel de Alejandría cosechado durante el año 2022. El mosto utilizado para las experiencias contenía 200 g/L de azúcares totales (densidad de 1084,7 g/L) y pH de 3,47. La experimentación en bodega consistió en dos etapas: La primera, una fermentación espontánea preliminar del mosto fresco bajo condiciones de estrés en relación con concentración de SO<sub>2</sub> (0 y 40 mg/L), adición de etanol (0% v/v y 1% v/v) y temperatura (16°C y 28°C); y la segunda, la inoculación de 2% de las fermentaciones espontáneas previamente mencionadas, que sirvieron como pie de cuba de mosto fresco prensado. En ambas etapas, se adicionó al mosto 40 mg/L de SO<sub>2</sub> durante el prensado y se dejó en reposo durante 24 h a 8°C antes de la fermentación para su clarificación.

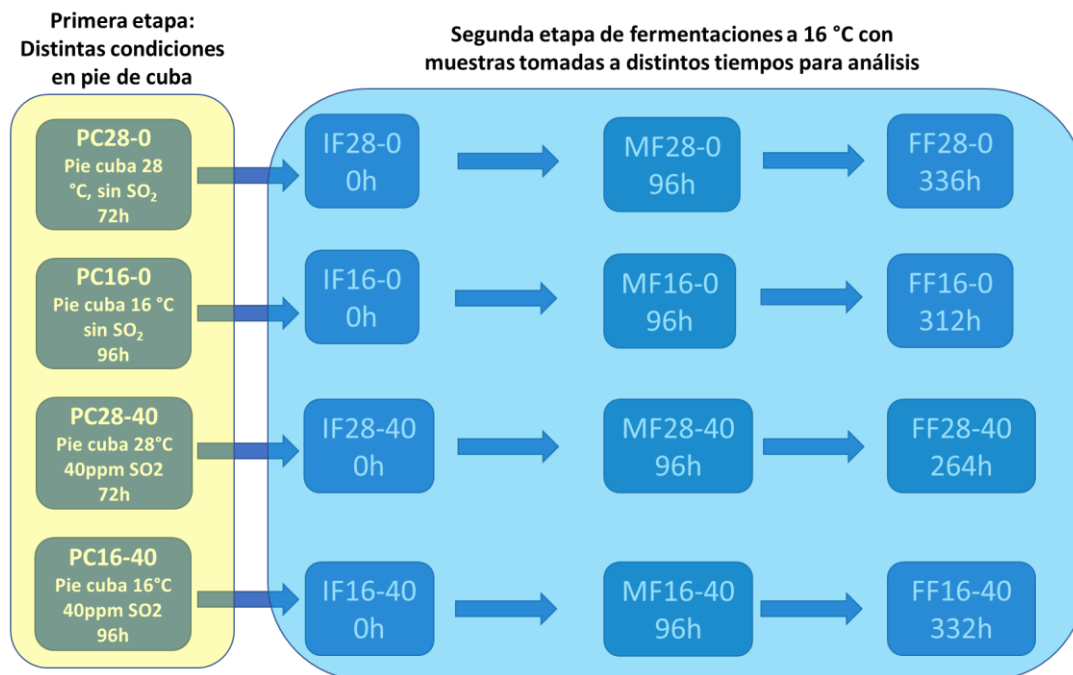
Las fermentaciones de la primera etapa fueron incubadas de forma estática en la bodega. Se usaron 700 mL de mosto fresco fermentados espontáneamente en botellas de 1 L en triplicado y aplicando las condiciones de selección mencionadas previamente. Cuando dichas fermentaciones alcanzaron una población celular de  $1 \times 10^8$  células/mL y se producía una disminución de densidad de entre 15 a 20 g/L, los triplicados fueron agregados en una proporción de 2% v/v (sirviendo como pie de cuba) a 3 L de mosto fresco contenidos en botellas de 5 L de capacidad, iniciando la fermentación en triplicado a 16°C.

La dinámica de población de las fermentaciones mencionadas fue monitoreada en tres puntos basados en la medición de la densidad del mosto: Inicio de fermentación, mitad de fermentación y final de fermentación. Para identificar dichos puntos, las fermentaciones fueron monitoreadas diariamente midiendo la densidad del mosto (ver punto 2.8.1.) y consideradas como finalizadas cuando la densidad del mosto sea menor a 1000 g/L o cuando los azúcares residuales fueran menores a 5 g/L (ver punto 2.8.4.).

La población fue seguida por: Recuento en cámara de Neubauer (ver punto 2.8.2.), técnica de qPCR y plaqueo de 100 µL de muestras diluidas en forma seriada en tres medios de cultivo distintos (ver punto 2.8.3.): YPD sólido (ver punto 2.2.1.) para población total de levaduras, WLN (ver punto 2.2.2.) para diferenciación morfológica de especies y medio agar-Lisina, lo que disminuye el crecimiento de *S. cerevisiae* y se facilita el monitoreo de cepas no-*Saccharomyces* (Angelo y Siebert, 1987). Todas las placas fueron incubadas a 28°C y el conteo de colonias (UFC/mL) fue llevado a cabo luego de 4 días en medio

WLN para visualizar las diferencias de especies. De las colonias crecidas en medio YPD en cada fase de la fermentación y para cada condición del pie de cuba, se replicaron 20 colonias al azar para poder identificar la frecuencia de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* mediante análisis de ITS.

A continuación, en la Figura 2.1, se muestra el esquema de la investigación preliminar indicando los puntos de muestreo.

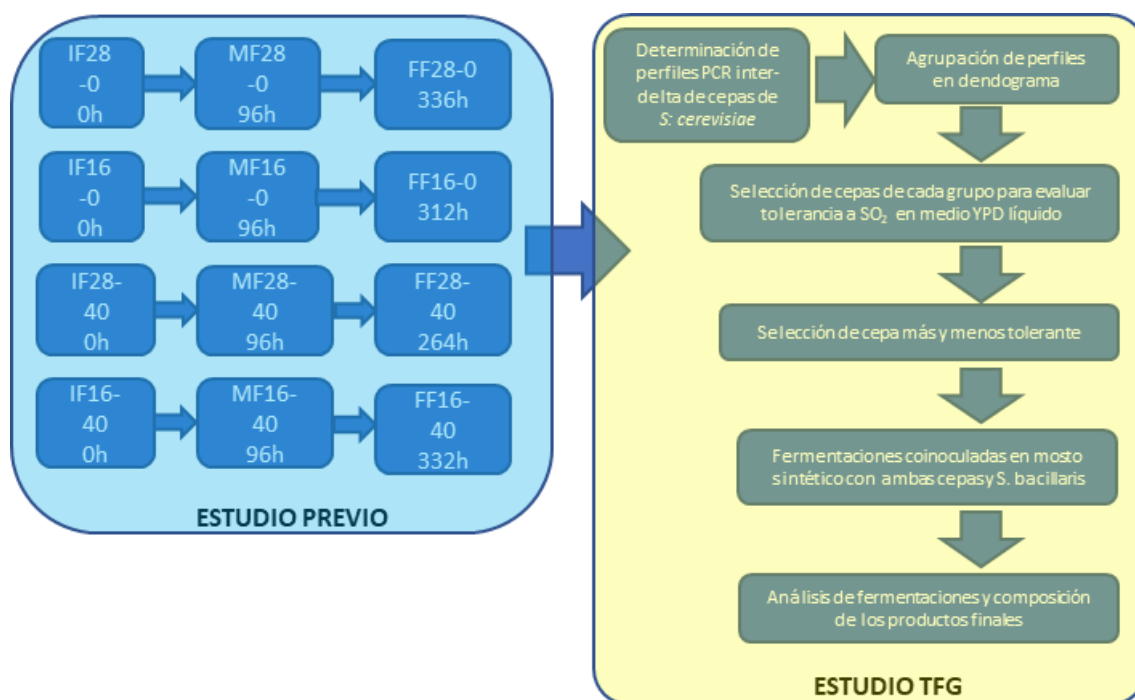


**Figura 2.1.** Esquema de investigación previa para obtención de cepas del presente estudio. PC: Pie de cuba, IF: Inicio de fermentación, MF: mitad de fermentación, FF: Final de fermentación. 28-0, 28-40, 16-0 y 16-40, representan las temperaturas y concentraciones de SO<sub>2</sub> en el pie de cuba desde los cuales partieron las fermentaciones, sin embargo, las fermentaciones principales (cuadro celeste), se llevaron a cabo a una temperatura de 16°C que es la temperatura a la que normalmente se fermentan las variedades blancas en la bodega.

## 2.2. Trabajo realizado

El presente trabajo se ha basado en las cepas de levaduras aisladas en cada fase de fermentación y las condiciones del pie de cuba para cada fermentación. Específicamente, se ha centrado en las 115 levaduras que fueron identificadas previamente como *S. cerevisiae* en base a su perfil de PCR- ITS (ver punto 2.4.2.). A partir de ellas, se trabajó en la tipificación mediante análisis de los elementos inter-delta (ver punto 2.3.3.). Se agruparon los perfiles similares y se tomaron 38 perfiles únicos o representativos de cepas con perfiles similares para evaluar su agrupación mediante un dendograma. Así, 27 de estos perfiles fueron evaluados para determinar su tolerancia a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> en microfermentaciones en

medio YPD a pH 3,3. De estas experiencias se seleccionó una cepa tolerante y una menos tolerante a SO<sub>2</sub>, para posteriormente llevar a cabo fermentaciones en mosto sintético a 28°C y 4 concentraciones distintas de SO<sub>2</sub> (0, 40, 80 y 160 mg/L). En estas fermentaciones, se co-inocularon ambas cepas, y también se llevaron a cabo fermentaciones de cada una de ellas con una cepa no-*Saccharomyces* como *Starmerella bacillaris* (aislada de viñedos del Priorat), evaluando finalmente las cinéticas de crecimiento, densidad y análisis de la composición química del producto final. A continuación, en la Figura 2.2., se muestra el esquema de la investigación del presente estudio.



**Figura 2.2.** Esquema del trabajo realizado. El punto de partida y cultivos usados como sustrato de estudio fueron las colonias aisladas a distintos tiempos de fermentación de las experiencias mostradas en la Figura 2.1.

### 2.3. Medios de cultivo

#### 2.3.1. YPD

YPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa, por sus siglas en inglés), es un medio general para el crecimiento de levaduras. En el Anexo 1, se muestra la composición de dicho medio, el que puede ser preparado en forma líquida para crecimiento de levaduras en suspensión o en forma sólida para ser dispuesto en placas de Petri y posibilitar el crecimiento de colonias.

### 2.3.2. Agar WLN

El agar WLN (Nutriente de Laboratorio Wallenstein, por sus siglas en inglés), es un medio para identificar levaduras con diferente perfil de morfología y color (Cavazza et al., 1992).

Cabe mencionar que el agar WLN (Becton, Dickinson and Company, France), ya viene preparado en polvo, por lo que se disolvieron 80 g del polvo en 1L de agua destilada (ver composición en Anexo 2) y se llevó a autoclave a 121°C durante 20 min, para posteriormente ser dispuesto en placas Petri para su uso.

### 2.3.3. Mosto sintético

El mosto sintético utilizado para evaluar el crecimiento de cepas seleccionadas se preparó de acuerdo con lo mencionado en Beltran et al (2004). El Anexo 3, muestra la composición del mosto sintético y de sus soluciones stock.

Para su preparación, se disolvieron los azúcares, los ácidos, las sales minerales y la sal de amonio en agua destilada y se autoclavó a 121 °C durante 20 min. Después de autoclavar y mantener a temperatura ambiente el medio, se adicionaron las cuatro soluciones stock mencionadas en el Anexo 3 y se ajusta el pH a un valor de 3,3 con una solución concentrada de NaOH para finalmente ajustar el volumen final con agua destilada. Para terminar, se esteriliza el mosto sintético en un sistema de filtración a vacío con un filtro de 0,2 µm.

## 2.4. Caracterización de cepas

### 2.4.1. Extracción de ADN desde colonias

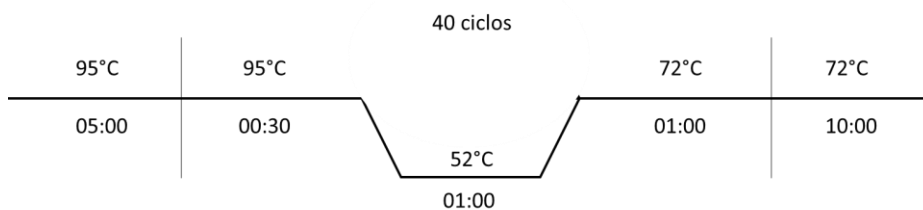
Previamente a la caracterización molecular de las cepas de *S. cerevisiae* autóctonas aisladas, se llevó a cabo la extracción de ADN desde muestras de las colonias seleccionadas. A continuación, se describe el protocolo de extracción.

- Disponer la mitad de una colonia extraída de placa de Petri en un eppendorf con 1 mL de agua destilada esterilizada y homogenizar la suspensión en vortex.
- Centrifugar la suspensión a 10.000 rpm durante 2 min.
- Descartar el sobrenadante y volver a suspender el pellet celular en 700 µL de agua destilada esterilizada.
- Disponer los 700 µL de suspensión en un tubo con 1 g de bolitas de 0,5 mm de diámetro.
- Los tubos con muestra son sometidos a la ruptura celular mediante cizalle con las bolitas en el equipo Mini-bead-beater-16 (Biospec Products, Inc., USA) en 3 ciclos de 1 min cada uno. Entre cada ciclo se mantienen los tubos en hielo durante 1 min.
- Centrifugar los tubos con muestra a 10.000 rpm durante 2 min.

- Recoger el sobrenadante (cerca de 400  $\mu\text{L}$ ) y disponerlo en tubos estériles para almacenarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en análisis de PCR.

#### 2.4.2. Análisis 5,8s-ITS

El análisis 5,8s-ITS fue usado para diferenciar entre especies de levaduras pertenecientes a *S. cerevisiae* y las no-*Saccharomyces*, siguiendo el protocolo descrito por Esteve-Zaroso et al. (1999). Este método incluye la amplificación de la región comprendida entre los genes rADN 18S y 26S. Los cebadores y compuestos utilizados para el análisis se muestran en el Anexo 4. El programa PCR para la obtención de los productos, se muestra a continuación en la Figura 2.3.

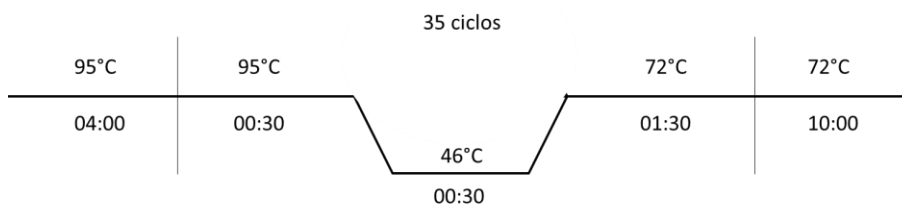


**Figura 2.3.** Programa de amplificación por PCR para fragmentos ITS

Para visualizar los productos obtenidos de PCR, se revelaron los perfiles de tamaño de pares de bases de cada muestra (5  $\mu\text{L}$ ) a través de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% conteniendo Green Safe Premium (Nzytech, Portugal) como agente revelador (4  $\mu\text{L}$  por cada 100 mL de solución de agarosa)

#### 2.4.3. Análisis inter-delta

El análisis inter-delta se llevó a cabo para identificar distintos perfiles de cepas de *S. cerevisiae*. La metodología se basa en el estudio de Legras y Karst (2003) con algunas modificaciones, de acuerdo con el siguiente protocolo. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 26  $\mu\text{L}$  que contiene 2  $\mu\text{L}$  del ADN extraído de las colonias mencionado en el protocolo anterior. En el Anexo 5, se muestran las secuencias de los cebadores y los compuestos usados para el análisis. La reacción de amplificación fue llevada a cabo con un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific Inc. España) usando el programa mostrado en la Figura 2.4.



**Figura 2.4.** Programa de amplificación por PCR para delta.

#### 2.4.4. Software GelJ v 2.0

Los patrones resultantes de fragmentos delta en electroforesis, fueron procesados usando el programa GelJ v 2.0 (Departamento de Matemáticas y Ciencias de la Computación de la Universidad de La Rioja, España). El dendograma resultante se construyó con el método UPGMA (siglas en inglés para grupo de pares no ponderados usando la media aritmética) (Guzzon et al, 2018). La matriz de similitud fue construida usando el coeficiente de similitud de Pearson (Vigentini et al, 2011) permitiendo una tolerancia de migración de banda del 5%. Las cepas se agrupan cuando el coeficiente de similitud es mayor a 90%.

#### 2.5. Evaluación de la resistencia a dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>)

Se tomaron 27 cepas representativas de los perfiles encontrados mediante similitud al 90% con el programa GelJ v 2.0. Dichas cepas fueron usadas para estudiar su tolerancia a SO<sub>2</sub> en medio YPD líquido. El pH se ajustó a un valor de 3,3 con una solución de ácido tartárico a 67 g/L. Después, para obtener las distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>, se preparó una solución de YPD líquido con pH ajustado y la cantidad necesaria de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para lograr una concentración de 320 mg/L (que equivale a 160 mg/L de SO<sub>2</sub> libre). Esta solución se diluyó en forma seriada para obtener concentraciones de 80, 40 y 20 mg/L. Como control también se usó YPD con pH ajustado a 3,3 pero sin adición de SO<sub>2</sub>. A continuación, cada una de las colonias seleccionadas, se suspendieron en YPD líquido y, gracias a conteo de células al microscopio en cámara de Neubauer, se ajustó la concentración inicial a 1,5x10<sup>6</sup> células/mL en 0,5 mL de YPD con las distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>. Este volumen se distribuyó en placas de 96 pocillos de fondo plano, donde cada pocillo contó con 200 µL. Las experiencias se llevaron a cabo en duplicado para cada concentración de SO<sub>2</sub> y cepa seleccionada.

#### 2.6. Cinéticas de crecimiento a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> en medio YPD

Para la obtención de las cinéticas de crecimiento de las cepas seleccionadas a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>, se utilizó el lector de placas POLARstar Omega (BMG, Labtech, España). La configuración del equipo fue establecida para mediciones de absorbancia, OD (600 nm), cada hora durante 24 h. El compartimento de la placa con muestras se mantiene a 28°C y bajo agitación orbital a 700 rpm, 5 s antes de cada medición para mantener la homogeneidad de la suspensión.

#### 2.7. Fermentaciones alcohólicas con cepas seleccionadas

Para evaluar las cinéticas de fermentación en mosto sintético (densidad inicial de 1090 g/L) con distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>, se usaron cepas con alta y con baja tolerancia a SO<sub>2</sub> (analizadas de acuerdo con el punto 2.6.), se seleccionaron dos cepas de *S. cerevisiae* y una cepa no-*Saccharomyces*, *S. bacillaris*, por ser una de las más abundantes tanto en uvas durante vendimia, mosto recién prensado y durante el

proceso fermentativo (Wang et al., 2015). Las fermentaciones se llevaron a cabo con la co-inoculación de dos cepas y a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> como se muestra en Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Diseño de experimentos para fermentaciones en mosto sintéticos a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>.

| Cepas a co-inocular   | Concentración de SO <sub>2</sub> en mosto sintético (mg/L) |    |    |     |
|---|--|----|----|-----|
|   | 0  | 40 | 80 | 160 |
| <i>S. cerevisiae</i> tolerante a SO <sub>2</sub> y <i>S. cerevisiae</i> no tolerante a SO <sub>2</sub> (SR/SNR) | 0  | 40 | 80 | 160 |
| <i>S. cerevisiae</i> tolerante a SO <sub>2</sub> y <i>S. bacillaris</i> (SR/SB)                                 | 0  | 40 | 80 | 160 |
| <i>S. cerevisiae</i> no tolerante a SO <sub>2</sub> y <i>S. bacillaris</i> (SNR/SB)                             | 0  | 40 | 80 | 160 |

El volumen inicial de cada fermentación fue de 100 mL en frascos plásticos estériles. La población inicial de cada una de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y para *Starmerella bacillaris* fue de 1x10<sup>6</sup> cel/mL. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 28°C en incubadora con agitación a 150 rpm. Cada 24 h se tomaron muestras de 5 mL para cuantificación de células totales al microscopio, células viables en placas con medio WLN (para identificar las cepas de *Saccharomyces* de la no-*Saccharomyces*) y densidad. Sumado a esto, cuando la densidad se encuentra cercana a 1000 g/L, se detiene la fermentación, se centrifuga el medio y se cuantifican los compuestos en el sobrenadante (sustratos remanentes y productos de la fermentación) mediante HPLC.

## 2.8. Monitoreo de la fermentación alcohólica

### 2.8.1. Densidad

El análisis de densidad es un método de seguimiento de las cinéticas de fermentación, debido a que la disminución de la densidad está directamente relacionada con el consumo de azúcar durante la fermentación alcohólica. Para la medición, se utilizó un densitómetro electrónico (Densito 30PX Portable Density Meter, Mettler Toledo, Hospitalet de Llobregat, Spain) que requiere aproximadamente 5 mL de muestra para la medición.

### 2.8.2. Conteo de células al microscopio

El conteo de la población celular total se llevó a cabo a través de conteo al microscopio (Leica Microsystems GMS QmbH, Leica, Germany) usando cámara de Neubauer. Para ello, se seleccionaron 5 campos de conteo y se calculó la cantidad de células/mL de la siguiente forma:

$$\sum \text{células totales} * 5 * 10.000 * Fd = \text{cantidad de células/mL,}$$

Donde Fd: Factor de dilución que se llevó a cabo desde la muestra original para favorecer el conteo.

### 2.8.3. Conteo de colonias en placa

La población celular viable durante la fermentación fue cuantificada mediante el conteo de colonias en placas con medio WLN para diferenciar morfologías de las cepas *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Se tomó una muestra diaria de las fermentaciones en mosto sintético y se realizaron diluciones seriadas en agua Milli-Q estéril (Millipore S.A.S., Molsheim, France). De las diluciones escogidas (de acuerdo con la estimación de conteo total, punto 2.8.2.), se toman 100  $\mu\text{L}$  y se dispersan en placa con medio WLN mediante bolitas de vidrio estériles. Se incuban las placas en estufa a 28°C durante 3 días para el crecimiento de las colonias. El número de unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL) se determinó de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$(\text{CFU/mL}) = n^{\circ} \text{ colonias en placa} \times 10 \times F_d$$

Donde,

10 es el factor debido a tomar 100  $\mu\text{L}$  de muestra y tener que expresar en 1 mL

$F_d$  es el factor de dilución de la muestra original extraída de la fermentación.

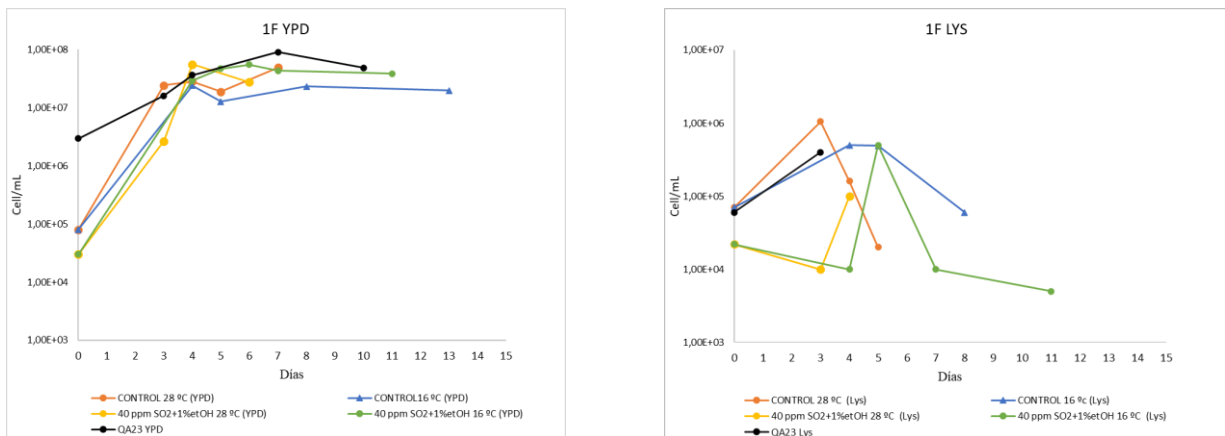
### 2.8.4. Análisis de HPLC

Los azúcares (glucosa y fructosa), etanol, glicerol y ácidos orgánicos (ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido succínico) en muestras de fermentaciones cuyas densidades están cercanas a 1.000 g/L, fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) usando un equipo Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) como se ha descrito en Quirós et al. (2010). El HPLC está equipado con una columna Hi-PlexH (300 mm x 7,7 mm) dentro de un compartimento de columna 1260 MCT (Infinity II Multicolumn Thermostat). La columna está conectada a detectores MWD (G1365B detector de longitud de ondas múltiples por sus siglas en inglés) y RID (1260 Infinity II detector de índice de refracción por sus siglas en inglés) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). La temperatura se mantiene a 60°C durante un tiempo de análisis de 30 min. La fase móvil es  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mM con un flujo de 0,6 mL/min. El volumen de inyección de la muestra es de 10  $\mu\text{L}$ . Pevio a la inyección, las muestras son filtradas con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Dominique Dutscher, Brumath, France). El programa OpenLAB CDS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) fue usado para analizar los cromatogramas obtenidos del HPLC.

### 3. Resultados y discusión

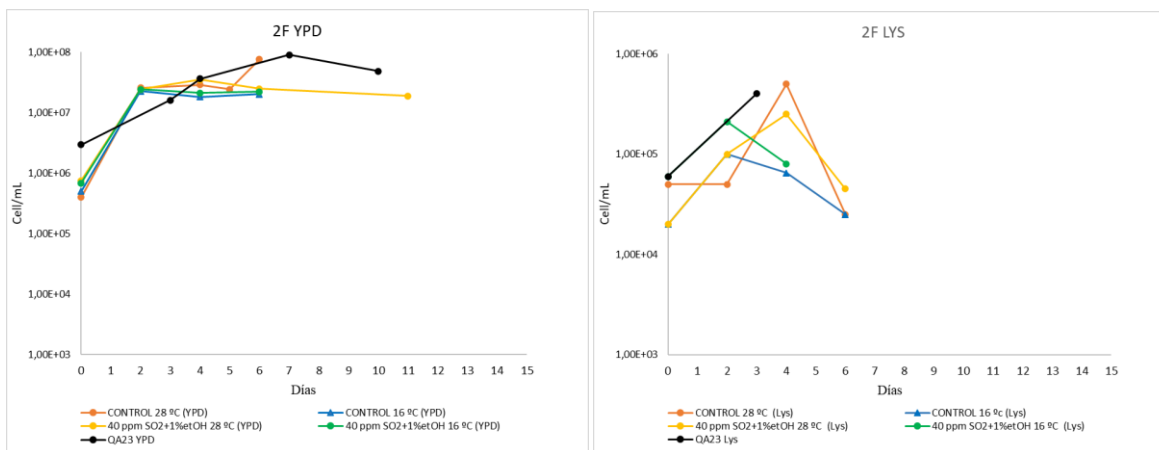
#### 3.1. Resultados preliminares

El grupo de Biotecnología Enológica realizó una experiencia en bodega con mosto natural moscatel de Alejandría cosechado en 2022. En dicha experiencia, se compararon las fermentaciones del mosto natural fermentado cuando era inoculado con una cepa comercial QA23 con las fermentaciones de dicho mosto inoculadas con pie de cuba elaborado con el propio mosto natural bajo distintas condiciones de temperatura (16°C y 28°C), contenido de sulfito (0 mg/L y 40 mg/L) y adición de alcohol (0% v/v y 1% v/v). Las CFU de levaduras en las fermentaciones preliminares se muestra la Figura 3.1, donde se puede apreciar que en medio YPD (que cuantifica CFU de levaduras totales) el número de levaduras autóctonas es de un orden similar de la levadura comercial (QA23) en todas las condiciones probadas, alcanzando un máximo a los 3-4 días de comenzar la fermentación. Por otra parte, el número de levaduras *Saccharomyces* enumeradas en medio Lisina (LYS) (que limita el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces* por no metabolizar Lisina), también es similar en la fermentación inoculada con QA23 y la no inoculada y sin SO<sub>2</sub> ni alcohol (Control a 16°C y 28°C). No obstante, en las fermentaciones preliminares no inoculadas con 40 mg/L de SO<sub>2</sub> y 1% de etanol, el número inicial de levaduras *no-Saccharomyces* es menor de partida.



**Figura 3.1.** Enumeración en CFU/mL en medio YPD y LYS de levaduras autóctonas y comerciales en fermentaciones preliminares a distintas condiciones iniciales de temperatura, contenido de sulfito y alcohol.

Tomando como inóculo un 2% (v/v) de las fermentaciones de la figura anterior, se genera una segunda fermentación para cada condición en 3L de mosto natural. La enumeración de levaduras en la fermentación principal se muestra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Crecimiento (CFU/ml) en medio YPD y LYS de levaduras autóctonas y comerciales en segundas fermentaciones (fermentación principal) elaboradas con 2% de pie de cuba (fermentación preliminar) obtenidos con distintas condiciones iniciales de temperatura, contenido de sulfito y alcohol.

Los resultados de la Figura 3.2, muestran que, si bien el número total de levaduras en la fermentación inoculada con QA23 es ligeramente superior a las otras condiciones ( $1 \times 10^8$  frente a  $5 \times 10^7$  cels/mL), la máxima población de levaduras se alcanza alrededor de los 2 días en todas las condiciones. Además, las levaduras no-*Saccharomyces* pueden recuperarse en placa hasta el 4-6º día en las fermentaciones realizadas con pie de cuba, mientras que en la fermentación inoculada con QA23 desaparecen al tercer día.

Se tomaron al azar 20 levaduras crecidas en YPD de cada condición de pie de cuba y segundas fermentaciones (inicio, mitad y final de fermentación) y se identificaron aquellas que eran pertenecientes al género *Saccharomyces* mediante PCR-ITS. De este modo, tomando las colonias aisladas se muestran a continuación los resultados obtenidos de cada una de las actividades contempladas en el presente estudio y mostradas en la Figura 2.2 del apartado anterior.

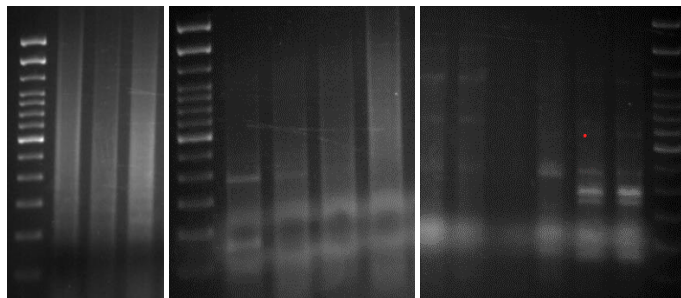
### 3.2. Optimización de muestras para PCR inter-delta y electroforesis

Para tipificar las distintas cepas de *Saccharomyces* aisladas en el anterior experimento se utilizaron los perfiles obtenidos mediante PCR de los elementos inter-delta de las distintas colonias. Se observó que dicha metodología no proporcionaba resultados óptimos ni reproducibles al trabajar con muestras directas de colonias (que es el protocolo usual del laboratorio donde se realizaron las prácticas). Por ello, se procedió a optimizar la metodología. El punto de partida de la metodología al momento de comenzar el estudio con amplificaciones de fragmentos inter-delta mediante PCR y electroforesis directamente a partir de muestras de colonias de cepas de *S. cerevisiae* muestra a continuación en la Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Electroforesis de elementos inter-delta para cepas de *S. cerevisiae*. El marcador de molecular de pares de bases (situado en los extremos del gel de agarosa) contiene los siguientes tamaños de arriba abajo: 2000, 1500, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 (pb).

Como se puede observar, no se detectan bandas en la electroforesis a partir de PCR directo de colonias. De esta forma, se evaluaron variables como: Cambio de cebadores y polimerasa (sin resultados que mejoraran la detección de los fragmentos), distintas diluciones de la colonia para PCR, tiempo de la colonia en placa (2 o 10 días de crecimiento en placa con medio YPD) y la extracción de ADN de colonia para su posterior amplificación por PCR inter-delta, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3.4.



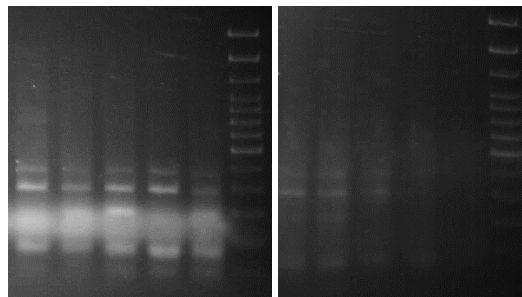
**Figura 3.4.** Electroforesis de elementos inter-delta para cepas de *S. cerevisiae*, con diluciones seriadas de cada colonia (izquierda), cepas de *S. cerevisiae* recién sembradas y crecidas a 28°C (centro) y cepas de *S. cerevisiae* recién sembradas a las que se les extrajo ADN para ser amplificado. El marcador de molecular de pares de bases contiene los siguientes tamaños de arriba abajo: 2000, 1500, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 (pb).

Como se puede apreciar, el efecto de la dilución de la colonia no presenta efectos en mejorar la detección de las bandas. Es uso de colonias recién con 2 días de crecimiento en placa con medio YPD, si posee un efecto en visualizar algunas bandas de fragmentos inter-delta. Este resultado podría estar determinado por heterogeneidad de edades de las células en una colonia de varios días de crecimiento, pudiendo existir células que ya finalizado su ciclo de vida y su ADN ya no sea estable. Esto puede deberse a que las células lisadas pueden liberar nucleasas y su ADN podría degradarse (Walsh et al., 1991). Entendiendo que la extracción de ADN para su amplificación es un trabajo que demanda mucho tiempo y según el método de extracción, se requiere de solventes (Annaluru et al., 2014) o kits enzimáticos como el de zymolasa

(Kitamura y Yamamoto, 1972), se ha probado el protocolo de extracción mostrado en el punto 2.4.1, que solo requiere del uso de bolitas de vidrio y un equipo para llevar a cabo la agitación necesaria que permite el rompimiento mecánico de las levaduras. De este modo, como se muestra en la Figura 3.4, se logra la detección de bandas con mayor definición.

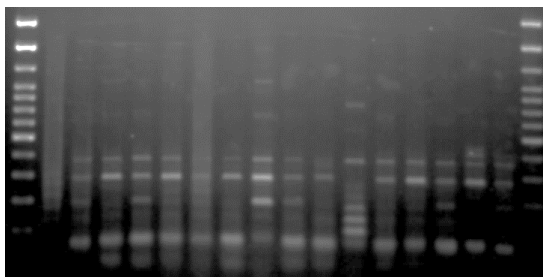
También se estudió cargar un mayor volumen del extracto de ADN para llevar a cabo el PCR, sin embargo, esto no mejoró la intensidad ni definición de las bandas, por lo que se mantienen 2  $\mu$ L de ADN extraído para futuras pruebas.

Después, se estudió la etapa de electroforesis usando las mejores condiciones encontradas hasta el momento (2  $\mu$ L de ADN extraído de colonias en la mezcla de PCR; colonias con 2 días de crecimiento en placas de YPD sólido; carga de 20  $\mu$ L por pocillo del gel de agarosa) con dos equipos de electroforesis distintos (APELEX ST305 y APELEX PS304) a 100v. El APELEX ST305 no aumenta la temperatura del tampón en el que está el gel, sin embargo, el APELEX PS304 si aumenta la temperatura, pudiendo afectar la difusión o definición de las bandas en el gel, provocando que, para las mismas muestras, en el APELEX ST305 se definan mejor las bandas, como se muestra a continuación en la Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Comparación del efecto de uso del equipo de electroforesis APELEX ST305 (izquierda) y el APELEX PS304 (derecha) para las mismas muestras.

De acuerdo con estos resultados, se continuó con el equipo APELEX ST 305 y, para terminar, se estudió el volumen de carga en cada pocillo, ya que 20  $\mu$ L pueden ser demasiado para los pocillos en geles de mayor número de muestras. Parte de la muestra sobrante podría estar quedando por sobre el gel y actuar como interferencia en el revelado. De este modo, se estudió la disminución de 20  $\mu$ L a 14  $\mu$ L, obteniendo el resultado mostrado en la Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Electroforesis de elementos inter-delta para ADN extraído de cepas de *S. cerevisiae* recién sembradas y crecidas a 28°C en YPD sólido y con un volumen de carga por pocillo de 14  $\mu$ L cargados desde el centro del gel hacia los extremos. El marcador de molecular de pares de bases contiene los siguientes tamaños de arriba abajo: 2000, 1500, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 (pb).

Con este resultado, se logra mayor definición de las bandas, pudiendo diferenciar claramente los perfiles de las muestras analizadas. En el Anexo 6, se muestra el protocolo final para el pretratamiento de la muestra (extracción de ADN) y su electroforesis en gel al 1,5% p/v de agarosa.

Por otra parte, también se recomienda el uso del protocolo desarrollado por Blount et al. (2016), quienes describen el método de extracción de ADN genómico mediante el uso de bolitas de vidrio, temperatura y una solución de Chelex 100. En general es similar al método optimizado en el presente trabajo en cuanto a que es un método de rompimiento mecánico de las levaduras, sin embargo, el uso de Chelex 100 (resina que remueve los iones metálicos polivalentes del lisado celular para evitar que actúen de co-factores para las nucleasas de las levaduras) permite que el ADN se mantenga estable al evitar la acción de las nucleasas. Con el protocolo optimizado, se comenzó la caracterización de las cepas y su posterior agrupación para identificar los perfiles de cepas de *S. cerevisiae* implicados en las fermentaciones espontáneas a partir de pie de cuba tratado a distintas condiciones de temperatura, contenido de sulfito y etanol.

### 3.3. PCR de colonias seleccionadas de fermentaciones y selección para realizar el dendograma

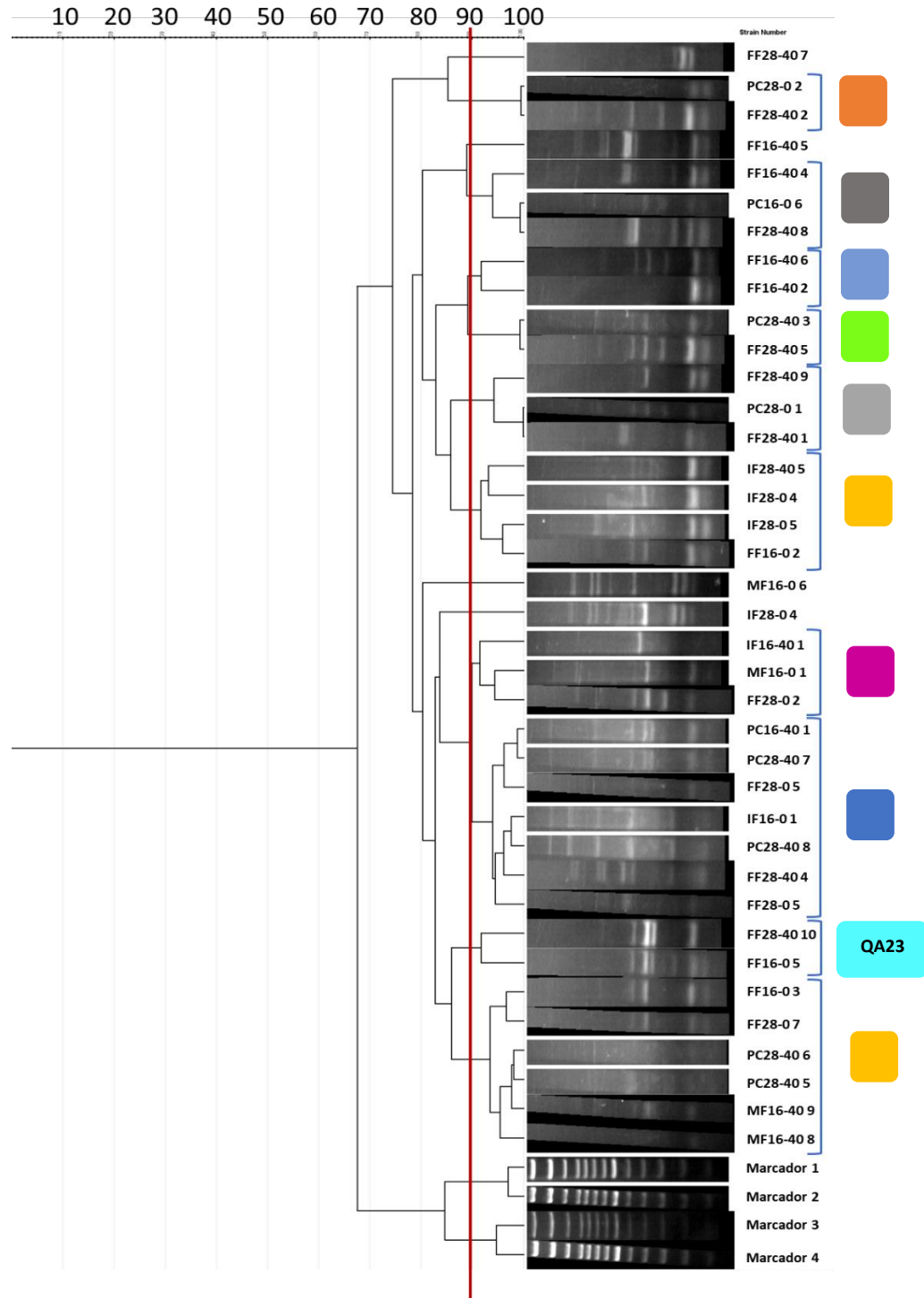
Una vez optimizada la metodología para el pretratamiento de muestras para llevar a cabo la PCR inter-delta y las condiciones para efectuar la electroforesis, se procedió a obtener los perfiles de la cepa comercial QA23 y de las cepas aisladas identificadas como *S. cerevisiae* por PCR-ITS (ver Figura 2.1). Estas cepas se aislaron en los pies de cuba y en las distintas etapas de fermentación (inicio, mitad y final) de las 4 fermentaciones alcohólicas inoculadas con dichos pies de cuba realizados en distintas condiciones de temperatura (28°C y 16°C) y contenido de sulfito y etanol (0 mg/L de SO<sub>2</sub> y 0%; 40 mg/L de SO<sub>2</sub> y 1% de etanol). Así, se obtuvo el perfil de fragmentos inter-delta de 115 colonias, de las cuales se determinó el

tamaño de cada fragmento para poder ordenarlas de acuerdo con su similitud de perfiles, obteniendo la información mostrada a continuación en la Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Perfiles de fragmentos inter-delta de cepas de *S. cerevisiae*. Cada columna pertenece a una cepa diferente y las zonas sombreadas corresponden a los fragmentos identificados en la electroforesis según su tamaño en pb.

En relación al resultado obtenido de los fragmentos inter-delta de las cepas tanto de los pies de cuba como de las distintas etapas de las fermentaciones a partir de dichos pies de cuba, se pueden agrupar algunos perfiles que poseen alta similitud, sin embargo, se puede observar que existen perfiles que podrían tener mayor divergencia, por lo tanto, se tomaron 38 muestras de estos perfiles divergentes, incluyendo también algunos de los perfiles que si poseen alta similitud para evaluar si se agrupan entre ellos. De este modo, se llevaron a cabo nuevas electroforesis de fragmentos inter-delta de las cepas seleccionadas para poder tenerlas en 2 geles de agarosa y poder procesarlas mediante el programa GelJ v 2.0, con el que se pudo obtener el siguiente dendograma con la agrupación de perfiles con un 90% de similitud y un 5% de tolerancia en la migración de las bandas (Figura 3.8).



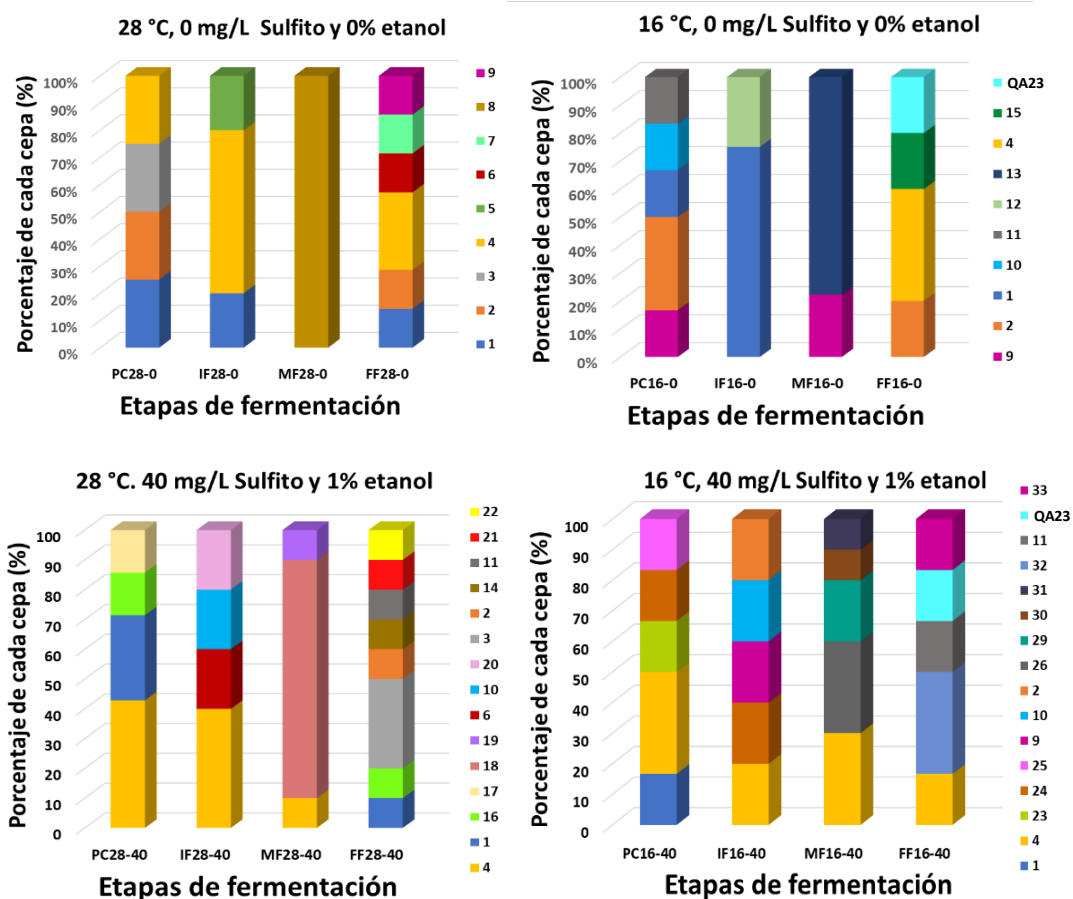
**Figura 3.8.** Dendrograma obtenido con los perfiles inter-delta de las 38 cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas. Los colores de los grupos se relacionan con los que se muestran en la Figura 3.9.

Como se puede apreciar, las 38 cepas de *S. cerevisiae* sometidas a comparación de perfiles inter-delta en el programa GelJ v 2.0, se agruparon en 14 grupos. Cabe destacar que las condiciones para establecer las

agrupaciones son de una similitud mínima de un 90%, usada también en otros estudios previos (Lleixà et al., 2021). Además, la metodología para la agrupación mediante UPGMA y el cálculo de similitud por el coeficiente de Pearson, también han sido usados por otros autores (Pérez-Díaz et al., 2021). Al analizar los grupos del dendograma así como el conjunto global de los 115 perfiles, resultan 33 perfiles diferentes, cuya distribución se analizará a continuación.

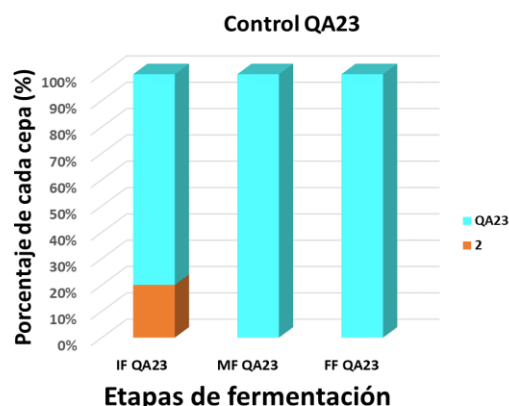
### 3.4. Dinámica de poblaciones de *S. cerevisiae* durante fermentaciones alcohólicas espontáneas

Gracias a los perfiles inter-delta de las distintas cepas aisladas en las fermentaciones preliminares (PC) y en las distintas etapas de fermentaciones principales (IF, MF y FF), se siguió la dinámica de *Saccharomyces* autóctonas, observando cómo les afectan las distintas condiciones usadas para realizar el pie de cuba (Figura 3.9) y compararlas con la fermentación inoculada con la cepa comercial QA23 (Figura 3.10).



**Figura 3.9.** Dinámica de población de distintas cepas de *S. cerevisiae* aisladas durante PC (pie de cuba), IF (Inicio de fermentación), MF (Final de fermentación), FF (Final de fermentación). 28-0 y 16-0 (28°C o 16°C, sin SO<sub>2</sub> y sin etanol). 28-40 y 16-40 (28°C o 16°C, con 40 mg/L SO<sub>2</sub> y 1% v/v etanol)

En las fermentaciones inoculadas con levadura comercial QA 23, se observó su imposición desde el principio de la fermentación, detectándose una única cepa de *S. cerevisiae* autóctona (perfil 2) que también se detectó en el pie de cuba sin sulfito ni etanol tanto a 16 como 28°C y también al final de fermentaciones principales realizadas con dichos pies de cuba (Figura 3.9). Además, el perfil 2, es uno de los 3 perfiles que se repite en las 4 fermentaciones, por lo que podrían ser foco de estudio en futuras investigaciones. Así, la fermentación inoculada con la cepa comercial no fue contaminada por levaduras autóctonas y en las fermentaciones realizadas con pie de cuba, no encontramos contaminación levadura comercial salvo a final de fermentaciones con pie de cuba elaborado a 16°C, pero en baja proporción.



**Figura 3.10.** Control de fermentación alcohólica con levadura comercial QA23. IF, MF y FF, son inicio, mitad y final de fermentación respectivamente.

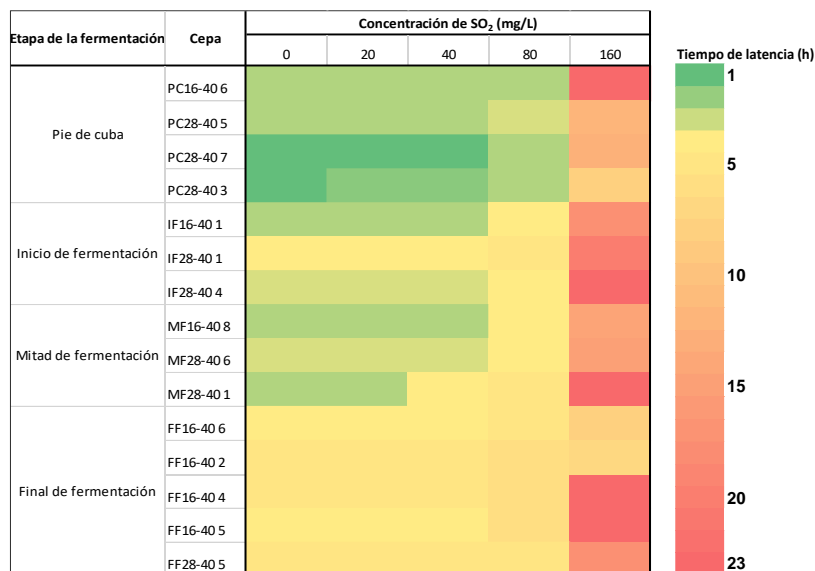
Cabe destacar que, la influencia de la adición de  $\text{SO}_2$  y etanol aumenta la diversidad de cepas presentes, pasando de 9 a 15 cepas a 28°C, y de 10 a 16 cepas a 16°C. En las fermentaciones realizadas con pie de cuba a 28°C hay 5 perfiles en común y 10 nuevos, mientras que con pie de cuba a 16°C hay 7 perfiles en común y 9 nuevos. Estos resultados se ajustan a los hallazgos de Morgan et al. (2019), quienes también estudiaron el efecto de la adición de  $\text{SO}_2$  sobre la comunidad microbiana en pie de cuba que luego fue inoculado a un mosto de variedad Chardonnay. Sus resultados mostraron que 40 mg/L de  $\text{SO}_2$ , alteró la composición de cepas de *Saccharomyces* en el pie de cuba, aumentando la diversidad de levaduras autóctonas, concordando con el presente estudio.

Por otra parte, el presente estudio observa los efectos combinados de la adición de 40 mg/L de  $\text{SO}_2$  y 1% etanol en el pie de cuba, lo que no permite separar el efecto de cada factor en la dinámica de población. No obstante, un estudio previo (Moschetti et al., 2016) investigó la adición de 1,5 y 3% v/v de etanol a mostos de vino tinto para fermentaciones espontáneas a 26°C, las que sirvieron como pie de cuba para una posterior fermentación. Así, los autores observaron que la diversidad de cepas de *S. cerevisiae*

aumentó incluso al final de la fermentación alcohólica, lo que concuerda con los resultados mostrados en el presente trabajo. En el presente estudio, la menor diversidad de cepas *Saccharomyces* se obtuvo a mitad de fermentación y la máxima al final de cada fermentación, excepto a 16°C con sulfito y etanol (que mantiene constante su diversidad, a pesar de que las cepas cambian en cada etapa (Figura 3.9).

### 3.5. Selección de cepas de cada grupo para evaluación de tolerancia a SO<sub>2</sub>

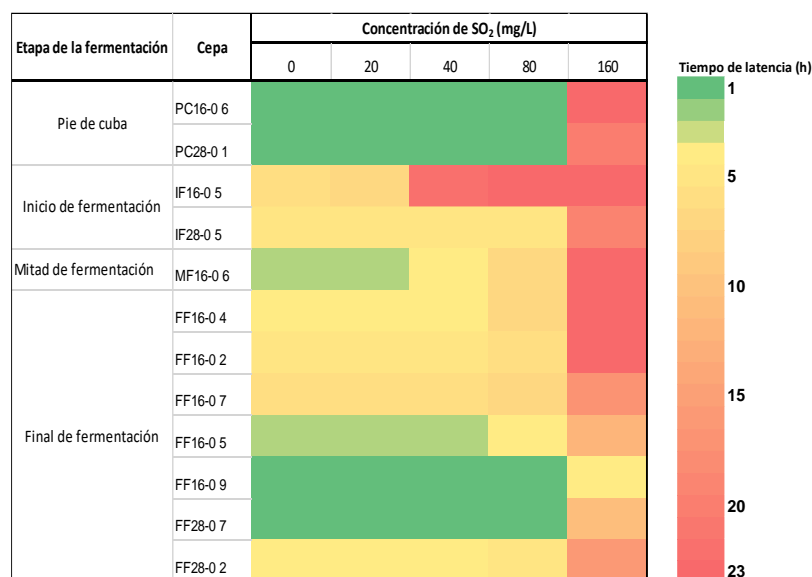
Se seleccionaron cepas de los grupos resultantes de la caracterización de perfiles inter-delta, tomando 27 cepas para analizar su tolerancia a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>. Así, las 27 cepas se inocularon en medio YPD líquido con distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> y se evaluaron sus cinéticas de crecimiento (ver Anexo 7) a través del seguimiento de DO (densidad óptica) a 600 nm en placas de 96 pocillos. Cada experiencia se llevó a cabo en duplicado y se estimó el tiempo de latencia de cada cepa a las distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> en el medio, lo que se muestra en la Figura 3.11.



**Figura 3.11.** Mapa de calor de tiempos de latencia de cinéticas de crecimiento a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> al usar cepas provenientes de pies de cuba a los que se le adiciona SO<sub>2</sub> y etanol y sus respectivas fermentaciones principales. En el nombre de las cepas: PC (pie de cuba); IF, MF y FF (inicio, mitad y final de fermentación principal); 16 y 28 (16 y 28°C en el pie de cuba); 40 (adición de 40 ppm de SO<sub>2</sub> en el pie de cuba).

Cabe mencionar que se estimó que un mayor tiempo de latencia en la curva de crecimiento de las cepas indicaba una mayor sensibilidad a SO<sub>2</sub>. En el caso de cepas aisladas en pie de cuba elaborado con adición de SO<sub>2</sub> y etanol y las fermentaciones principales respectivas, tal y como se puede apreciar en la Figura 3.11, los menores tiempos de latencia se dan en cepas aisladas en el pie de cuba, aumentando de forma

general en cepas aisladas hacia el final de las fermentaciones. Sin embargo, algunas de las cepas presentes al final de la fermentación muestran menores tiempos de latencia a concentraciones muy altas de SO<sub>2</sub> en el medio YPD (por ejemplo, las cepas FF16-40 6 y FF16-40 2 a 160 g/L de SO<sub>2</sub>), por lo que demuestran ser más tolerantes. Respecto al comportamiento de las cepas sin la adición de SO<sub>2</sub> y etanol, los resultados se muestran en la Figura 3.12.



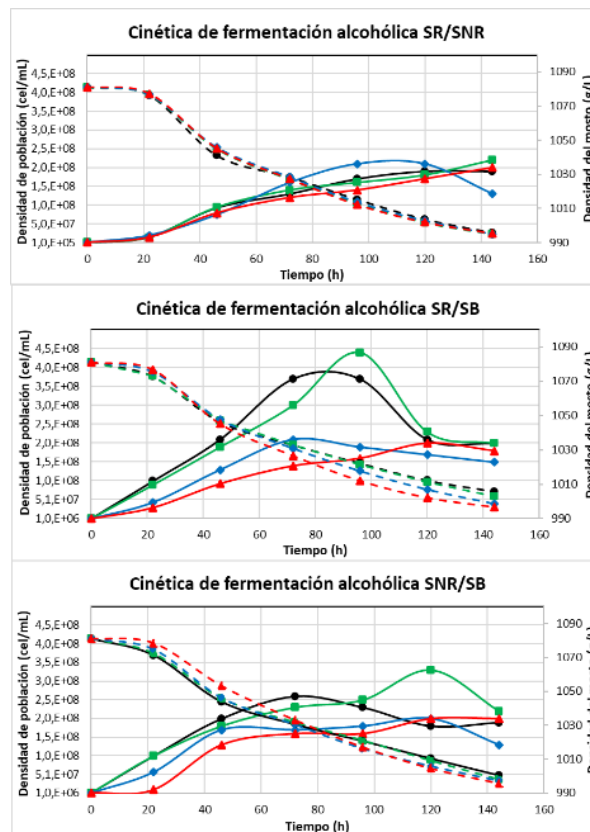
**Figura 3.12.** Mapa de calor de tiempos de latencia de cinéticas de crecimiento a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> al usar cepas provenientes de pies de cuba a los que no se le adiciona SO<sub>2</sub> ni etanol y sus respectivas fermentaciones principales. En el nombre de las cepas: PC (pie de cuba); IF, MF y FF (inicio, mitad y final de fermentación principal); 16 y 28 (16 y 28°C en el pie de cuba).

En las cepas aisladas de los pies de cuba sin suplementación de SO<sub>2</sub> y etanol y sus respectivas fermentaciones preliminares, se encuentran tiempos de latencia más bajos en cepas aisladas de pie de cuba y también en algunas cepas presentes al final de la fermentación. Encontramos, no obstante, consistencia en que las cepas que muestran menores tiempos de latencia a la máxima concentración de SO<sub>2</sub> (160 mg/L) son cepas de final de fermentación (por ejemplo, cepa FF16-0 9).

### 3.6. Competitividad fermentativa de 2 cepas de *Saccharomyces* autóctonas de alta y baja tolerancia a SO<sub>2</sub> y *S. bacillaris* a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>

Con objeto de analizar si la resistencia a SO<sub>2</sub> afecta a la competición de las levaduras autóctonas aisladas, se seleccionó una cepa que, según los resultados del apartado anterior, había demostrado tener alta tolerancia a SO<sub>2</sub>: FF16-40 2 (**SR**, *Saccharomyces* resistente) y otra cepa con baja tolerancia a SO<sub>2</sub> como la

MF28-40 6 (SNR, *Saccharomyces* no resistente). Dichas cepas fueron co-inoculadas en mosto sintético con distintas concentraciones  $\text{SO}_2$  (0, 40, 80 y 160 mg/L) a la misma concentración celular inicial ( $1 \times 10^5$  cels/mL). Por otro lado, también se evaluó la capacidad de que estas dos cepas compitan con una cepa de no-*Saccharomyces* como *S. bacillaris* (SB) aislada de viñedos del Priorat y utilizada a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  cels/mL. Esta especie una de las más abundantes en uvas y mostos de la región de Cataluña (Mas et al., 2016; Padilla et al., 2016). Dichas fermentaciones se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones de la Tabla 2.1, a 3 concentraciones de  $\text{SO}_2$  y un control sin adición de  $\text{SO}_2$ ,  $28^\circ\text{C}$  y pH 3,3. Las fermentaciones fueron detenidas a densidades inferiores a 1000 g/L. A continuación, en la Figura 3.13, se muestran los resultados de la disminución de la densidad y cinética de crecimiento de células totales durante la fermentación alcohólica.



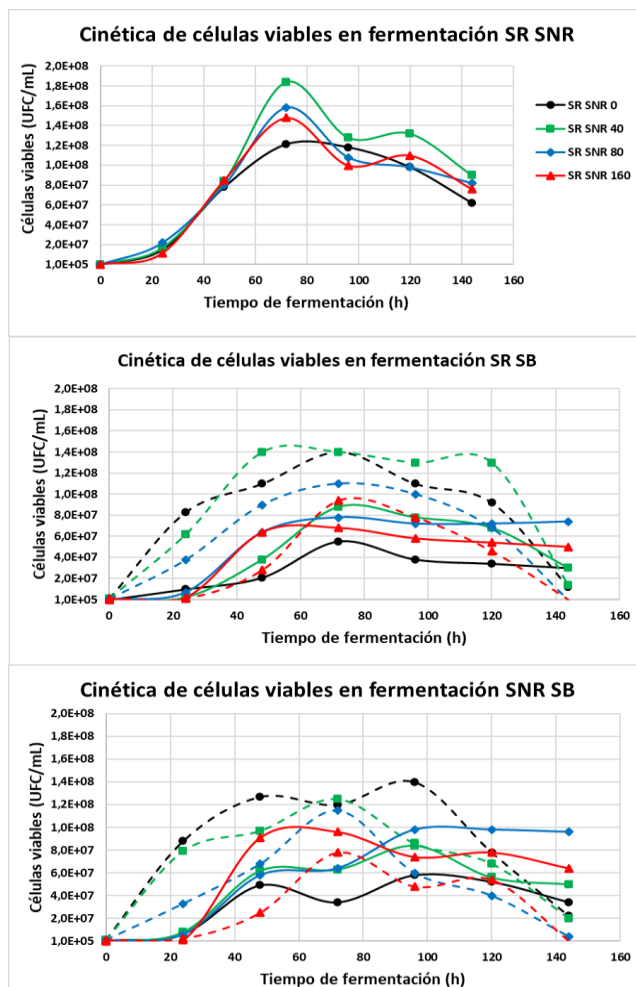
**Figura 3.13.** Cinética de fermentaciones con co-inoculación de cepas de *S. cerevisiae* tolerantes y no tolerantes a  $\text{SO}_2$  (SR y SNR respectivamente) y *S. bacillaris* (SB). Se representan las cinéticas de crecimiento de fermentaciones sin adición de sulfito —●—, con la adición de 40 mg/L de  $\text{SO}_2$  —■—, 80 mg/L de  $\text{SO}_2$  —◆— y 160 mg/L de  $\text{SO}_2$  —▲—. También se representa la disminución de densidad durante las fermentaciones alcohólicas, mostrando la densidad de fermentaciones sin adición de  $\text{SO}_2$  —●—, fermentaciones con adición de 40 mg/L de  $\text{SO}_2$  —■—, 80 mg/L de  $\text{SO}_2$  —◆— y 160 mg/L de  $\text{SO}_2$  —▲—.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 3.13, el decaimiento de la densidad se aprecia muy similar entre en todas las experiencias, sin embargo, las cinéticas de crecimiento de células totales (determinado por conteo al microscopio), varía dependiendo de las co-inoculaciones realizadas, lo que implica que se dan interacciones distintas entre ambas cepas de *S. cerevisiae* con *S. bacillaris*. Las mayores poblaciones de levaduras se dan en co-inoculación de ambas *Saccharomyces* con *S. bacillaris* (aproximadamente  $4 \times 10^8$  cels/mL) especialmente en las fermentaciones sin sulfito o con 40 mg/L de  $\text{SO}_2$ . Otra información que es posible rescatar de la Figura 3.13, es que al co-inocular ambas cepas de *S. cerevisiae*, las pendientes de las curvas de crecimiento al inicio de la fase exponencial (entre las horas 20-40) son muy similares de forma que, independientemente de la concentración de  $\text{SO}_2$ , se observa un periodo de latencia de unas 20 horas, lo cual podría indicar problemas de competencias entre las dos especies. No obstante, en la experiencia de co-inoculación de SR con SB y SNR con SB casi no se observa tiempo de latencia siendo las pendientes de las curvas de crecimiento menores solo al aumentar la concentración de  $\text{SO}_2$ , lo cual podría indicar un efecto positivo en el crecimiento de la SR y SNR inducido por la SB. Sin embargo, al co-inocular SNR y SB bajo 160 mg/L de  $\text{SO}_2$ , la población tiene un periodo de latencia de unas 20 horas, al igual que ocurría al co-inocular las dos *Saccharomyces*. Este resultado parece indicar que concentraciones por encima de 80 mg/L de sulfito, la *S. bacillaris* ya no ejerce su efecto positivo, debido posiblemente a su mayor sensibilidad a dicho compuesto (ver Anexo 8). Cabe destacar que estas experiencias se han llevado a cabo de forma exploratoria, por lo que se propone su validación en triplicado para futuras investigaciones. Los resultados de la Figura 3.13 son de células totales/mL, incluyendo tanto células muertas como viables, por lo que posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de células viables a través del conteo de colonias en placa (CFU) para visualizar las cinéticas de ambas levaduras en las fermentaciones. En la Figura 3.14 se muestra la identificación de ambos géneros.



**Figura 3.14.** Cepa de *Saccharomyces* (blancas) y cepa de *S. bacillaris* (verde) en cultivo en placa con medio WLN (izquierda). PCR-ITS para identificación y verificación (derecha), bandas de 850 pb fueron recolectadas de las colonias blancas y las 500 pb de colonias verdes. El marcador de molecular de pares de bases contiene los siguientes tamaños de arriba abajo: 2000, 1500, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 (pb).

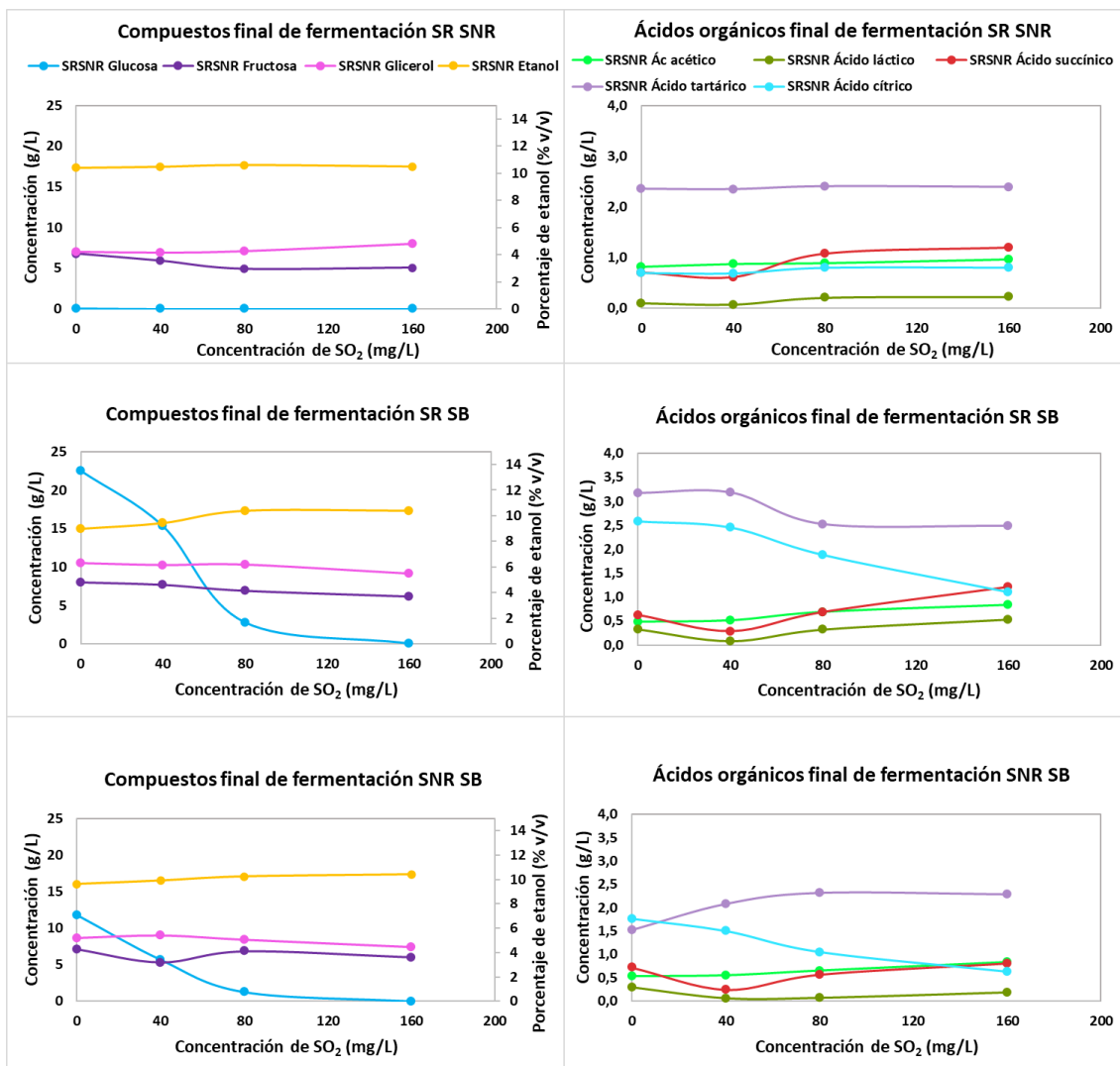
De esta forma, se corroboró mediante las diferencias morfológicas en medio WLN y su validación por PCR-ITS (Figura 3.14), que en los recuentos se pueden realizar de forma separada para las *Saccharomyces* y las no-*Saccharomyces* (*S. bacillaris*). Estos resultados confirman que las colonias blancas se tratan del género *Saccharomyces* (Valente et al., 1996), al estar en el rango cercano a 850 pb y las colonias verdes de *S. bacillaris*, se encuentran con un rango entre 400 y 500 pb, lo que las sitúa dentro de su antiguo género (*Candida*) (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Usando estos resultados, se estimó la cinética de células viables (CFU/mL) de cada población por separado, lo que se muestra en la Figura 3.15.



**Figura 3.15.** Cinéticas de crecimiento células viables de fermentaciones con co-inoculación de cepas de *S. cerevisiae* tolerantes y no tolerantes a  $\text{SO}_2$  (SR y SNR respectivamente y representadas con línea continua) y *S. bacillaris* (SB, representadas con línea discontinua). Se representan las cinéticas de crecimiento de fermentaciones sin adición de sulfito ●, con la adición de 40 mg/L de  $\text{SO}_2$  ■, 80 mg/L de  $\text{SO}_2$  ◆ y 160 mg/L de  $\text{SO}_2$  ▲.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 3.15, para el caso de la cinética de células viables en la co-inoculación de SR con SNR, se mantiene la tendencia de mostrar un periodo de latencia en el crecimiento de células totales cercano a 20 h y a que las pendientes en fase de crecimiento exponencial son similares, no obstante, se generan diferencias respecto a la curva sin adición de  $\text{SO}_2$ , que es donde menos crecimiento total observamos. No obstante, en todos los casos, la cantidad de células viables comienza a decaer posteriormente a las 70 h de fermentación a 28°C. Respecto a los casos en que se co-inoculó SB, se puede mencionar que las células viables de SB disminuyen la pendiente de la recta en fase exponencial en forma indirectamente proporcional a la concentración de  $\text{SO}_2$  en el mosto sintético. No obstante, para el caso de 160 mg/L de  $\text{SO}_2$ , también presentan un tiempo de latencia de 20 h (como se observó en conteo a microscopio). En el caso de las cepas SR y SNR co-inoculadas con SB, muestran un comportamiento de células viables con un tiempo de latencia cercano a 24 h, llegando a un máximo entre las 50 h y 70 h, manteniéndose relativamente constante su viabilidad hasta el final de la fermentación. En estos casos, las pendientes de las curvas de crecimiento muestran una tendencia directamente proporcional con la concentración de  $\text{SO}_2$  en el mosto sintético, lo que puede estar dado no por la acción del sulfito directamente sobre las cepas SR y SNR, sino por el efecto negativo que tiene el sulfito en las cepas de SB, lo que le permitiría a las SR y SNR comenzar su crecimiento en el medio. Es sabido que las levaduras no-*Saccharomyces* suelen ser más sensibles a  $\text{SO}_2$  que las *Saccharomyces* (Giacommo y Nardi, 2021). Al respecto, para poder validar el efecto negativo del  $\text{SO}_2$  sobre la cepa de *S. bacillaris*, se llevó a cabo el seguimiento de las cinéticas de DO a 600 nm de dicha cepa de forma aislada en lector de placa de acuerdo con la metodología 2.6. (ver Anexo 8). Al respecto, el crecimiento de *S. bacillaris* es afectado desde los 20 mg/L de  $\text{SO}_2$ , mientras que en la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* es a partir de 80 mg/L de  $\text{SO}_2$  (ver Anexo 7). Esto apoya los resultados mostrados en las fermentaciones co-inoculadas con *S. bacillaris*.

Finalmente, al terminar las fermentaciones después de 144 h a 28°C (alcanzar menos de 1000 g/L en la densidad del mosto sintético), se analizaron los principales productos de fermentación, así como la disminución de los sustratos, lo que se muestra a continuación en la Figura 3.16.



**Figura 3.16.** Análisis de los productos finales de fermentación alcohólica de las experiencias de co-inoculación en función de la concentración de SO<sub>2</sub> en el mosto sintético.

Los resultados mostrados en la Figura 3.16, muestran que la co-inoculación SR con SNR mantiene relativamente constante las concentraciones de los compuestos presentes en el mosto sintético fermentado y no depende de la concentración de SO<sub>2</sub> en dicho mosto.

Por otra parte, en las co-inoculaciones de SR y SNR con SB, los resultados cambian. En la co-inoculación de SR con SB, las variaciones más relevantes son las mostradas en el consumo de glucosa, pasando de aproximadamente 23 g/L de glucosa remanente en el medio al no adicionar SO<sub>2</sub>, a valores cercanos a 0 g/L de glucosa remanente cuando el medio contiene 160 g/L de SO<sub>2</sub>. Lo mismo ocurre con la co-inoculación de SNR con SB, donde la glucosa remanente en el medio es inversamente proporcional a la concentración de SO<sub>2</sub>, pasando de 12 g/L a 0 g/L entre 0 y 160 mg/L de SO<sub>2</sub>, respectivamente. Al respecto,

Morgan et al. (2019), al estudiar el efecto sensorial sobre los vinos resultantes del tratamiento con SO<sub>2</sub> en el pie de cuba, observaron que los vinos sin sulfitación no completaban el proceso de fermentación alcohólica, resultando ser más dulces, coincidiendo con los resultados del presente estudio, pudiendo ser un foco de estudio para futuras investigaciones.

En cuanto a los ácidos orgánicos, la variación más significativa se da en el caso del contenido de ácido cítrico, el que también presenta una tendencia inversamente proporcional a la concentración de SO<sub>2</sub> en el mosto sintético. Cabe destacar que estos resultados se presentan como una proyección del estudio de caracterización, permitiendo tener una noción de cómo incidiría la selección de distintas cepas autóctonas con mayor o menor tolerancia a SO<sub>2</sub> en una fermentación alcohólica, sin embargo, para validar dichos resultados es necesario generar la experiencia con replicas y evaluar la reproducibilidad y diferencias significativas entre variables estudiadas.

#### 4. Conclusiones

De acuerdo con lo planteado en el objetivo del estudio, la principal conclusión es que, al definir y agrupar los perfiles de PCR inter-delta de 115 de las colonias aisladas, se ha determinado que una concentración de 40 mg/L de SO<sub>2</sub> con 1% v/v de etanol en el pie de cuba (fermentación espontánea preliminar), aumenta la diversidad de cepas en el transcurso de la fermentación, pasando de 9 a 15 cepas a 28°C y de 10 a 16 cepas a 16°C, cuando se compara con las fermentaciones elaboradas con pie de cuba sin tratamiento alguno. Además, se evidencia que al final de fermentación la diversidad de *Saccharomyces* es mayor que al inicio en 3 de las 4 fermentaciones, siendo un fenómeno que debe ser estudiado en mayor profundidad debido a que solo existe un trabajo previo que muestra dicha tendencia en presencia de 40 mg/L de SO<sub>2</sub> aplicado en pie de cuba (Morgan et al., 2019).

Respecto a la tolerancia a SO<sub>2</sub> de 27 cepas testadas, se ha visto que aquellas que se encuentran en el pie de cuba o al inicio de las fermentaciones, poseen tiempos de latencia menores a los requeridos por cepas encontradas al final de la fermentación. Sin embargo, las que se encuentran al final de fermentación, en general poseen tiempos de latencia menores y mayor OD que las de inicio de fermentación a la mayor concentración de SO<sub>2</sub> probada (160 mg/L), indicando que son más tolerantes a SO<sub>2</sub>.

En cuanto a las pruebas de co-inoculación de dos cepas de *S. cerevisiae* entre sí o con la cepa de *S. bacillaris*, si bien no se puede extraer una conclusión robusta debido a que fue una prueba de concepto sin replicas, los resultados preliminares indican que las co-inoculaciones con *S. bacillaris* a bajas concentraciones de SO<sub>2</sub> tienen mejores cinéticas de población total y producen cambios en los principales metabolitos de fermentación.

## 5. Proyecciones de estudio

De acuerdo con lo estudiado en el presente trabajo, se han encontrado varias aristas que pueden ser abordadas en trabajos posteriores. A continuación, se mencionarán algunas de las temáticas a ser estudiadas o profundizadas.

- Profundizar la reproducibilidad del análisis PCR inter-delta. Estudiar el uso del protocolo de Blount et al. (2016), o solo el uso de Chelex 100 dentro del protocolo actual para mejorar la estabilidad del ADN extraído.
- Repetir las experiencias de fermentación en mosto sintético en triplicado para evaluar si son reproducibles los resultados. Esto permitirá extraer conclusiones más robustas. También llevar a cabo los controles de las fermentaciones de cada una de las cepas por separado para evaluar qué impacto tiene el que sean co-inoculadas a nivel de cinética y de productos finales.
- Evaluar las curvas de mortalidad de las cepas durante el período de fermentación (diferencia entre células totales y viables), lo que permitiría identificar cuándo se están produciendo aumentos en la mortalidad de cada cepa comparando fermentaciones simples y co-inoculadas. Esto se podría relacionar con el balance de consumo de sustratos y generación de productos de fermentación a diferentes tiempos de la fermentación. Finalmente se podría correlacionar mediante técnicas estadísticas los compuestos consumidos o producidos con el aumento o disminución de la tasa de mortalidad.
- Después de tener la línea base del punto anterior, se puede evaluar cómo se ve afectada la mortalidad al adicionar distintas cantidades de  $\text{SO}_2$  en el mosto sintético usando las mismas cepas estudiadas previamente.
- Otro potencial del presente estudio es poder generar colaboraciones con otros grupos y ejecutar un proyecto donde se puedan relacionar fermentaciones con distintos pretratamientos en el pie de cuba (concentración de  $\text{SO}_2$ , temperaturas y porcentajes de etanol), con las dinámicas de población en una fermentación alcohólica y su efecto sensorial en los vinos resultantes.

## Referencias

- Albergaria, H., Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: Role of physiological fitness and microbial interaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2035-2046, doi:10.1007/s00253-015-7255-0.
- Alessandria, V., Marengo, F., Englezos, V., Gerbi, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2015). Mycobiota of Barbera grapes from the piedmont region from a single vintage year. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 244–250.
- Annaluru, N. et al. (2014). Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, 344, 55-58.
- Angelo, J., Siebert, K.J. (1987). A New Medium for the Detection of Wild Yeast in Brewing Culture Yeast, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 45:4, 135-140, doi:10.1094/ASBCJ-45-0135
- Ayestaran, B.M., Ancin, M.C., García, A.M., González, A., Garrido, J.J., (1995). Influence of pre-fermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 476-482.
- Barnett, J.A. (2000). A History of research on yeast 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast*, 16, 755-771.
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M. (2004). Nitrogen catabolite repression in during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4, 625-632, doi:10.1016/j.femsyr.2003.12.004.
- Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., (2005). Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *OENO One*, 39, 191. doi:10.20870/oeno-one.2005.39.4.886.
- Blount, B.A., Driessen, M.R.M., Ellis, T. (2016). GC Preps: Fast and Easy Extraction of Stable Yeast Genomic DNA. *Nature, Scientific Reports*, 1-4, doi: 10.1038/srep26863
- Bisson, L.F., (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 107-119, doi:10.1533/9781845698133.5.280.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiology Research*, 181, 75-83, doi:10.1016/j.micres.2015.10.005.
- Cavazza, A., Grando, M.S., Zini, C. (1992). Rilevazione della flora microbica dimostie vini. *Vignevini*, 9, 17-20.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeast in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123-133, doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- Clavijo, A., Calderon, I.L., Paneque, P., (2011). Yeast assessment during alcoholic fermentation inoculated with a natural “*ped de cuve*” or a commercial yeast strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1569-1577. doi.org/10.1007/s11274-010-0609-y.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Giacosa, S., Ortiz-Julien, A., et al. (2018). Volatile profiles and chromatic characteristics of red wine produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 109, 298-309, doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.027.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., 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.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Fleet, G.H. (2008). Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Research*, 8, 979–995.
- Fleet, G.H., Heard, G.M. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.M. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur., Switzerland, pp. 27 – 54
- Giacosa, S., Río Segade, S., Cagnasso, E., Caudana, A., Rolle, L., & Gerbi, V. (2019). SO<sub>2</sub> in wines: Rational use and possible alternatives. In *Red wine technology* (pp. 309–321). doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00021-9.
- Ingledeew, M., Kunkee, R.E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 65-76.

- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215-237, doi:10.1111/1567-1364.12111.
- Kitamura, K., Yamamoto, Y. (1972). Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1, 403-406.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.M. (1998). *The yeasts, a taxonomic study* (4<sup>th</sup> ed). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production with Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 81-163.
- Legras, J.L., Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255, doi:10.1016/S0378-1097(03)00205-2.
- Lemos Junior, W.J.F., Bovo, B., Nadai, C., Crosato, G., Carlot, M., Favaron, F., et al. (2016). Biocontrol ability and action mechanism of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) isolated from wine musts against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on grape and their effects on alcoholic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1249. doi:10.3389/fmicb.2016.01249.
- Li, E., Liu, C., Liu, Y. (2012). Evaluation of yeast diversity during wine fermentations with direct inoculation and pied de cuve method at an industrial scale. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 960-966. doi.org/10.4014/jmb.1111.11013.
- Liu, W., Ji, R., Aimaier, A., Sun, J., Pu, X., Shi, X., Cheng, W., Wang, B. (2023). Adjustment of impact phenolic compounds, antioxidant activity and aroma profile in Cabernet Sauvignon wine by mixed fermentation of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*. 18, 100685. doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100685
- Lleixà, J., Martínez-Safont, M., Masneuf-Pomarede, I., Magani, M., Albertin, W., Mas, A., Portillo, M.C. (2021). Genetic and phenotypic diversity of *Brettanomyces bruxellensis* isolates from ageing wines. *Food Bioscience*, 40, 100900, doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100900.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2013). Electrochemical oxidation of wine polyphenols in the presence of sulfur dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5573-5581. doi.org/10.1021/jf400282z.
- Mas, A., Padilla, B., Esteve-Zaroso, B., Beltrán, G. (2016). Taking advantage of natural biodiversity for wine making. *The WILDWINE Project. Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 4-9. doi:10.1016/j.aaspro.2016.02.002.
- McArdle, J. V., & Hoffmann, M. R. (1983). Kinetics and mechanism of the oxidation of aequated sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH. *Journal of Physical Chemistry*, 87, 5425-5429. doi.org/10.1021/j150644a024.
- Morgan, S.C., McCarthy, G.C., Watters, B.S., Tantikachornkiat, M., Zigg, I., Cliff, M.A., Dural, D.M. (2019). Effect of sulfite addition and pied de cuve inoculation on the microbial communities and sensory profiles of Chardonnay wines: dominance of indigenous *Saccharomyces uvarum* at a commercial winery, *FEMS Yeast Research*, doi.org/10.1093/femsyr/foz049.
- Morrison-Whittle, P., Goddard, M.R. (2015). Quantifying the relative roles of selective and neutral process in defining eukaryotic microbial communities. *ISME Journal*, 9, 2003-2011, doi:10.1038/ismej.2015.18.
- Moschetti, G., Corona, O., Gaglio, R., Squadrito, M., Parrinello, A., Settanni, L., Barone, E., Francesca, N. (2016). Use of fortified pied de cuve as an innovative method to start spontaneous alcoholic fermentation for red winemaking: use of fortified pied de cuve in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22, 36-45. doi.org/10.1111/ajgw.12166.
- Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C., Michaelidis, C., Tassou, C., et al. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International*, 111, 498-508, doi:10.1016/j.foodres.2018.05.035.
- Padilla, B., García-Fernández, D., González, B., Izidoro, I., Esteve-Zaroso, B., Beltran, G. et al. (2016). Yeast biodiversity from DOQ Priorat uninoculated fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 930, doi:10.3389/fmicb.2016.00930.
- Pérez-Díaz, I.M., Johanningsmeier, S.D., Anekella, K., Pagan-Medina, C.G., et al. (2021). Genotypic and phenotypic diversity among *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from industrial scale cucumber fermentations. *Food Microbiology*, 94, 103652, doi.org/10.1016/j.fm.2020.103652.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2000). (Eds.), Cytology, Taxonomy, and Ecology of Grape and Wine Yeast, Handbook of Enology, vol. 1. John Wiley and Sons, West Sussex (England)., pp. 1-49, doi:10.1002/0470010363.ch1.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications, second ed. John Wiley & Sons, Ltd, France.
- Steel, C.C., Blackman, J.W., Schimdtke, L.M. (2013). Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5189-5206.
- Taylor, M.W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H.A., Goddard, M.R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental Microbiology*, 16, 2848-2858, doi:10.1111/1462-2920.12456.
- Valente, P., Gouveia, F.C., Lemos, G.A., Pimentel, D., van Elsas, J.D., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N. (1996). PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures, *FEMS Microbiology Letters*, 137, 253-256.
- Varela, C., Borneman, A.R. (2017). Yeasts of vineyards and wineries. *Yeast*, 34, 111-128, doi:10.1002/yea.3219.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-513.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., & Mas, A. (2014). Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 1-9.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Cocolin, L., Mas, A., Rantsiou, A. (2015). Viable and culturable populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) during Barbera must fermentation. *Food Research International*, 78, 195-200.
- Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1156, doi: 10.3389/fmicb.2015.01156.
- Zara, G., Nardi, T. (2021). Yeast Metabolism and Its Exploitation in Emerging Winemaking Trends: From Sulfite Tolerance to Sulfite Reduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7754. doi.org/10.3390/ijms22147754

## Anexos

**Anexo 1:** Composición del medio YPD líquido y sólido.

| <b>Compuesto</b>              | <b>YPD líquido (g/L)</b> | <b>YPD sólido (g/L)</b> |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Glucosa</b>                | 20                       | 20                      |
| <b>Extracto de levadura</b>   | 10                       | 10                      |
| <b>Peptona bacteriológica</b> | 20                       | 20                      |
| <b>Agar</b>                   | ---                      | 17                      |

**Anexo 2:** Composición de agar WLN en 1 L de medio preparado.

| <b>Compuesto</b>                 | <b>Cantidad en 1L de medio final (g)</b> |
|----------------------------------|--|
| Extracto de levadura             | 4  |
| Digestión pancreática de caseína | 5  |
| Dextrosa                         | 50                                       |
| Fosfato de potasio               | 0,55                                     |
| Cloruro de potasio               | 0,425                                    |
| Cloruro de calcio                | 0,125                                    |
| Sulfato de magnesio              | 0,125                                    |
| Cloruro férrico                  | 0,0025                                   |
| Sulfato de manganeso             | 0,0025                                   |
| Agar                             | 20                                       |
| Verde de bromocresol             | 0,022                                    |

### Anexo 3: Composición del mosto sintético y soluciones stock.

#### Composición del mosto

| Grupo de compuestos                               | Compuesto específico                 | Concentración |
|---|--------------------------------------|---------------|
| <b>Azúcares</b>                                   | Glucosa                              | 100 g/L       |
|   | Fructosa                             | 100 g/L       |
| <b>Ácidos</b>                                     | Ácido DL- málico                     | 5 g/L         |
|   | Ácido Cítrico                        | 0,5 g/L       |
|   | Ácido Tartárico                      | 3 g/L         |
| <b>Sales minerales</b>                            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,75 g/L      |
|   | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 0,5 g/L       |
|   | MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0,25 g/L      |
|   | CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,16 g/L      |
|   | NaCl                                 | 0,2 g/L       |
| <b>Sal de amonio</b>                              | NH <sub>4</sub> Cl                   | 0,46 g/L      |
| <b>Solución stock de factores de anaerobiosis</b> | Tabla 1.4                            | 1 mL/L        |
| <b>Solución stock de vitaminas</b>                | Tabla 1.5                            | 10 mL/L       |
| <b>Solución stock de aminoácidos</b>              | Tabla 1.6                            | 10 mL/L       |
| <b>Solución stock de oligoelementos</b>           | Tabla 1.7                            | 1 mL/L        |

#### Solución stock de factores de anaerobiosis (100 mL).

| Compuesto    | Cantidad               |
|--------------|------------------------|
| Ergosterol   | 1,5 g                  |
| Ácido oléico | 0,5 mL                 |
| Tween 80     | 50 mL                  |
| Etanol       | Hasta completar 100 mL |

\*Solución disuelta a 70 °C y se almacenada a 4°C.

#### Solución stock de vitaminas.

| Compuesto               | Concentración                            |
|-------------------------|--|
| Mio-inositol            | 2 g/L                                    |
| Pantotenato de calcio   | 0,15 g/L                                 |
| Hidrocloruro de tiamina | 0,025 g/L                                |
| Ácido nicotínico        | 0,2 g/L                                  |
| Piridoxina              | 0,025 g/L                                |
| Biotina                 | 3 mL (de solución concentrada a 100 g/L) |

\*Solución disuelta en agua destilada y esterilizada en filtro de 0,2 µm y almacenada a -20°C.

### Solución stock de aminoácidos.

| Compuesto             | Concentración (g/L)                         |
|-----------------------|---|
| Tirosina (Tyr)        | 1,95 (calentado a 100°C)                    |
| Triptófano (Trp)      | 17,42 (calentado a 70°C)                    |
| Isoleucina (Ile)      | 3,25 (calentado a 70°C)                     |
| Ácido aspártico (Asp) | 4,42 (desgasificación de CO <sub>2</sub> )  |
| Ácido glutámico (Glu) | 11,96 (desgasificación de CO <sub>2</sub> ) |
| Arginina (Arg)        | 36,79                                       |
| Leucina (Leu)         | 4,81 (calentado hasta disolver)             |
| Treonina (Thr)        | 7,54  |
| Glicina (Gly)         | 1,82  |
| Glutamina (Gln)       | 49,92                                       |
| Alanina (Ala)         | 14,56                                       |
| Valina (Val)          | 4,42  |
| Metionina (Met)       | 3,12  |
| Fenilalanina (Phe)    | 3,77  |
| Serina (Ser)          | 7,8   |
| Histidina (His)       | 3,38  |
| Lisina (Lys)          | 1,69  |
| Cisteína (Cys)        | 2,08  |
| Prolina (Pro)         | 59,93                                       |

\*Compuestos disueltos en una solución 20 g/L de NaHCO<sub>3</sub> y esterilizada en filtro de 0,2 µm para posteriormente ser almacenada a -20°C.

### Solución stock de oligo-elementos.

| Compuesto   | Concentración (g/L) |
|---|---------------------|
| MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O                             | 4                   |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                            | 4                   |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                            | 1                   |
| KI  | 1                   |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                            | 0,4                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                  | 1                   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> | 1                   |

\*Solución disuelta en agua destilada y esterilizada en filtro de 0,2 µm para posteriormente ser almacenada a 4°C.

#### Anexo 4: Cebadores y compuestos utilizados para la amplificación en PCR de regiones ITS

##### Cebadores

| Cebadores | Secuencia                  |
|-----------|----------------------------|
| ITS1      | 5'-TCCGTACGTGAACCTGCGG-3'  |
| ITS4      | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' |

##### Compuestos para la amplificación por PCR de regiones ITS

| Compuesto                                | Volumen ( $\mu\text{L}$ ) |
|--|---------------------------|
| Primer ITS1 (10 $\mu\text{M}$ )          | 1                         |
| Primer ITS4 (10 $\mu\text{M}$ )          | 1                         |
| dNTPs (10 $\mu\text{M}$ cada dNTP)       | 1                         |
| MgCl <sub>2</sub> (50 $\mu\text{M}$ )    | 3                         |
| Tampón 10x sin Mg <sup>+2</sup>          | 5                         |
| Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0,5                       |
| Muestra ADN extraído de colonia          | 1                         |
| Agua Milli-Q esterilizada                | 37,5                      |
| Volumen total                            | 50                        |

**Anexo 5:** Cebadores y compuestos usados para la amplificación por PCR de elementos inter-delta.

**Cebadores**

| <b>Cebadores</b> | <b>Secuencia</b>           |
|------------------|----------------------------|
| <b>Delta12</b>   | 5P-TCAACAATGGAATCCCAAC-3P  |
| <b>Delta21</b>   | 5P-CATCTTAACACCGTATATGA-3P |

**Compuestos usados para la amplificación de elementos inter-delta por PCR**

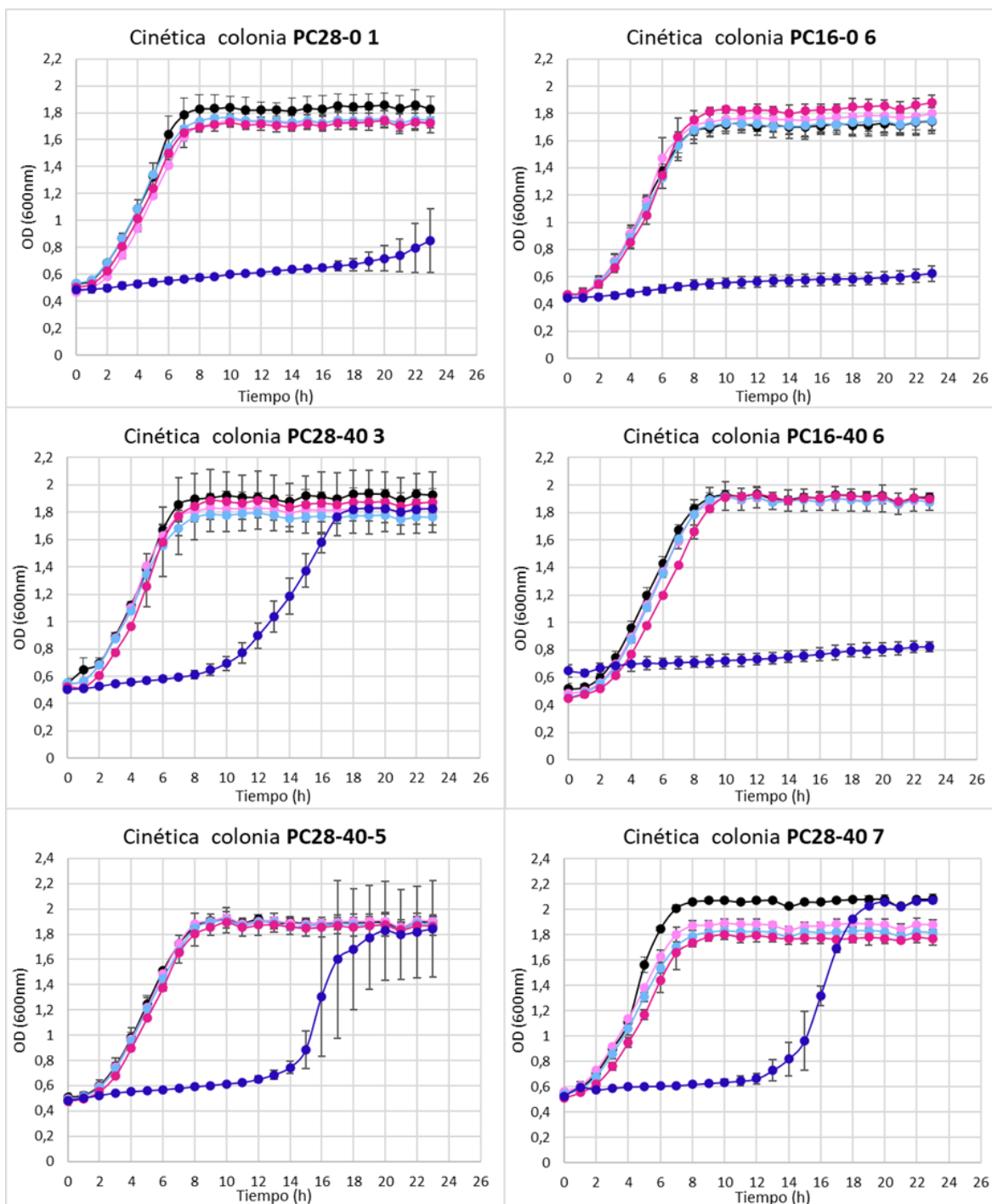
| <b>Compuesto</b>   | <b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|--|---|
| <b>Delta12 (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>             | 2,5                                       |
| <b>Delta21 (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>             | 2,5                                       |
| <b>dNTPs (10 <math>\mu\text{M}</math> cada dNTP)</b>     | 0,5                                       |
| <b>MgCl<sub>2</sub> (50 <math>\mu\text{M}</math>)</b>    | 1,25                                      |
| <b>Tampón 10x Mg<sup>+2</sup></b>                        | 2,5                                       |
| <b>Taq ADN polimerasa (5 U/<math>\mu\text{L}</math>)</b> | 0,1                                       |
| <b>Muestra ADN extraído de colonia</b>                   | 2   |
| <b>Agua Milli-Q esterilizada</b>                         | 14,65                                     |
| <b>Volumen total</b>                                     | 26  |

**Anexo 6:** Protocolo de tratamiento de muestras para PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa para la visualización de fragmentos inter-delta

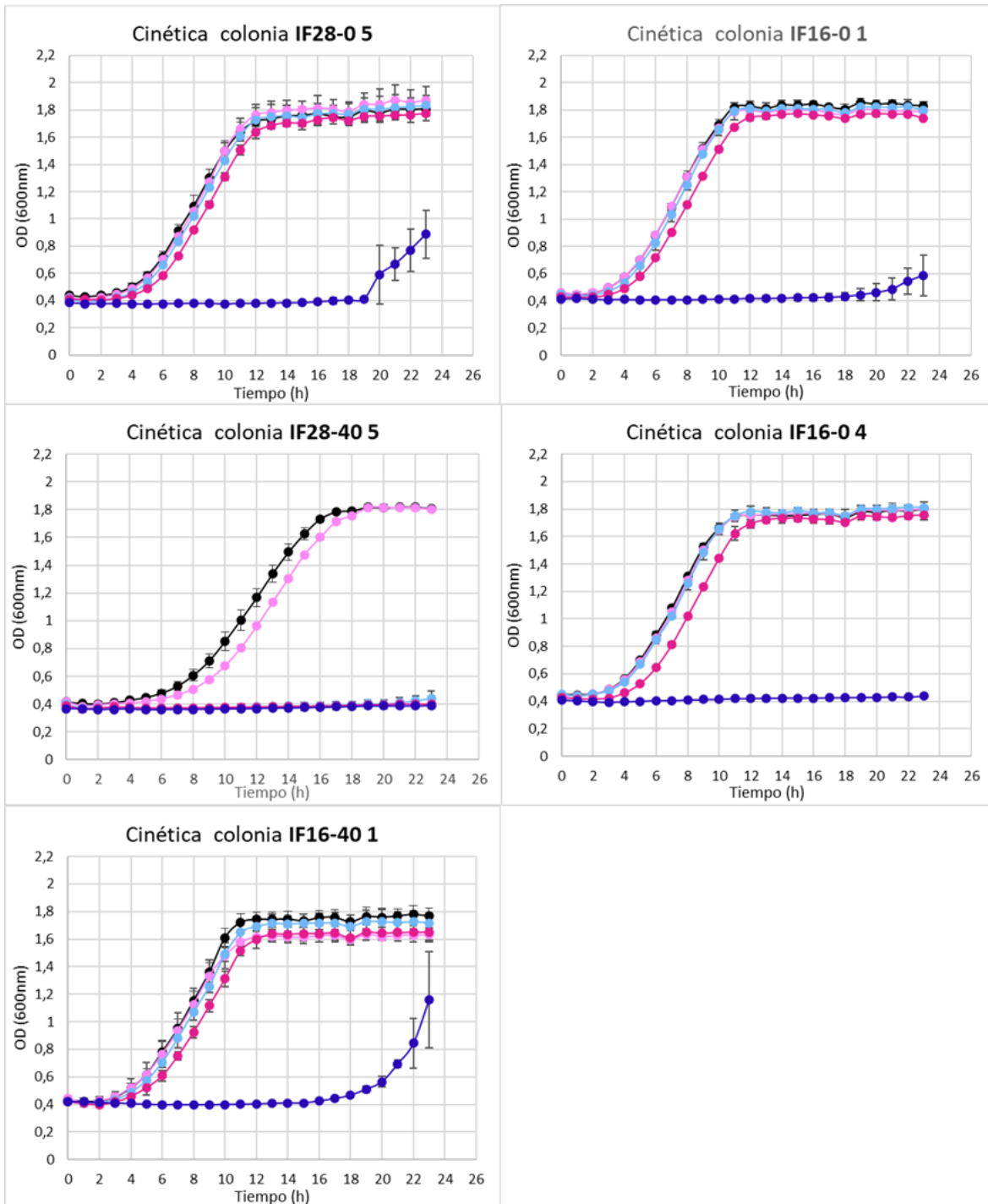
- Tomar muestra de colonias sembradas en placas con YPD sólido y llevadas a estufa a 28°C durante 2 días. La cantidad de muestra es lo que quede en el muestreador (palillo de madera estéril) luego de pasar por la colonia de lado a lado.
- Disponer dicha muestra de la colonia en 1 mL de agua destilada estéril.
- Agitar en vortex para homogenización.
- Centrifugar durante 2 min a 10.000 rpm
- Descartar sobrenadante y suspender el pellet en 700 µL de agua destilada estéril. Llevar a vortex para homogenización.
- Trasladar el volumen total a un vial con 1 g de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. El vial con bolitas de vidrio han sido previamente autoclavados a 121 °C durante 20 min.
- Llevar a equipo mini-bead beater para rompimiento mecánico de las muestras. Tres ciclos de 1 min de proceso en el equipo y 1 min en baño de hielo para evitar sobrecalentamiento.
- Llevar las muestras a centrifugación por 1 min a 10.000 rpm.
- Tomar el sobrenadante (aproximadamente 400 µL) y almacenarlo en eppendorf estéril para tener muestra de ADN para PCR. Conservar a -20 °C hasta su uso.
- Llevar a cabo el PCR considerando 2 µL de la muestra de ADN extraído.
- Luego de tener los fragmentos amplificados por PCR inter-delta, mezclar 22 µL del producto de PCR con 2 µL de tampón de carga.
- Cargar 14 µL de la muestra anterior en cada pocillo de los geles de agarosa al 1,5% p/v.
- Utilizar el equipo APELEX ST305 para llevar a cabo la electroforesis a 100 v.

**Anexo 7:** Cinéticas de crecimiento a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub>, de 27 cepas seleccionadas. Sulfito a 0 mg/L ●, 20 mg/L ○, 40 mg/L ◐, 80 mg/L ◑ y 160 mg/L ◒.

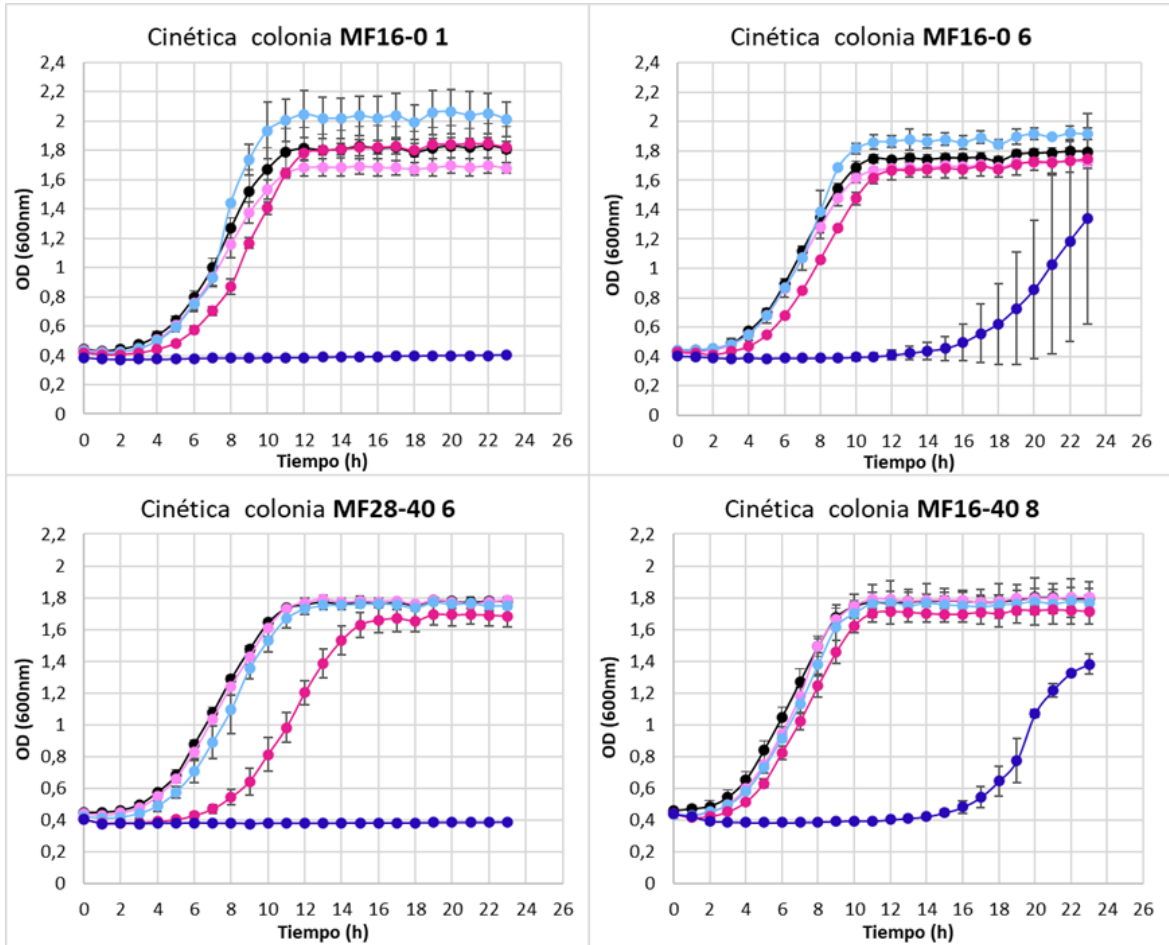
**Cepas de pie de cuba**



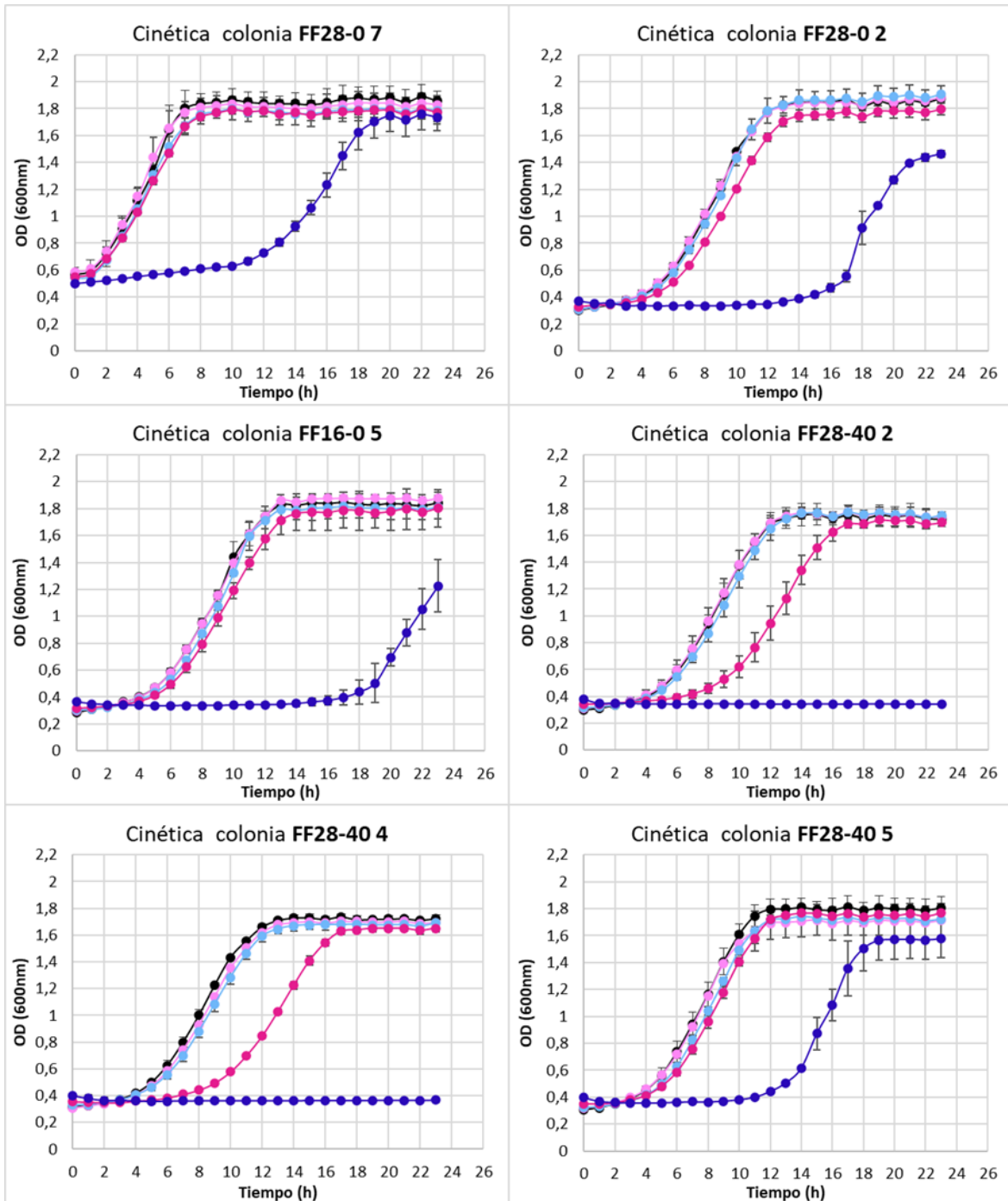
## Cepas de inicio de fermentación

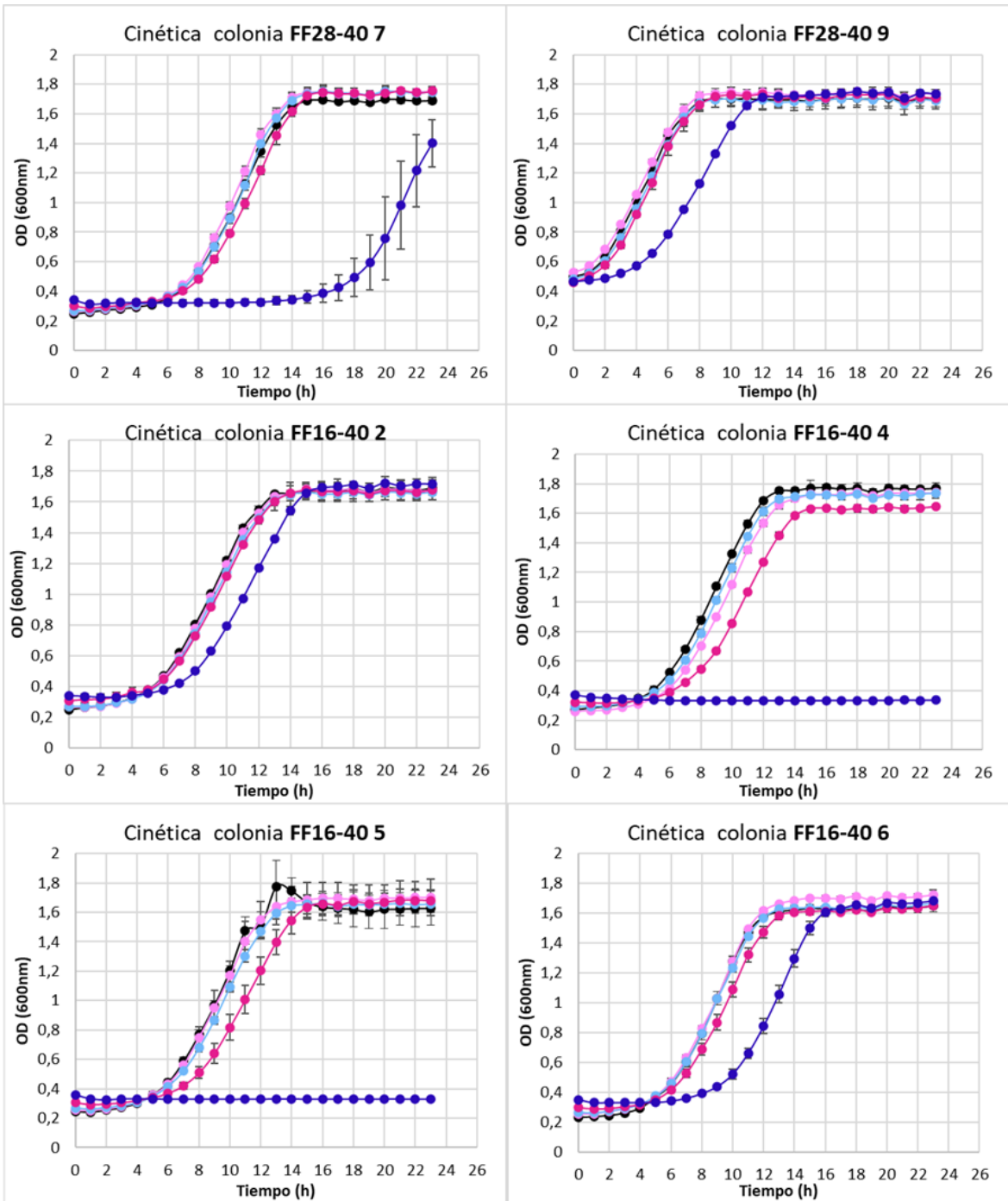


## Cepas de mitad de fermentación



## Cepas de final de fermentación





**Anexo 8.** Cinética de crecimiento de *S. bacillaris* en medio YPD a distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> a 28°C.

