



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE
LEVADURAS CON INTERÉS
ENOLÓGICO

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A

CYNTHIA TERESA LEYVA ARGÜELLES



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Alejandro Camacho Cruz
VOCAL: Profesora: Martha Giles Gómez
SECRETARIO: Profesor: Hugo Antonio Hernández Pérez
1er. SUPLENTE: Profesora: Beatriz Ruiz Villafán
2° SUPLENTE: Profesora: Aleida Mina Cetina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

SUSTENTANTE:

Cynthia Teresa Leyva Argüelles

*Dedicado a todas aquellas personas que contribuyeron a la
realización de este trabajo.*

*GRACIAS porque todos son pieza fundamental para construir
este gran sueño.*

AGRADECIMIENTOS

Si tuviera que escribir el nombre de todas las personas que a lo largo de mi vida y mi carrera me ayudaron, apoyaron y pusieron su granito de arena para que yo alcanzara mis metas, no terminaría de hacerlo. Sin embargo, es justo hacer algunas menciones especiales.

A mis padres Eugenio Leyva y Teresa Argüelles por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida. Por su amor, por ser mi guía y ejemplo a seguir. Porque sin ustedes simplemente no habría llegado hasta aquí, muchas gracias. Los amo.

A mi hermano Edwin por cuidarme, por estar conmigo, por hacerme reír. Por todo lo que hemos vivido juntos. Te quiero mucho ¡Eres lo máximo!

A mi abuelita Antonia Flores y a mi tía Hortensia Leyva por su gran apoyo y cariño.

A Hugo Valdés por su amor incondicional, por apoyarme y ayudarme en todo momento, por tenderme la mano en cada caída y alentarme a seguir siempre adelante. Te amo.

A mis amigos de la Facultad Brenda, Oli, Edgar, Ame, Era, Vi y Mayito. Gracias por todos los momentos de estudio y estrés, definitivamente terminé la carrera gracias al maratón de preguntas. Pero gracias mil veces más por todos los momentos de diversión, risas y hasta lágrimas que hemos compartido.

A mis amigas de la prepa Karely, Cuchus, Marita, Minerva y Dianita porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos siendo las mejores amigas. Las quiero niñas.

A la Biól. Cony León por toda su ayuda y sobre todo por su sincera y valiosa amistad.

Al Dr. Hugo Hernández por la confianza depositada en mí y por convertirse en un gran amigo.

A la Dra. Liliana González Osnaya por sus consejos y gran ayuda.

A todos los profesores que me impartieron clase a lo largo de la carrera. Gracias por todas sus enseñanzas y consejos.

Al H. jurado revisor de este trabajo por su tiempo, observaciones y sugerencias.

A la UNAM y a la Facultad de Química, que se convirtieron en mi segundo hogar y han sido pilar de mi crecimiento humano y profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	4

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 El vino	5
2.2 El proceso de vinificación	7
2.3 Las levaduras vínicas	17

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3. Metodología	24
----------------	----

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Métodos tradicionales de identificación	25
4.1.1 Aislamiento de las levaduras	25
4.1.2 Observación morfológica	26
4.1.3 Pruebas fisiológicas	29
Fermentación de carbohidratos	29
Crecimiento con una sola fuente de carbono	30
Crecimiento con una sola fuente de nitrógeno	31
Requerimientos vitamínicos	32
Crecimiento en condiciones de estrés osmótico	33
Tolerancia a 1% de ácido acético	34
Tolerancia a etanol	34
4.1.4 Pruebas bioquímicas	35

Escisión de arbutina	35
Producción de ácido a partir de glucosa	36
4.1.5 Sistemas automatizados	37
Sistema API	38
Vitek	39
RapID Yeast Plus System	40
AUXACOLOR	42
4.2 Métodos moleculares de identificación	43
Reacción en cadena de la polimerasa:	46
PCR (Polymerase Chain Reaction)	
4.2.1 Métodos dependientes de cultivo (Métodos indirectos)	51
Reacción Cuantitativa en Cadena de la Polimerasa:	51
QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)	
Restricción de fragmentos polimórficos:	56
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	
Amplificación de fragmentos polimórficos:	63
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	
DNA polimórfico aleatoriamente amplificado:	68
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	
Electroforesis de campo pulsado:	72
PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	
4.2.2 Métodos independientes de cultivo (Métodos directos)	77
Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante:	77
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	
Fluorescencia de Hibridación <i>in situ</i> :	83
FISH (Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization)	
4.3 Factores que afectan el desempeño de los métodos moleculares	86
4.4 Estandarización de los métodos	88

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Discusión	89
-----------	----

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Conclusiones	94
--------------	----

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	96
--------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema del proceso de elaboración de los vinos tintos y blancos	7
Figura 2.2	Secuencia de reacciones de la fermentación alcohólica	15
Figura 2.3	Reproducción asexual por gemación de una levadura	18
Figura 2.4	Pseudomicelio	19
Figura 4.1	Levaduras vistas al microscopio óptico	28
Figura 4.2	Sistema API 20C AUX	38
Figura 4.3	Sistema API ID 32	39
Figura 4.4	Kit comercial RapID Yeast Plus System	41
Figura 4.5	Panel de reacciones de RapID Yeast Plus System	41
Figura 4.6	Kit comercial AUXACOLOR	42
Figura 4.7	Galería AUXACOLOR	42
Figura 4.8	Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa	48
Figura 4.9	Crecimiento exponencial de las copias de DNA en la PCR	49
Figuras 4.10	Gráfica del crecimiento exponencial de las copias de DNA en la PCR	49
Figura 4.11	Diagrama de los tipos de sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real	52
Figura 4.12	Representación esquemática de la organización de los genes ribosomales	57
Figura 4.13	Fundamento teórico de la técnica de RFLP	58
Figura 4.14	Representación esquemática de la técnica de AFLP	64
Figura 4.15	Diagramas de los equipos comúnmente utilizados para la electroforesis en campo pulsado.	74
Figura 4.16	Representación esquemática del fundamento teórico de DGGE	78
Figura 4.17	Perfiles de migración de diferentes levaduras aisladas de fermentaciones de vino	79
Figura 4.18	Representación esquemática de la metodología de FISH	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Parámetros de madurez recomendados para las uvas destinadas a la elaboración de vinos	8
Tabla 2.2	Efectos del estrujado y del despalillado	10
Tabla 2.3	Comparación de los diferentes productos de sulfitado	12
Tabla 2.4	Algunas especies de levaduras vínicas reportadas en uvas, mosto y vino	21
Tabla 4.1	Guía para identificar los géneros de las levaduras vínicas mediante observación morfológica.	27
Tabla 4.2	Cuantificación de levaduras presentes en vino mediante QPCR	54
Tabla 4.3	Identificación de levaduras presentes en vino mediante RFLP	62
Tabla 4.4	Secuencias de EcoRI y MseI	65
Tabla 4.5	Identificación de levaduras presentes en vino mediante AFLP	67
Tabla 4.6	Identificación de levaduras presentes en vino mediante RAPD	71
Tabla 4.7	Identificación de levaduras presentes en vino mediante PFGE	76
Tabla 4.8	Identificación de levaduras presentes en vino mediante DGGE	82
Tabla 4.9	Identificación de levaduras presentes en vino mediante FISH	85

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a_w	Actividad de agua
°Brix	Grados Brix
°C	Grados Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
CaCO ₃	Carbonato de calcio
DNA (siglas en inglés)	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
<i>et al.</i>	“Y otros”
ETS (siglas en inglés)	Espaciador externo transcrito
g	Gramo
GC	Guanina Citosina
GYC	Medio glucosa-extracto de levadura-carbonato de calcio
ITS (siglas en inglés)	Espaciador interno transcrito
kb	Kilo pares de bases
L	Litro
M	Molar
Mb	Mega pares de bases
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
NTS (siglas en inglés)	Espaciadores intergénicos
pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
RNA (siglas en inglés)	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
SO ₂	Dióxido de azufre
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
p/v	Relación peso volumen
p/p	Relación peso peso
YNB (siglas en inglés)	Medio nitrógeno base para levaduras
YPD(siglas en inglés)	Medio extracto de levadura-peptona-glucosa-agar
µg	Microgramo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista (Tortora *et al.*, 2009).

Los microorganismos son un grupo amplio y diverso que existe como células aisladas o asociadas. A diferencia de las células superiores, la mayoría de los microorganismos son capaces de realizar sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células, sean de la misma clase o de otra diferente (Madigan *et al.*, 2012).

En los alimentos, los microorganismos pueden jugar roles positivos o negativos; es por eso que los microbiólogos trabajan para diseñar métodos mediante los cuales el efecto benéfico de estos organismos pueda ser aumentado y el perjudicial reducido (Madigan *et al.*, 2012; Ivey y Phister, 2011).

Por ejemplo, el deterioro de los alimentos ocasiona anualmente pérdidas económicas inmensas; las enfermedades transmitidas por alimentos, como la salmonelosis, la yersiniosis o las intoxicaciones causadas por *Escherichia coli*, también son dignas de mención; los alimentos aptos para consumo humano deben estar adecuadamente preparados y controlados para evitar la transmisión de enfermedades, ya que éstos sirven también para sustentar el crecimiento de muchos microorganismos (Beutin *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2007; Malorny *et al.*, 2007; Lambertz *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen microorganismos que no tienen efectos indeseables sobre los alimentos o sobre los consumidores, por ejemplo, el uso de



microorganismos para la producción de bebidas fermentadas, como el vino, ya era conocida desde hace cientos de años. En este tipo de fermentaciones está involucrada una compleja microbiota en la que tanto levaduras como bacterias están presentes en poblaciones mixtas o suceden una a la otra (Lee, 2000; Jensen *et al.*, 2009).

Las levaduras juegan un papel muy importante durante la fermentación; ya que éstas son las responsables de la transformación de los azúcares para la obtención de etanol, dióxido de carbono y algunos metabolitos secundarios que confieren las características sensoriales particulares de esta bebida (Fleet, 2008; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Dada la difícil tarea que es discernir entre las numerosas cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y entre la gran cantidad de levaduras de otras especies presentes tanto en el mosto como en el vino, que conducen la fermentación y le otorgan al vino sus características deseadas, la identificación de las levaduras presentes en cada etapa toma especial importancia (Loureiro, 2000; Schuller *et al.*, 2004).

Tradicionalmente la identificación de éstas se hace con base en sus características morfológicas y fisiológicas, estas técnicas son aún muy utilizadas, y son el resultado de pruebas de fermentación y asimilación de diversos compuestos de carbono y de nitrógeno, además de la tolerancia a temperatura, pH y altas concentraciones de carbohidratos. Así mismo, se han desarrollado técnicas moleculares de identificación basadas en las similitudes o diferencias del DNA, RNA o de las proteínas, que han sido igualmente adoptadas (Senses-Ergul *et al.*, 2006; Kagkli *et al.*, 2011; Tofalo *et al.*, 2012).

El analista está obligado a elegir entre las diferentes metodologías existentes y tomar la decisión más acertada, dependiendo del tipo de muestra, los recursos -tanto humanos como materiales- que se tengan, el tiempo, el espacio y



las posibilidades económicas con las que cuenta. Estas decisiones deben ajustarse a los requisitos de los contratos con proveedores y clientes, además a la legislación del gobierno. Es por esto que se requiere tener más información sobre la estandarización de los métodos, su precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad de detección (Beh *et al.*, 2006).

Aunque los criterios arriba mencionados han guiado la selección de los métodos tradicionales, éstos no han sido aún aplicados para la elección de los métodos moleculares.

Debido a todo lo anterior y a la gran importancia que tienen las levaduras en la industria enológica, es necesario contar con técnicas de identificación rápidas, de bajo costo y confiables, es por ello que la presente revisión documental analizará los métodos de identificación tradicionales y moleculares más importantes que se han desarrollado para determinar las ventajas y desventajas que éstos ofrecen.



1.2 Objetivos

Objetivo general

Describir, analizar y comparar los métodos de identificación tradicional y molecular más importantes que se han desarrollado, para determinar las ventajas y desventajas que éstos ofrecen, mediante la revisión de bibliografía científica especializada relevante.

Objetivos particulares

Recopilar los resultados de investigaciones recientes sobre los métodos tradicionales y moleculares de identificación de levaduras.

Revisar la literatura publicada sobre la identificación de levaduras con interés enológico.

Comparar los métodos tradicionales y moleculares de identificación de levaduras.

2. ANTECEDENTES

2.1 El vino

La enología es la ciencia que estudia la composición, propiedades y elaboración del vino (Aleixandre, 1996).

El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, total o parcial, exclusivamente del azúcar de la uva tras los procesos de colecta, transporte, prensado y posterior reposo en recipientes adecuados. La fermentación del vino es causada por un desarrollo secuencial de levaduras y bacterias que crecen en el medio rico y natural del jugo de uva, produciendo enzimas que convierten el azúcar mediante una serie de reacciones bioquímicas en alcohol, dióxido de carbono y otros productos de la fermentación (NMX-V-012-1986; Flancy, 2003; Noguez, 2006).

Aun cuando los vinos se encuentren bajo la misma denominación general, factores como la variedad de la uva utilizada en su elaboración, la región de la que ésta provenga, las diferencias en el proceso de elaboración y fermentación, hacen que los vinos tengan características muy diferentes y existan distintas clases, por ejemplo:

Los vinos secos son vinos en los que han fermentado prácticamente todos los azúcares del jugo de uva o del mosto, el contenido de azúcar residual no sobrepasa los 5 gramos por litro. En los vinos semisecos el contenido de azúcar residual es de 15 a 30 gramos por litro (Flancy, 2003; García y López-Munguía, 2004).

Mientras que en los vinos dulces se deja parte del azúcar, más de 50 gramos de azúcar por litro. Esta dulzura es debida a que la fermentación se



interrumpió antes de que todo el azúcar se agotara al convertirse en etanol, o porque se añadió jugo de uva sin fermentar o, en vinos de menor calidad, azúcar en forma líquida (Aleixandre, 1996).

Por otra parte, el vino espumoso contiene una gran cantidad de dióxido de carbono, que surge de una segunda fermentación que realizan las levaduras una vez que el vino se encuentra ya embotellado; la levadura debe ser capaz de llevar a cabo esta fermentación en un medio desprovisto de algunos factores de crecimiento, bajo una alta presión, a una temperatura relativamente baja, de unos 10°C, y en la presencia de un 10-12% de alcohol, además de sedimentar de una forma rápida y completa. A lo largo de este proceso las botellas se colocan de manera invertida para que las levaduras sedimentadas se acumulen en el cuello de la botella, de donde se extraen después de congelarlas, este procedimiento se conoce como “degüello” (Varnam y Sutherland, 1994).

La producción del vino se inicia con la recolección de la uva. Las uvas se aplastan en una máquina y el jugo, llamado mosto, se extrae. Dependiendo de las uvas que se utilicen y de cómo se prepare el mosto, se producirá vino blanco, tinto o rosado (Madigan *et al.*, 2012).

El vino blanco se prepara a partir de uvas blancas o a partir del jugo de uvas negras a las que se les ha quitado la piel, que es la parte que contiene el compuesto colorante. En la fabricación del vino tinto, el orujo (piel, semillas y trozos del tallo) se deja durante la fermentación. Además de la diferencia de color, el vino tinto tiene un aroma más fuerte que el blanco, debido a que contiene una mayor concentración de taninos, los cuáles se separan de la piel de la uva durante el proceso de fermentación del mosto (Gil, 2009; Madigan *et al.*, 2012).

Para la elaboración de vinos rosados el contacto con la cáscara de la uva con el mosto tiene una duración muy corta de manera que ocurre una extracción limitada de las antocianinas, que son los compuestos que le dan el color



característico al vino tinto. También se elaboran vinos rosados con mezclas de uvas blancas y tintas o mezclando vinos tintos y blancos (Aleixandre, 1996; García y López-Munguía, 2004; Jackson, 2008).

2.1 El proceso de vinificación

La vinificación es el conjunto de tareas o actividades encaminadas a transformar la uva en vino, y conlleva los siguientes pasos (**Figura 2.1**) (Gil, 2009):

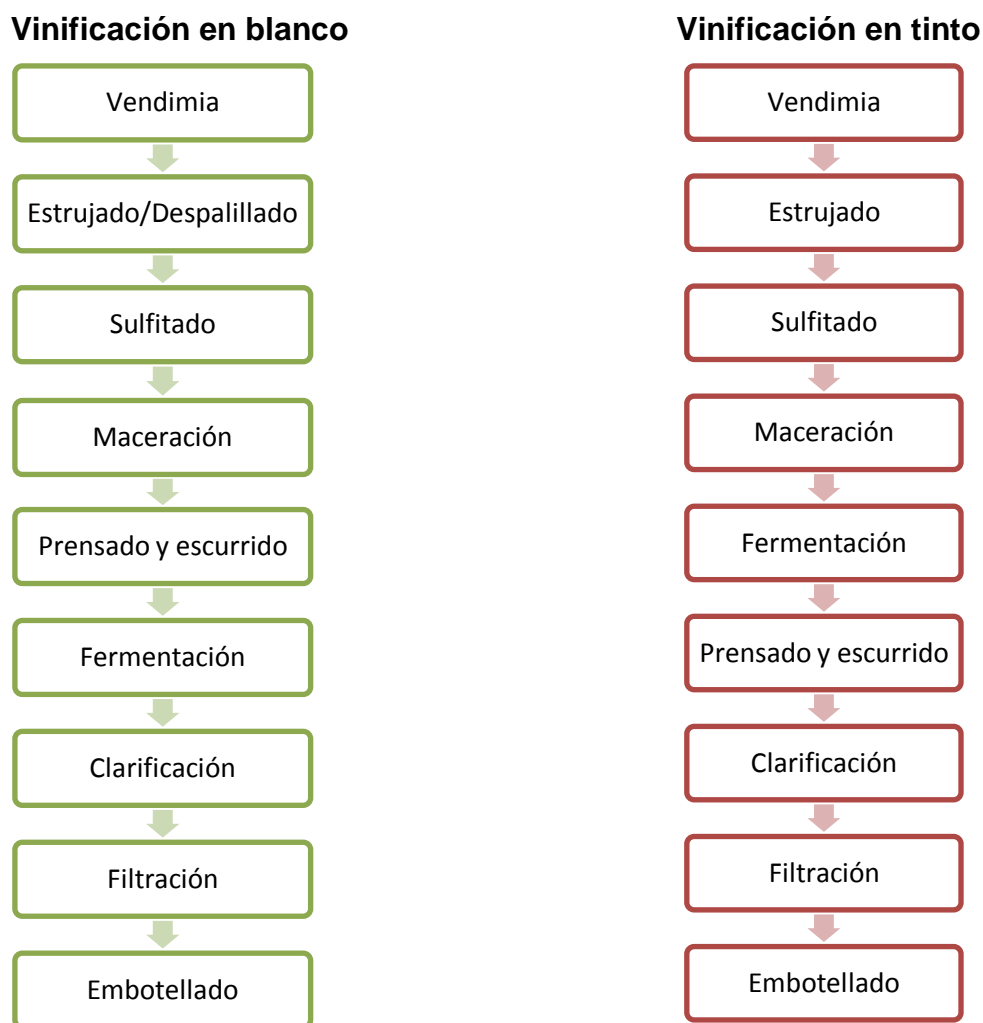


Figura 2.1 Esquema del proceso de elaboración de los vinos blancos y tintos.
Adaptado de Aleixandre, 1996 y Jackson, 2008.



1. La vendimia

La cosecha de la uva, llamada vendimia, se inicia a finales del verano o principios del otoño, que es cuando las uvas presentan una relación adecuada entre la concentración de azúcares (°Brix) y la acidez (pH), es decir, han alcanzado el grado de madurez deseado. La relación entre °Brix y acidez titulable es un criterio, tanto, de madurez como de calidad de la uva (**Tabla 2.1**) (Reyner *et al.*, 2002).

La uva contiene cantidades importantes de ácido tartárico, el cual le confiere la característica de acidez. Esta acidez total titulable expresada como ácido tartárico varía entre 0.3 y 1.5%, considerándose en general como un criterio de calidad un mínimo de 0.65% (García y López-Munguía, 2004).

Tabla 2.1 Parámetros de madurez recomendados para las uvas destinadas a la elaboración de vinos

Tipo de vino	°Brix	Acidez mínima	Relación °Brix/acidez
Blanco	19.5 - 23.0	0.7	27.9 – 33.0
Tinto	20.5 - 23.5	0.65	31.5 – 36.2
Dulce	22.0 – 25.0	0.65	33.8 – 38.5

Adaptado de García y López-Munguía, 2004.

Suele ocurrir que algunos viticultores, apremiados por llevar a las bodegas su cosecha, tienden a comenzar demasiado pronto la vendimia. Para la mayoría de las uvas, pero sobre todo en las tintas, unos pocos días de maduración complementaria permiten, mejorar su calidad debido a un mayor enriquecimiento en azúcares, una disminución de la acidez y una evolución favorable de los polifenoles; sin embargo, en el caso contrario, al retrasar la vendimia, se corre el riesgo de podredumbre de la fruta. (Reyner *et al.*, 2002).



2. Estrujado

Una vez pesada la uva y determinado su grado alcohólico en potencia, la primer operación que se lleva a cabo es enviarla a una máquina estrujadora, que puede incluir o no el proceso de despallado (**Tabla 2.2**). Estos procesos deben llevarse a cabo lo más pronto que sea posible después de la vendimia, con el fin de evitar la oxidación, la contaminación o la prematura fermentación de la fruta (Aleixandre, 1996; Jackson, 2008).

El estrujado consiste en aplastar o triturar la uva, de manera que se libere el jugo de la pulpa o mosto, que posteriormente será fermentado, pero de modo que no se rompan las semillas, ya que esto incrementaría considerablemente el nivel de taninos dando como consecuencia un producto muy astringente, además éstas contienen sustancias oleaginosas que podrían estropear el vino. Durante este paso se incorporan en el mosto las levaduras autóctonas presentes en la superficie de las uvas. Por otro lado, en el despallado se separa el orujo (piel, semillas y trozos del tallo) de las uvas antes de ser exprimidas (Varnam y Sutherland, 1994; Hernández, 2003; Jacques y Peynaud, 2003; García y López-Munguía, 2004).

El viticultor debe elegir el método de estrujado adecuado para la variedad de uva y el vino que desee conseguir. Por ejemplo, en el caso de vinos muy delicados, como el *Champagne*, se suprime o se lleva a cabo un estrujado muy suave, sin despedazar los hollejos. Para las vinificaciones en tinto, al estrujado debe realizarse con cuidado –para no destrozarse las fracciones sólidas de la uva- y muy completo para permitir una liberación total y rápida de los compuestos colorantes durante la maceración del mosto (Gil, 2009).

En caso de que el estrujado no se realice de una manera adecuada, existe una liberación muy lenta de los azúcares de la pulpa de la uva y con ello riesgos de alteración bacteriana en el vino (Jacques y Peynaud, 2003).



Tabla 2.2 Efectos del estrujado y del despallado

Efecto	Ventajas	Inconvenientes
ESTRUJADO		
Estallido de las bayas	Incorporación al mosto de levaduras autóctonas	Riesgo de contaminaciones microbianas indeseables
	Fermentación más completa	Fermentación demasiado rápida
	Bombeo más fácil del mosto	
Aireación	Maceración más eficaz	Oxidación de polifenoles y aromas
	Homogeneización de la vendimia	Formación de compuestos indeseables
	Desarrollo de levaduras	
DESPALILLADO		
Eliminación de raspones	Reducción del volumen necesario de tanques de fermentación	Prensado más difícil
	Reducción de la masa a prensar	
	Reducción de los caracteres herbáceos	
	Taninos totales más escasos	

Adaptado de Jacques y Peynaud, 2003.

3. Sulfitado

Posterior al proceso de estrujado, la adición de dióxido de azufre (SO₂) es una práctica habitual para inhibir el crecimiento de levaduras indeseables en la fermentación y de bacterias alteradoras, aunque el SO₂ es eficaz para esta aplicación existe una cierta preocupación acerca de su seguridad debido a que



existen personas sensibles que presentan reacciones alérgicas a este compuesto. En México el límite máximo es de 300 mg/L y se debe reportar en la etiqueta con la leyenda “contiene sulfitos” (NMX-V-012-1986; Varnam y Sutherland, 1994).

El SO₂ es el antiséptico más importante que existe hoy en enología y se agrega para (Suárez e Íñigo, 2004):

- Inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y facilitar la acción de las levaduras.
- Impedir la acción de enzimas oxidasas sobre los taninos y colorantes.
- Retardar el inicio de la fermentación para favorecer la separación del hollejo en la elaboración de vinos blancos.
- Obtener vinos con mayor grado alcohólico y menos contenido de azúcar residual.
- Dar sabor y olor más agradables debido a su poder antioxidante.

Sin embargo el empleo de dosis exageradas puede presentar inconvenientes como:

- Enmascarar el aroma y bouquet de los vinos, dándoles un olor picante e irritante.
- Retrasar o inhibir completamente la fermentación.
- Aparición de ácido sulfhídrico y mercaptanos en los vinos jóvenes.
- Daños en la salud del consumidor y rompimiento de normas.

Existen diferentes técnicas para el sulfitado, en la tabla 2.3 se muestran algunas de las más comunes, así como las ventajas y desventajas más destacadas de cada una.



Tabla 2.3 Comparación de los diferentes productos de sulfitado

Producto	Forma comercial	Ventajas	Desventajas
Azufre	Polvo, pastillas	Puro Tradicional Buena mezcla	Poco preciso Empleo desagradable y peligroso
SO₂ líquido	Gas licuado	Preciso con dosificador adecuado Muy puro	Riesgo de sobredosis Peligroso
Soluciones acuosas de SO₂	Solución a preparar	Producto puro Fácil de dosificar	Preparación desagradable
Soluciones potásicas de SO₂	Soluciones comerciales de 10 a 23% de SO ₂ libre	Sin necesidad de preparar	Mezcla difícil (densidad elevada) Soluciones concentradas inestables
Soluciones de bisulfito de amonio	Solución comercial a 40% SO ₂	Soluciones muy concentradas Estable Aporta nitrógeno amoniacal	Mezcla difícil (densidad elevada) Reservada a mostos
Matabisulfito de potasio	Polvo higroscópico	Buena mezcla en pequeños volúmenes	Poco preciso Caro Conservación difícil

Adaptado de Jacques y Peynaud, 2003.

4. Escurrido y prensado

Una vez realizado el estrujado, se pasa a un proceso de escurrido para la obtención del mosto que posteriormente se fermentará. Esta operación se realiza en máquinas escurridoras provistas de prensas con el fin de separar totalmente el mosto de la vendimia (Aleixandre, 1996; Jackson, 2008).

La presión que hay que ejercer sobre el fruto depende de factores tales como la variedad, el grado de madurez, sus dimensiones, la piel, presencia o ausencia de partes leñosas, etcétera. Esta rotura selectiva se traduce en el



prensado por una composición variable de los mostos liberados. Cuando se trata de uva que ha sido despalillada, estrujada y escurrida previamente el fruto está ya dividido y roto, lo que hace que la mayoría del mosto no tenga que llegar a la prensa. Cuando el prensado se hace en presencia de partes leñosas y las semillas hay que tener cuidado para no dañarlas ya que transmitirán sustancias de sabor desagradable al mosto (Flancy, 2003; Hernández, 2003; García y López-Munguía, 2004; Jackson, 2008).

5. Fermentación

Anteriormente la fermentación del mosto solía desencadenarse de forma natural y espontánea a partir de las propias levaduras presentes en las uvas, a este tipo de fermentación se le denomina fermentación espontánea, sin embargo, en ésta se obtiene una baja reproducibilidad de las características finales del vino, con lo que baja su calidad. Es por esto que en muchas bodegas se destruyen estas levaduras silvestres, como se mencionó antes, añadiendo dióxido de azufre en una proporción de aproximadamente 100 ppm (Flancy, 2003; Hernández, 2003; Noguez, 2006).

La calidad en un vino es entendida como el cumplimiento a las normas que exigen el mercado y los diferentes países en los que se produce y distribuye. Este cumplimiento de las normas ha derivado en una mayor apertura a las innovaciones tecnológicas.

Principalmente las condiciones técnicas de la fermentación, como la adición de levaduras seleccionadas, se han ido mejorando para facilitar el crecimiento de las levaduras e impedirlo a otros huéspedes indeseables que pueden estropear el producto (Noguez, 2006).



El éxito en la adición de la levadura depende de la cepa utilizada (características genéticas, pureza de la cepa, acondicionamiento), de las técnicas de preparación y de reactivación, del control de las condiciones que aseguran la buena marcha de la fermentación (higiene, temperatura, aporte de oxígeno y de nitrógeno, contaminación, etcétera) (Flanzy, 2003).

La adición de levaduras específicas permite controlar el arranque de la fermentación alcohólica y darle a esta una orientación particular, de esta forma se reduce el periodo de latencia, que es el periodo durante el cual la microbiota autóctona puede dar lugar a la aparición de malos gustos y acidez en el vino. Las cualidades que se desean en una cepa de levadura destinada a esta función son : Desarrollo rápido, buena actividad de fermentación, es decir, que produzca fermentaciones vigorosas, reproducibles y con baja concentración de azúcar residual, buen rendimiento azúcar-alcohol, débil producción de acidez, que posea una buena tolerancia al etanol, a la temperatura y al anhídrido sulfuroso, que produzca un buen perfil aromático exento de aromas no deseados y, sobre todo en la elaboración de vinos espumosos, que flocule y sedimente espontáneamente para que sea fácil de eliminar una vez acabada su función (Mesas y Alegre, 1999; Flancy, 2003; López *et al.*, 2003; Noguez, 2006).

Como se mencionó, en la fermentación del vino está involucrada una compleja microbiota en la que tanto bacterias como levaduras están presentes en poblaciones mixtas o suceden una a la otra. En concreto las levaduras juegan un papel muy importante, ya que en condiciones de anaerobiosis las levaduras realizan la fermentación alcohólica, es decir, degradan los azúcares mediante una secuencia de reacciones enzimáticas para la obtención de etanol, dióxido de carbono (**Figura 2.2**) y algunos metabolitos secundarios que confieren las características sensoriales particulares de esta bebida (Fleet, 2008).

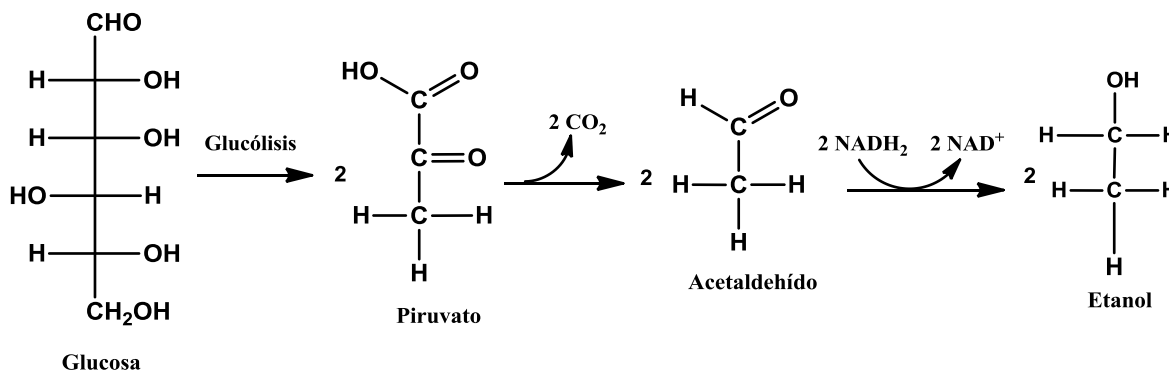


Figura 2.2 Secuencia de reacciones de la fermentación alcohólica
Adaptado de Mesas y Alegre, 1999.

Durante esta etapa ocurre una rápida sucesión de varias especies de levaduras, esto es, mientras disminuye la concentración de azúcares y aumenta la de etanol las levaduras diferentes a *Saccharomyces* poco resistentes a estas condiciones limitan su actividad metabólica y crecimiento, por el contrario las levaduras más resistentes mantienen su actividad metabólica y crecimiento, con lo que se convierten en las especies dominantes que dirigen la fermentación (Fugelsang y Edwards, 2007; Fleet, 2008; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

6. Clarificación

Tras la fermentación, el vino resultante suele ser opaco debido a que contiene en suspensión levaduras, bacterias, fragmentos de células procedentes de la uva, etcétera. Para que éste mejore su aspecto, los vinicultores emplean métodos, como los siguientes, a fin de clarificarlo (Molina, 2000):

- Decantación
- Decantación con ayuda de clarificantes o tratamientos enzimáticos
- Centrifugación



El vino obtenido después de la operación de clarificación es más suave, más fresco, más aromático y se oxida menos debido a que la mayoría de la actividad de la polifenol oxidasa está asociada con las partículas en suspensión. Con el fin de acelerar el clarificado de los vinos, la decantación se puede combinar con la adición de agentes clarificantes y/o enzimas. Los agentes clarificantes (bentonina, gelatinas y albúminas) precipitan los sólidos en suspensión, que sedimentan en el fondo. Las enzimas descomponen las pectinas presentes en el vino procedentes del mosto, consiguiendo así una disminución de la viscosidad y una clarificación más rápida. En general, se llaman sustancias pectínicas a un conglomerado de hidratos de carbono, que aparecen en estado coloidal en los jugos de frutas (Molina, 2000; Flanzky, 2003; García y López-Munguía, 2004; Jackson, 2008).

7. Añejamiento

Muchos vinos nunca entran en contacto con el roble de las barricas y se embotellan directamente después del filtrado. Sin embargo, otros vinos, tanto blancos como tintos, son sometidos a un proceso de añejamiento por cierto tiempo (desde algunos meses hasta varios años) para modificar y mejorar los caracteres organolépticos de éstas bebidas al desarrollar sabores y aromas más complejos (bouquet) y una textura mejor. Durante este proceso el vino es primero sometido a una crianza ligeramente oxidativa en barricas de madera, y posteriormente a un período más largo de crianza reductora en botella, alejados del aire, donde los vinos terminan de alcanzar su madurez (Hidalgo, 2010).

En el añejamiento las sales se precipitan, la acidez disminuye y los alcoholes, ácidos y demás componentes se transforman en innumerables compuestos como ésteres, aldehídos, acetatos, etcétera, que son los responsables de nuevos sabores y aromas del vino (García y López-Munguía, 2004).



El añejamiento es importante para acelerar la clarificación y la estabilidad de los vinos, confiriéndoles ciertas características propias de la madera pues, una vez embotellados, los vinos ya no pueden recibir más tratamientos ni cuidados (Jackson, 2008; Flanzy, 2003).

2.3 Las levaduras vínicas

Las levaduras son hongos unicelulares eucariontes, la mayoría perteneciente a los Ascomicetos. A pesar de que han sido aisladas de una gran variedad de hábitats tanto terrestres como acuáticos, algunas están restringidas a la fuente original de donde fueron aisladas (Mesas y Alegre, 1999; Passarge, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

Son organismos facultativos, lo que les permite crecer en condiciones aerobias y anaerobias. En condiciones aerobias presentan metabolismo oxidativo, transformando los azúcares en CO₂ y agua para producir energía e incrementar rápidamente su biomasa (1g levadura/4g de azúcar). Bajo condiciones anaerobias su metabolismo se vuelve fermentativo, se reducen los azúcares a etanol, CO₂ y energía, sin embargo su rendimiento disminuye (1g levadura/100g azúcar) ya que el 75% de la energía producida se pierde en forma de calor. El tipo de metabolismo que las levaduras llevan a cabo depende de su especie y de las condiciones en que se desarrollan. A bajas concentraciones de glucosa (menos del 1%) y en presencia de aireación las levaduras llevan a cabo el metabolismo aerobio, sin embargo, a altas concentraciones de glucosa y aun en presencia de oxígeno llevan a cabo el metabolismo fermentativo (Mesas y Alegre, 1999; Herrera, 2008).

Las levaduras generalmente forman colonias de diferentes colores y texturas. Vistas al microscopio su forma y dimensión celular es diversa; pueden ser esféricas, ovals, elípticas, apiculadas, cilíndricas, por mencionar algunas,



esto depende de factores como el sustrato en el que viven y la edad de las mismas. Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son su forma de reproducción y sus características bioquímicas, entre otros (Passarge, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

La mayoría de las levaduras son mesófilas porque su crecimiento óptimo está entre los 20 y 25°C, también las hay psicrófilas que crecen entre 4 y 15°C y otras toleran temperaturas más elevadas, son llamadas termófilas (>55°C), lo que depende del hábitat del que fueron aisladas. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4.5-6.5, aunque algunas especies pueden crecer a pH de 3.0 y otras a valores superiores de 8.0 (Mesas y Alegre, 1999; Martorell *et al.*, 2007; Passarge, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

Su reproducción puede ser asexual o sexual. La asexual se realiza por gemación o fisión. Cuando se reproducen por gemación, la célula madre desarrolla una yema o brote llamada célula hija (**Figura 2.3**); ésta crece hasta alcanzar un tamaño similar al de la madre y se separa, aunque ambas pueden quedar unidas formando cadenas de células llamadas pseudomicelio (Fugelsang y Edwards, 2007; Ruiz, 2008; Passarge, 2010) (**Figura 2.4**).



Figura 2.3 Reproducción asexual por gemación de una levadura (phyterra.com)



Figura 2.4 Pseudomicelio (fisisio.cinvestav.mx)

Aunque la mayoría de las levaduras se reproducen como células aisladas, bajo ciertas condiciones pueden desarrollar filamentos largos con septos, los que constituyen el micelio verdadero. Algunas poseen reproducción sexual por conjugación en la que se fusionan dos células. La célula resultante es un cigoto verdadero y de él emergen esporas sexuales por reducción meiótica (Mesas y Alegre, 1999; Fugelsang y Edwards, 2007; Ruiz, 2008; Passarge, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

Cuando el medio es desfavorable, por ejemplo cuando las levaduras han fermentado todo el azúcar del medio nutritivo, producen ascas o células madre que contienen las esporas. Su estado de vida paralizada y su resistencia les permite sobrevivir en unas condiciones que serían fatales para las propias levaduras (deseccación, calor, contacto con agentes químicos, etcétera). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables las esporas (ascosporas) germinan y dan paso a nuevas células de levaduras (Aleixandre, 1996; Fugelsang y Edwards, 2007; Kurtzman *et al.*, 2011).

Las levaduras prosperan típicamente en hábitat ricos en carbohidratos simples, ambientes altamente húmedos o líquidos, ácidos o alcalinos y con nutrientes complejos, tales como frutos, flores, cortezas de árboles, raíces, líquidos en fermentación y sustratos azucarados (Ruiz, 2008; Madigan *et al.*, 2012).



Para las levaduras vínicas el suelo es su principal hábitat en el invierno, encontrándose en la capa superficial de la tierra. Mientras que en el verano son transportadas a la uva por medio de los insectos y del viento, por lo que se encuentran ya en las uvas maduras en el momento de la recolección y son transportadas junto con ellas a la bodega, normalmente pasando por todo el proceso de vinificación. Otra parte de las levaduras comienza a proliferar ya en el depósito (Fugelsang y Edwards, 2007).

La microbiota de la vinificación es muy variada (**Tabla 2.4**), las diferentes especies de levaduras se van sucediendo a lo largo de la fermentación del mosto. Las levaduras apiculadas aseguran la marcha de la primera parte de la fermentación, a ellas se deben los 3 ó 4 primeros grados de alcohol, entre los géneros de levaduras más comunes de esta etapa están: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*. Posteriormente las levaduras del género *Saccharomyces* invaden rápidamente el medio y hacia la mitad de la fermentación las levaduras del principio ya han muerto (Aleixandre, 1996; Fleet, 2003).

Saccharomyces cerevisiae es muy capaz de crecer en sustratos con altas concentraciones de azúcar y etanol, bajos pH y con compuestos antimicrobianos, por lo que está muy bien adaptada a las condiciones de vinificación, según la cepa, soporta de 8 a 16 grados de alcohol y su constante predominancia se debe más que a su poder alcohólico, a su fuerte intensidad fermentativa (cantidad de azúcar transformado por unidad de tiempo). Hacia el final de la fermentación de los mostos ricos en azúcares, la especie más dominante es la *Saccharomyces oviformis*, menos sensible al alcohol. Algunas de estas cepas alcanzan los 17 ó 18 grados de alcohol, siendo muy útiles para el acabado de vinos de alta graduación alcohólica (Lopandic *et al.*, 2007).



Tabla 2.4 Algunas especies de levaduras vínicas reportadas en uvas, mosto y vino

Género	Especie	Muestra de aislamiento	
Brettanomyces	<i>anomalous</i>	Mosto	
	<i>bruxellensis</i>	Mosto	
	<i>clausenii</i>	Mosto y vino	
	<i>custersianus</i>	Mosto y vino	
	<i>custersii</i>	Mosto y vino	
	<i>intermedius</i>	En vinos sudafricanos	
	<i>lambicus</i>	Mosto y vino	
Candida	<i>apicola</i>	Etapas iniciales de la fermentación	
	<i>boidinii</i>		
	<i>brumptii</i>		
	<i>cantrellii</i>		
	<i>dattila</i>		
	<i>guillermondi</i>		
	<i>humilis</i>		
	<i>intermedia</i>		
	<i>kefyer</i>		
	<i>lambica</i>	Mosto y vinos pero rara en mostos griegos y sudafricanos	
	<i>lipolytica</i>		
	<i>sake</i>		Uva
	<i>stellata</i>		Uva
	<i>tropicalis</i>		Común en mostos griegos
	<i>utilis</i>		Mostos españoles
<i>valida</i>	Mosto		
<i>vini</i>	Mosto		
<i>zemplanina</i>	Etapas iniciales de la fermentación		
Cryptococcus	<i>albidus</i>	Poco común	
	<i>laurentii</i>	Vinos	
Debaryomyces	<i>hansenii</i>	Mosto	
	<i>kursanovi</i>	Mostos alemanes	



Tabla 2.4 Continuación

Género	Especie	Muestra de aislamiento
<i>Hanseniaspora</i>	<i>osmophila</i>	Vinos, especialmente en climas templados
	<i>uvarum</i>	
	<i>valbyensis</i>	
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	Mosto y vino
	<i>fabrianii</i>	
	<i>jadinii</i>	
	<i>saturnus</i>	Vino de cosechas tardías
	<i>subpelliculosa</i>	Mosotos españoles y jerez
<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>	Vino
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>	Muy común en uvas, mosto y vino
	<i>cortisis</i>	Mostos italianos
	<i>japónica</i>	Mosto y primeras etapas de la fermentación
<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	Vino espumoso y jerez
	<i>marxianus</i>	Vino
	<i>bulgaricus</i>	
	<i>vanudenii</i>	
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	Primeras etapas de la fermentación
	<i>reukaufii</i>	
<i>Pichia</i>	<i>delftensis</i>	Uvas, mosto y vino
	<i>farinosa</i>	
	<i>fermentans</i>	
	<i>kluyveri</i>	Vino y coñac
	<i>membranaefaciens</i>	Muy común en vinos y al inicio de la fermentación
	<i>glutinis</i>	Poco frecuente en uvas, mosto o vinos
	<i>minuta</i>	Uvas verdes en Nueva Zelanda
	<i>mucilaginosa</i>	Vinos secos y mostos griegos
	<i>pallida</i>	Vinos Italianos
	<i>vini</i>	Vino, poco frecuente



Tabla 2.4. Continuación

Género	especie	Muestra de aislamiento
Saccharomyces	<i>aceti</i>	Vinos españoles
	<i>bayanus</i>	Uva, mosto y vino
	<i>capensis</i>	Uva
	<i>carlsbergensis</i>	Uvas y menos frecuente en vino
	<i>cerevisiae</i>	Dirige todo el proceso de vinificación
	<i>chevalieri</i>	Vinos de África e Italia.
	<i>cordubensis</i>	Uva
	<i>delbrueckii</i>	Vino
	<i>ellipsoideus</i>	Mosto y poco frecuente en vino
	<i>globosus</i>	
	<i>heterogenicus</i>	
	<i>hispanica</i>	Vinos españoles
	<i>inconspiccus</i>	Mosto
	<i>italicus</i>	Uvas y mosto de climas templados
	<i>oviformis</i>	Uvas y mosto, más frecuente en etapas finales de la fermentación
<i>roseii</i>	Uvas	
<i>transvaalensis</i>	Mostos griegos	
Saccharomycodes	<i>ludwigii</i>	Mosto y vino
Schizosaccharomyces	<i>pombe</i>	Vino, utiliza ácido málico
Torulaspota	<i>delbrueckii</i>	Vino
Zygosaccharomyces	<i>bailii</i>	Vino
	<i>bisporus</i>	Mosto
	<i>cidri</i>	Mosto y cidra
	<i>florentinus</i>	Mosto
	<i>microellipsoideus</i>	Mosto y vino
	<i>rouxii</i>	Uvas y mosto

Adaptado de Boulton *et al.*, 2002.

3. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación exhaustiva y actualizada sobre los métodos tradicionales y moleculares de identificación de levaduras con interés enológico.

Para ello se emplearon los recursos bibliográficos y hemerográficos disponibles en:

- Bibliotecas: Biblioteca de la Facultad de Química, Biblioteca de la Facultad de Ciencias, Biblioteca del Instituto de Biología, Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas y Biblioteca Central de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hemerotecas: Hemeroteca de la Facultad de Química, Hemeroteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas y Hemeroteca de la Biblioteca Central de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Revistas electrónicas especializadas en el tema, disponibles en las bases de datos de la Dirección General de Bibliotecas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Base de datos de PUBMED, ELSEVIER y SCIENCE DIRECT.

La información obtenida fue clasificada y analizada.

La bibliografía utilizada comprende los años 2006-2012, salvo en algunos casos en los que fue necesario utilizar referencias más antiguas debido a la valiosa información que éstas contienen y al indiscutible aporte que confirieron a esta investigación.

4. RESULTADOS

4.1 Métodos tradicionales de identificación

Para el análisis de los microorganismos, la identificación precisa de los aislados es esencial; las principales especies de levaduras involucradas en la fermentación del vino comprenden un gran número de cepas con distintas propiedades y características. Estas cepas influyen en la velocidad, en la naturaleza y en la cantidad de los metabolitos secundarios que se forman durante la fermentación alcohólica y los caracteres aromáticos del vino (Senses-Ergul *et al.*, 2006).

La capacidad de diferenciar las levaduras presentes en este proceso, principalmente las diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, es muy importante para profundizar en estudios sobre cuáles de las cepas nativas presentes en las uvas son las responsables de iniciar la fermentación espontánea del mosto, o para poder conocer una selección de cepas que presenten las mejores cualidades enológicas (Gayon-Ribéreau *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006).

4.1.1 Aislamiento de las levaduras

En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismo. Lo que existe son comunidades microbianas, y los métodos que permiten el aislamiento y cultivo de los microorganismos de interés son de suma importancia. Incluso, sin importar el tipo de metodología que se utilice para la identificación, el aislamiento de las levaduras es primordial, ya que sólo al aislar y tener un cultivo puro se puede proceder, de lo contrario un cultivo contaminado puede arrojar resultados falsos y erróneos. Por esta razón, la recuperación y purificación de las levaduras desde el ecosistema original en el que se encuentran,



hasta el medio de cultivo más adecuado para el trabajo en el laboratorio, consiste en el primer paso de la identificación (Andrade, 2006, Madigan *et al.*, 2012).

Algunas técnicas selectivas son usadas muy a menudo para el aislamiento de las levaduras. Estas técnicas emplean medios de cultivo que permiten el crecimiento de las levaduras y a la vez suprimen el crecimiento de bacterias y mohos. Esto se logra por el hecho de que las levaduras son capaces de desarrollarse a niveles de pH y actividades acuosas que, en general, no resisten las bacterias; asimismo, los medios pueden incluir antibióticos o fungicidas que suprimen el crecimiento de bacterias y mohos (Barnett *et al.*, 2000; Martorell *et al.*, 2007).

La temperatura promedio de incubación para las levaduras es de 20 - 25°C dependiendo de la especie. Por otro lado, los medios acidificados proporcionan también un medio selectivo, el pH de los medios suele ajustarse con ácido fosfórico o clorhídrico hasta valores de 3.5 – 3.8 (Gayon-Ribéreau *et al.*, 2006).

Además, es importante recordar que para los trabajos de identificación es mejor trabajar con cultivos jóvenes (48 horas de incubación aproximadamente) para obtener resultados confiables, ya que a medida que un cultivo envejece los cambios en las células de las levaduras pueden dar lugar a falsos positivos o a malas interpretaciones (Andrade, 2006).

4.1.2 Observación morfológica

La observación morfológica es el siguiente paso en la identificación, con ella es posible tener una idea del tipo de levaduras con las que se trabaja (**Tabla 4.1**).



Tabla 4.1 Guía para identificar los géneros de las levaduras vínicas mediante observación morfológica.

- I. Fisión: *Schizosaccharomyces*.
- II. Gemación bipolar.
 - A. Sin esporas: *Kloeckera*.
 - B. Con esporas.
 1. Esporas esféricas y lisas (conjugación en ascas): *Saccharomycodes*.
 2. Esporas en forma de bombín o casco (sin conjugación en ascas): *Hanseniaspora*.
- III. Gemación multilateral.
 - A. Formación abundante de ácido acético a partir de glucosa, resistente a la cicloheximida, algunas células ojivales, olor pungente en placas antiguas, las colonias disuelven CaCO_3 .
 1. Con esporas: *Dekkera*.
 2. No se han encontrado esporas: *Brettanomyces*.
 - B. No A.
 1. Con esporas.
 - a. Asimilan el nitrato: *Hansenula*.
 - b. No asimilan el nitrato.
 - i. Esporas en forma de aguja: *Metschnikowia*.
 - ii. Esporas en forma de sombrero o saturno: *Pichia*.
 - iii. Esporas arriñonadas o en forma de luna creciente: *Kluyveromyces*.
 - iv. Esporas esféricas o elipsoidales.
 - 1) Ascas dehiscentes: *Kluyveromyces* o *Pichia*.
 - 2) Ascas persistentes.
 - a) La conjugación precede inmediatamente a la formación de ascas: *Torulaspota*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*.
 - b) Conjugación después de la formación de ascas: *Saccharomyces*.
 2. Sin esporas.
 - a. Colonias rosadas o rojas
 - i. Asimilación de inositol: *Cryptococcus*.
 - ii. No asimilan inositol: *Rhodotorula*.
 - b. Colonias ni rosadas ni rojas
 - i. No asimilan inositol, con seudomicelio: *Candida*.

Adaptado de Boulton *et al.*, 2002.



La observación morfológica se divide en dos partes: una que analiza a las colonias y la otra a las células con ayuda del microscopio (Boulton *et al.*, 2002).

En el primer caso se registran las características de la colonia como el color, superficie, elevación, textura y borde. En general las colonias de levaduras suelen ser de color blanco o crema, lisas, y de tamaño variable, por lo que el aspecto morfológico de la colonia no representa habitualmente un carácter distintivo importante entre las diferentes especies, aunque existen determinadas características que en algunos casos permiten orientar el diagnóstico de género. Por ejemplo, colonias lisas de color rosado o asalmonado, y de aspecto mucoso son características del género *Rhodotorula* (Rubio, 2003; Kurtzman *et al.*, 2011).

En el segundo caso la observación se lleva a cabo bajo el microscopio óptico (**Figura 4.1**) y se buscan diferentes características como la forma de las células que puede ser ovoide, esférica, ovalada, elipsoidal, apiculada; también se puede distinguir el modo de reproducción vegetativa que puede ser por gemación bipolar, unipolar o multipolar; o por bipartición binaria. Además de la reproducción vegetativa se examina a las levaduras para ver si estas son capaces de crecer en filamentos (pseudomicelios) y si producen o no esporas, si el examen es positivo en el último caso se analizan las esporas para ver de qué tipo son y de esta manera poder incluir a las levaduras estudiadas en el género de Ascomicetos o Basidiomicetos (Mesas y Alegre, 1999; Freifelder, 2003; Ruiz, 2008; Passarge, 2010).

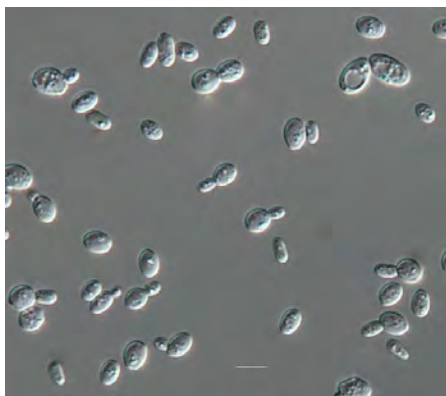


Figura 4.1 Levaduras vistas al microscopio óptico (andaluciainvestiga.com)



4.1.3 Pruebas fisiológicas

Este tipo de pruebas se basa en la capacidad que tienen las levaduras para crecer en diferentes condiciones físicas, en presencia de antibióticos, de utilizar diferentes compuestos como única fuente de carbono o nitrógeno y la capacidad que tienen de fermentar azúcares. Sirven principalmente para describir e identificar géneros de levaduras y en un grado mucho menor para identificar especies (Barnett, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011).

Fermentación de carbohidratos

Las levaduras tienen una gran variabilidad en su habilidad de fermentar azúcares y al parecer no existen excepciones a la regla que indica que cuando una levadura fermenta un carbohidrato es también capaz de crecer en él; sin embargo, no sucede lo mismo a la inversa. Existen levaduras que pueden crecer anaeróbicamente en azúcares que no pueden fermentar (Kurtzman *et al.*, 2011).

Este ensayo prueba la capacidad que tienen algunas levaduras de fermentar uno o más azúcares, y se basa en los postulados de Kluver-Dekker, los cuales señalan que toda levadura que no fermenta glucosa no fermenta a su vez ningún otro azúcar, toda levadura que fermenta glucosa también fermenta fructosa y manosa y ninguna levadura que fermenta maltosa puede fermentar lactosa y viceversa (Rubio, 2003).

Esta prueba se realiza a partir de un cultivo joven de 48 horas, se siembran los tubos por duplicado con las levaduras a estudiar. En general, la incubación se lleva a cabo a 25°C y 30°C, y se le da seguimiento por un período de 48 horas, si resulta negativo se observa nuevamente a los 3 días, posteriormente a los 6 días y si no se lleva a cabo la fermentación a los 10 días el resultado se toma como negativo, incluso algunos autores reportan tiempos de incubación de 15 y 20 días.



El gas resultante de la fermentación se recoge en las campanas de Durham (Wang *et al.*, 2003; Capello *et al.*, 2010; Csoma *et al.*, 2010).

Existen diversos métodos para detectar la producción de dióxido de carbono proveniente de la fermentación de azúcares, sin embargo, el método más usado son los tubos de Durham. Los tubos de Durham contienen soluciones al 2% (p/v) de los azúcares que serán probados, además se introducen pequeños tubos de manera invertida para coleccionar el gas producido durante la fermentación, llamados campanas de Durham (Csoma *et al.*, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

Crecimiento con una sola fuente de carbono

Estas pruebas están basadas en la capacidad variable de las diferentes especies de levaduras para crecer en medios de cultivo que contienen compuestos diversos que sirven como única fuente de carbono, los compuestos que se usan son casi siempre azúcares, ácidos orgánicos y algunos alditos; y se realizan únicamente sobre las cepas que no han fermentado ningún azúcar para saber si son capaces de metabolizarlos por vía oxidativa (Griffin, 1994; Barnett, 2000; Rubio, 2003).

Para identificar una levadura se requiere ensayar más de 50 de los compuestos antes mencionados y se sugiere que los ensayos se hagan en 7 intervalos diferentes de temperatura de incubación lo que vuelve a la identificación un proceso muy tardado e incosteable para muchos laboratorios, los compuestos utilizados en estas pruebas son generalmente glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, trehalosa, ribosa, glucosamida, xilosa, arabinosa, sacarosa, glicerol, manitol y ácido acético (Rubio, 2003; Barnett, 2000).

Las pruebas pueden hacerse en medio líquido o sólido, este último se conoce como auxanograma y es el más empleado pues permite hacer varios ensayos en una sola caja. Las levaduras son inoculadas en un medio que contiene



todos los requerimientos nutritivos excepto una fuente de carbono (generalmente se usa el medio Yeast Nitrogen Base o YNB). Los diferentes compuestos de carbono que se van a probar se disponen en la superficie del agar mediante discos de papel absorbente empapados con soluciones acuosas al 20% de cada nutriente. El crecimiento de una levadura en la zona circundante a los discos indica la capacidad de utilización de esta sustancia como única fuente de carbono (Linares y Solís, 2007).

Crecimiento con una sola fuente de nitrógeno

Las levaduras son capaces de utilizar una vasta variedad de fuentes de nitrógeno. Los compuestos más comúnmente utilizados en esta prueba son nitratos, nitritos, etilamina, cadaverina, L-lisina, imidazol, glucosamina, creatina y creatinina. Las levaduras que crecen con nitrato como única fuente de nitrógeno son también capaces de crecer en nitrito, pero a la inversa esto no siempre ocurre (Griffin, 1994; Kurtzman *et al.*, 2011).

Son pocas las levaduras que asimilan nitratos, lo que significa que la mayor parte de las levaduras existentes en la naturaleza no están capacitadas para metabolizar estos compuestos; por lo que esta prueba es de gran utilidad, ya que si resulta positiva para un género, es normalmente una característica de todas las especies dentro del mismo (Barnett *et al.*, 2000).

Por ejemplo, la inhabilidad de las levaduras *Saccharomyces* para aprovechar la lisina como única fuente de nitrógeno es un hecho muy explotado para la diferenciación de éste género de las poblaciones de levaduras presentes en la fermentación (Csoma *et al.*, 2010).

Las pruebas se hacen generalmente en medio sólido, con un auxanograma como el descrito anteriormente, con la diferencia que las levaduras son inoculadas



en un medio que contiene todos los requerimientos nutritivos excepto una fuente de nitrógeno (Barnett *et al.*, 2000; Rubio, 2003).

Se ha encontrado que fermentaciones retardadas de vino se deben a cantidades pobres de nitrógeno asimilable para las levaduras lo que pone de manifiesto la importancia de este compuesto para el metabolismo fermentativo (Wang *et al.*, 2003).

Requerimientos vitamínicos

La habilidad de las levaduras por crecer en medios con únicamente glucosa y minerales y deficientes en todas las vitaminas fue introducida como prueba de identificación por Wickerman (1951) y extendida a incluir los requerimientos individuales de vitaminas por van Uden y Farinha (1958) (Kurtzman *et al.*, 2011).

La determinación de requerimientos vitamínicos está basada en si las levaduras pueden o no crecer en un medio mineral con la falta de una o varias vitaminas ya que de forma natural las levaduras no sintetizan estos compuestos y son comunes las deficiencias, principalmente de biotina y tiamina (Griffin, 1994).

Para llevar a cabo la prueba un tubo con medio libre de vitaminas es inoculado, generalmente las levaduras crecen bien en este medio con las reservas que tiene la célula. Se requiere de un segundo tubo con medio libre de vitaminas y un set completo de tubos con medios ricos en diferentes vitaminas que son usados para probar los requerimientos individuales de vitaminas para cada levadura. Cuando el análisis se lleva a cabo, se toman pequeñas alícuotas de la suspensión de células del primer tubo y se van agregando a cada tubo de prueba (Barnett *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2012).

Las vitaminas que en general se ensayan son: biotina (vitamina B7), ácido fólico, niacina (vitamina B3), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), ácido



pantoténico (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6) e inositol (Griffin, 1994; Medina *et al.*, 2012).

Es preciso aclarar que no todas las vitaminas son necesarias para cada uno de los microorganismos que protagonizan la fermentación, ya que algunos sintetizan por sí mismos algunos compuestos. Ciertas vitaminas son imprescindibles para una especie de levadura, pero no para otra especie distinta (Suárez e Íñigo, 2004).

Crecimiento en condiciones de estrés osmótico

El propósito de esta prueba es diferenciar a las levaduras capaces de crecer en concentraciones elevadas de azúcar, ya que las levaduras que provienen de sustratos con altas concentraciones de azúcar son generalmente resistentes a presiones osmóticas altas. Muchas especies de levaduras pueden crecer en concentraciones mayores a 40% (p/p), mientras que algunas especies pueden crecer hasta en concentraciones de 50 a 70% de glucosa (osmófilas) (Martorell *et al.*, 2007).

La mayoría de las levaduras requiere un mínimo de actividad de agua (a_w) de 0.85 para su crecimiento, mientras que las levaduras osmófilas pueden crecer, a un ritmo lento, a valores de a_w entre 0.61 y 0.75. Es por ello que los mostos con cantidades de azúcar muy elevadas (60-70%) tienen problemas de fermentaciones tardías e incluso la fermentación puede no llevarse a cabo (Mills *et al.*, 2002; Tofalo *et al.*, 2009).

Los medios de cultivo con grandes concentraciones de azúcar, que se encuentran en tubos con torundas de algodón y en cajas de petri, generalmente tienden a deshidratarse rápidamente en climas secos debido a la evaporación. El agua que se pierde puede afectar los resultados por lo que se recomienda incubar los tubos y cajas en bolsas herméticas que permiten el intercambio de gases pero



evitan las pérdidas de agua. Es común el uso de parafilm para sellar las cajas de petri y evitar de esta manera la evaporación (Kurtzman *et al.*, 2011).

Tolerancia a 1% de ácido acético

Sand (1973) y Pitt (1974), demostraron que las levaduras podían distinguirse en base a su resistencia a los ácidos acético y benzoico, debido a que la resistencia a estos ácidos está limitada a muy pocas levaduras (Kurtzman *et al.*, 2011).

La prueba se realiza en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, agar 2%) con 1% de ácido acético, las cajas son incubadas a 25°C y revisadas después de 3 y 6 días para observar el desarrollo de las colonias. Si las colonias no se desarrollan es un resultado negativo, si crecen es un resultado positivo (González y Rodríguez, 2001; Guaragnella *et al.*, 2006; Agnolucci *et al.*, 2009).

Tolerancia a etanol

Varias especies de levaduras son capaces de formar etanol por fermentación de monosacáridos y oligosacáridos. La expresión cuantitativa de esta propiedad es, sin embargo, bastante variable entre las levaduras fermentadoras, que van desde 1-2% (p/v) a 14% y mayor en algunas cepas, en sentido estricto, del género *Saccharomyces*. La tolerancia a las concentraciones de alcohol etílico superior al 12-13% (p/v) es un carácter tecnológico muy apreciado en el caso de las levaduras utilizadas como iniciadores de fermentación en la industria del vino. (Masneuf-Pomarède *et al.*, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

La prueba se realiza en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, agar 2%) con 10% de etanol, las cajas son incubadas a 25°C y revisadas después de 72 horas para observar el desarrollo de las colonias. Si las



colonias no se desarrollan es un resultado negativo, si crecen es un resultado positivo (González y Rodríguez, 2001; Guaragnella *et al.*, 2006; Agnolucci *et al.*, 2009).

4.1.4 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas de identificación son menos usuales en levaduras que en bacterias. La mayoría se basa en la presencia o ausencia de ciertas enzimas, o en la producción de ciertos compuestos. Son pruebas más elaboradas y por lo tanto menos factibles cuando se busca un método de identificación rápido (Suárez e Iñigo, 2004).

Escisión de arbutina

Esta prueba determina si la levadura puede o no hidrolizar la arbutina con la producción de la enzima β -glucosidasa. La inoculación se realiza a partir de un cultivo joven de 48 horas, incubando los tubos sembrados a 27°C. A los quince días se compara la tonalidad del medio con la del tubo que se conserva con medio estéril como patrón (Suárez e Iñigo, 2004).

La composición del medio para ésta prueba consiste en: 0.5% arbutina, 0.1% extracto de levadura, 2% agar, 0.001% citrato férrico. La sal férrica soluble reaccionará con la quinona libre, procedente de la hidrólisis de la arbutina (hidroquinona- β -D-glucopiranosido), dando lugar a la aparición de un color oscuro si la enzima está presente, o quedando en su coloración original si no es así (Pando Bedriñana *et al.*, 2010).

Pando Bedriñana y cols. (2010), analizaron la diversidad y la dinámica de las levaduras durante la producción de sidra Asturiana. Las levaduras se aislaron de jugo de manzana y en diferentes etapas de la fermentación. Se llevaron a cabo



pruebas bioquímicas como la escisión de la arbutina con la que se observó la producción de la β -glucosidasa.

En el estudio la detección de la actividad β -glucosidasa, con arbutina como la única fuente de carbono, se encontró en dos cepas de *S. cerevisiae*, lo cual es muy poco frecuente, ya que la actividad de la β -glucosidasa generalmente se presenta en levaduras distintas al género *Saccharomyces*.

La importancia de esta actividad reside en su capacidad para liberar compuestos aromáticos a partir de glucósidos naturales, aumentando así la concentración de compuestos volátiles y mejorando con esto la calidad organoléptica de las bebidas (Pando Bedriñana *et al.*, 2010).

Producción de ácido a partir de glucosa

En general, todas las levaduras producen diferentes ácidos, tanto volátiles (acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico, caproico, por mencionar algunos) como no volátiles (pirúvico, láctico, fumárico, succínico, hidrocínámico y fenilacético), cuando se siembran en algún medio, sin embargo, ésta producción es evaluada únicamente cuando la producción de ácido acético se da en grandes cantidades (Koneman *et al.*, 2008).

El medio glucosa-extracto de levadura-carbonato de calcio llamado GYC agar, contiene glucosa (50 gL^{-1}), extracto de levadura (10 gL^{-1}), carbonato de calcio (20 gL^{-1}) y agar (10 gL^{-1}) es usado para esta prueba y el resultado se determina mediante la disolución del carbonato de calcio. La característica principal de especies como *Dekkera/Brettanomyces* es la producción de ácido, pero esta producción es débil en algunas cepas. Las cepas a evaluar se siembran en un tubo con medio inclinado o en una caja petri con medio GYC y ser incubadas a 25°C . Los cultivos deben ser observados con frecuencia en intervalos de hasta dos semanas para observar los halos que se forman alrededor del medio. Este



resultado se puede obtener con la producción de cualquier ácido por parte de la levadura (González y Rodríguez, 2001; Wu *et al.*, 2012).

4.1.5 Sistemas automatizados

Debido a la cantidad de pruebas que requiere la identificación fisiológica y el tiempo que lleva hacer un análisis de esta manera, se han diseñado diferentes sistemas comerciales (kits) de identificación rápida que tienen el mismo fundamento que las pruebas anteriores pero permiten ser desarrolladas en menos tiempo, entre los más comunes están Vitek[®], Sistema RapID Yeast Plus[®], Sistema API[®] y Auxacolor[®]. El que probablemente es el más utilizado tanto por su precio como por el porcentaje de identificación correcta que ofrece (97%) es el sistema API[®] (Andrade, 2006).

La mayoría de estos sistemas se basan en la taxonomía numérica, la cual fue definida en por Sokal y Sneath (1963) como “la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas unidades en taxones, basándose en el estado de sus caracteres” (Sokal, 1966; Ferrari *et al.*, 1995).

Su metodología consiste en determinar varios caracteres de diferentes microorganismos, a cada uno de estos caracteres se les da la misma importancia, y una computadora analiza todos los datos reconociendo las diferencias y analogías entre ellos, para hacer la separación de grupos mediante los datos obtenidos. Las primeras separaciones se hacen atendiendo a caracteres morfológicos y estructurales, realizando a continuación un gran número de pruebas de naturaleza variada, anotando los resultados de las mismas con un signo positivo o negativo; los datos se recogen en tablas y son codificados (Montiel, 1991; Ferrari *et al.*, 1995; Suárez e Íñigo, 2004).



Entre las ventajas que presentan estos sistemas automatizados están su facilidad de manejo, el poco espacio de almacenamiento requerido, fácil interpretación, alta reproducibilidad, la posibilidad de realizar numerosas pruebas a la vez; mientras que por otro lado sus desventajas son que sólo se pueden identificar determinado número de levaduras contenidas en la base de datos y que no es posible detectar posibles contaminaciones, aunque la desventaja principal de estos kits es que fueron diseñados para su uso en clínica por lo que su aplicación en alimentos es muy restringida (Kitch *et al.*, 1996; Heelan *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2002).

Sistema API®

El sistema API® (API 20C AUX® y el API/ATB ID 32C®) es el sistema más común para la identificación de levaduras. Estos kits comerciales consisten en una tira de plástico con 20 y 32 pruebas miniaturizadas, tanto bioquímicas como de asimilación, respectivamente (**Figuras 4.2 y 4.3**) (Heelan *et al.*, 1998; Linares y Solís, 2007).

Los pozos contienen los sustratos deshidratados para las reacciones; las cúpulas se inoculan con un medio mínimo y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente (Koneman *et al.*, 2008).



Figura 4.2 Sistema API 20C AUX® (Linares y Solís, 2007).



Figura 4.3 Sistema API ID 32[®] (Linares y Solís, 2007).

Los resultados de las reacciones se obtienen en 24 a 72 horas. Para leerlas se compara la turbidez del medio dentro de cada microtubo con la de los controles, una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva. Los resultados se agrupan en triadas y se suman puntos de acuerdo a si la reacción es positiva (+) o negativa (-), con esto se crea un código de siete dígitos para API 20C AUX[®] y de 10 dígitos para API/ATB ID 32C[®] (Heelan *et al.*, 1998).

La identificación se realiza usando el código y comparando ese resultado con la base de datos. La base de datos de API ID 32[®] incluye 63 especies de levaduras y la de API 20C AUX[®], 43 (Koneman *et al.*, 2008).

El sistema API[®] fue el primer método comercial usado para la identificación de levaduras, y es comúnmente utilizado como uno de los principales métodos de referencia cuando se realizan pruebas con los demás sistemas comerciales (Kitch *et al.*, 1996; Heelan *et al.*, 1998).

Sistema Vitek[®]

Las tarjetas bioquímicas para levaduras (Yeast Biochemical Card) del sistema Vitek[®] permiten la identificación de organismos levaduriformes y afines de forma automatizada. Son tarjetas plásticas que contienen 30 pocillos (26 pruebas



bioquímicas convencionales y 4 controles) que se inoculan con una suspensión de la levadura en una solución salina equivalente a un estándar de Mc Farland no. 2 y se incuba a 30°C durante un período de entre 24 a 48 horas en la cámara de incubación que el mismo sistema provee (Heelan *et al.*, 1998; Koneman *et al.*, 2008; Linares y Solís, 2007).

El sistema Vitek® consta de un módulo con cámara de vacío para la inoculación de las tarjetas, un lector/incubador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, además se requiere un sistema computarizado que registre los resultados y los compare con la base de datos (Koneman *et al.*, 2008).

Los cambios de color se leen por espectrofotometría y se informa del resultado con un código numérico de nueve dígitos. La base de datos incluye 36 especies de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula*, 2 *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Prototheca*, *Hansenula anómala*, *Pichia homeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* (Koneman *et al.*, 2008; Linares y Solís, 2007).

Su principal desventaja es que se requiere equipo adicional como la cámara de vacío y un espectrofotómetro aumentando el costo del análisis (Koneman *et al.*, 2008).

Sistema RapID Yeast Plus®

El sistema RapID Yeast Plus® está compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la utilización de hidratos de carbono como sustrato, la hidrólisis de ácidos grasos y urea, y la hidrólisis enzimática de sustratos glucósido y arilamida (Kitch *et al.*, 1996; Espinel-Ingroff *et al.*, 1998) (**Figura 4.4**).



Figura 4.4 Kit comercial RapID Yeast Plus System[®] (Linares y Solís, 2007).

Se incuba durante cuatro horas a 30°C y se lee después de agregar los reactivos específicos. Las reacciones se determinan por cambios de color de sustratos cromogénicos dentro de los pocillos de reacción, éstas se agrupan en triadas y se suman puntos de acuerdo a si la reacción es positiva (+) o negativa (-) (Arias *et al.*, 2002; Linares y Solís, 2007) (**Figura 4.5**).

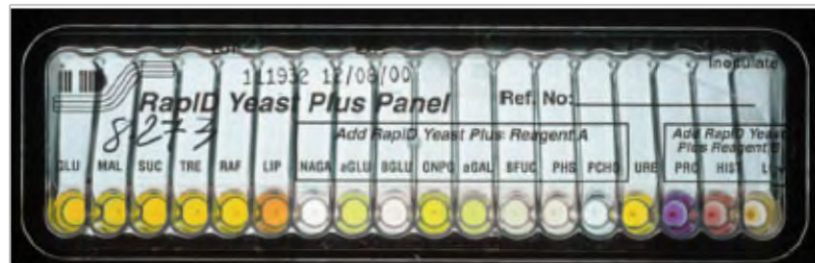


Figura 4.5 Panel de reacciones de RapID Yeast Plus System[®] (Linares y Solís, 2007).

A partir de los resultados obtenidos se crea un código de seis dígitos y se compara con una base de datos que incluye 43 especies de levaduras. La principal ventaja es el tiempo de reacción, que es muy corto (cuatro horas) en comparación con los otros kits comerciales (Kitch *et al.*, 1996; Espinel-Ingroff *et al.*, 1998; Heelan *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2002; Linares y Solís, 2007).



AUXACOLOR®

El kit comercial Auxacolor® (**Figura 4.6**) es un sistema de identificación que se basa en la utilización de 13 hidratos de carbono y el crecimiento se visualiza por el cambio de color del indicador de pH (Linares y Solís, 2007).



Figura 4.6 Kit comercial AUXACOLOR® (Linares y Solís, 2007).

La placa de microtitulación contiene 16 pocillos y se lee después de 24 a 72 horas de incubación a 30°C. El cambio de color (amarillo) del indicador de pH se interpreta como crecimiento positivo para el azúcar en cuestión (**Figura 4.7**). Todas las pruebas de la galería se agrupan en tripletes para obtener un código numérico. La identificación de la levadura se consigue comparando el código numérico resultante con la base de datos que proporciona el fabricante, la cual contiene 26 especies de levaduras (Linares y Solís, 2007; Willemsen *et al.*, 1997).



Figura 4.7 Galería AUXACOLOR® (Linares y Solís, 2007).

4.2 Métodos moleculares de identificación

En la actualidad los métodos tradicionales se han reemplazado paulatinamente con los métodos moleculares ya que éstos ofrecen ciertas ventajas, como la rapidez y precisión en las identificaciones, por mencionar algunos beneficios (Beh *et al.*, 2006).

Los métodos moleculares pueden ser usados para detectar e identificar microorganismos en dos formas diferentes. En la primera, se combinan los métodos tradicionales de cultivo, como el sembrado en placa o el enriquecimiento, con métodos de identificación genotípica. El análisis de la población microbiana, en este caso, no se realiza directamente con el número de células originales contenidas en la muestra, sino con su progenie, es por esto que son llamados métodos indirectos (Giraffa, 2004; Mills *et al.*, 2008).

La mayoría de los métodos indirectos se basan en la identificación de polimorfismos en el DNA de las levaduras. El polimorfismo genético se refiere a la variación génica observada en las poblaciones. Es la existencia de diferentes formas de un gen (alelos) en un locus determinado. Así, dentro de una población pueden existir individuos con versiones distintas del mismo gen o distintos alelos y cada alelo difiere de los demás en la secuencia de DNA, de modo que estos cambios pueden o no alterar la función del producto génico y pueden o no mostrar un cambio en el fenotipo. Los polimorfismos se distinguen de las mutaciones porque los primeros son más frecuentes, es decir, un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1% (Passarge, 2010; Checa, 2007; Andrade, 2006; Cook, 1979).

Los cromosomas de las levaduras enológicas presentan un polimorfismo de tamaño importante; estos polimorfismos moleculares pueden explicarse por los complejos cambios genómicos a los que son sometidas las levaduras vínicas



durante la adaptación a las condiciones estresantes de la vinificación (altas concentraciones de azúcar, bajo contenido de nitrógeno, concentraciones en aumento de etanol, pH bajo, además de compuestos antimicrobianos que son adicionados durante el proceso) estas levaduras podrían mostrar una inestabilidad genética que conlleva a grandes rearrreglos cromosomales para ser capaces de adaptarse a este tipo de condiciones ambientales. Las razones de estos cambios genómicos pueden ser múltiples: mutaciones espontáneas, translocaciones cromosómicas, recombinación mitótica y la conversión de genes (Flanzy, 2003; Lopandic, 2008).

La principal desventaja de los métodos indirectos es el tiempo que toma el aislamiento o enriquecimiento de las cepas; otra desventaja importante es que estos métodos no detectan microorganismos viables pero no cultivables, lo que ocasiona una subestimación de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra (Ivey y Phister, 2011).

Los microorganismos viables pero no cultivables son microorganismos vivos que fueron sometidos a condiciones de estrés en condiciones ambientales adversas como la inanición, cambios en el pH del medio, o la presencia de sustancias antimicrobianas, por lo que entran en un estado de latencia; también pueden ser microorganismos que fueron aislados del ambiente, sin embargo, se desconocen las condiciones adecuadas para cultivarlos (temperatura óptima, requerimiento de nutrientes, etcétera); y por lo tanto son células vivas que no forman colonias o que no se desarrollan en condiciones de laboratorio (Mills *et al.*, 2008).

Por ejemplo, en la producción del vino el estudio del estado viable pero no cultivable de los microorganismos ha ayudado a entender los principales problemas de deterioro del producto final, ya que aislar en placas a los microorganismos causantes del deterioro no es una tarea fácil, esto debido a los inhibidores que contiene el vino, como el sorbato, los sulfitos y el etanol, al estar



expuesta a éstas sustancias la microbiota pierde la capacidad de crecer en medios de cultivo estándar. A pesar de su incapacidad para formar colonias en placas estos microorganismos aún son viables, por lo que su presencia sigue influyendo en las características de las bebidas fermentadas como el sabor; además los microorganismos indeseables siguen deteriorando el producto a pesar de no haber sido aislados, es aquí donde radica la importancia de identificar este tipo de microorganismos (Ivey y Phister, 2011).

Entre los mayores inconvenientes de los métodos dependientes de cultivo se encuentra la imposibilidad de describir la biodiversidad de los sistemas microbianos complejos con precisión, ya que cuando se utilizan, por ejemplo, los medios de cultivo la microbiota presente originalmente en la muestra está sujeta a cambios importantes, además las poblaciones que son numéricamente menos abundantes son difíciles de recuperar e identificar (Cocolin *et al.*, 2011).

La segunda manera de usar los métodos moleculares es analizar a la población microbiana directamente en la muestra de la que provienen. Para determinar la diversidad de microorganismos presentes y monitorear la evolución de las poblaciones microbianas en los alimentos, se han desarrollado métodos independientes de cultivo. Estos métodos están dirigidos a la obtención tanto cualitativa como cuantitativa de una comunidad microbiana sin la necesidad de aislar y cultivar a cada organismo presente, es por ello que son llamados métodos independientes de cultivo o métodos directos (Hierro *et al.*, 2006).

Los métodos directos tienen dos ventajas principales: Se pueden identificar microorganismos viables pero no cultivables y son métodos mucho más rápidos, sin embargo la mayor desventaja de estos, es la incapacidad de diferenciar a los microorganismos viables de los que ya no lo son, debido a que el DNA o RNA permanecen estables aún después de la muerte del microorganismo (Giraffa, 2004; Hierro *et al.*, 2006).



Para verificar la estabilidad del material genético, Hierro y cols. (2006), estudiaron la resistencia del RNA ribosomal y DNA al calentamiento. Suspendieron un cultivo de *S. cerevisiae* (10^5 UFC mL⁻¹) que posteriormente calentaron en un baño de agua a 60°C por 20 minutos y se le dio seguimiento al gen 26S DNA ribosomal y RNA ribosomal, tomando muestras a los 10 minutos de haber iniciado el tratamiento, al finalizarlo, y durante un subsecuente plaqueo e incubación a 25°C por 24 horas (después de 30 minutos, y después de 1, 12 y 24 horas). Se encontró que tanto el RNAr y DNAr persistieron por más de 1 día; lo que indica la resistencia de éstas moléculas a la degradación y la dificultad que representaría intentar diferenciar entre microorganismos muertos y viables con ellas.

En general los métodos moleculares dan información sobre la cantidad y la identidad de los organismos presentes en una muestra, con ellos podemos obtener el género o especie, e incluso se puede conocer hasta la cepa específica de cada organismo estudiado. Estos métodos son de gran ayuda debido a su rapidez y confiabilidad, es por eso que su utilización se ha difundido tanto.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica que desarrolló, en 1986, el Dr. Kary Mullis, y por la cual se le otorgó el Premio Nobel de Química en el año 1993 (Nobelprize.org, 2012).

La PCR es una técnica *in vitro* cuyo objetivo es amplificar un fragmento específico del genoma; el procedimiento se inicia con cantidades muy pequeñas de DNA blanco y se obtienen, en relativamente poco tiempo, millones de copias que pueden ser ahora estudiadas con facilidad (Tortora, 2009; Passarge, 2010).



La PCR es una reacción en cadena que se repite de 30 a 40 veces. En cada ciclo suceden tres reacciones que dependen de la temperatura y el tiempo para llevarse a cabo (Hierro *et al.*, 2004; Arroyo-López *et al.*, 2006; Chavan *et al.*, 2009) (**Figura 4.8**).

1. Desnaturalización:

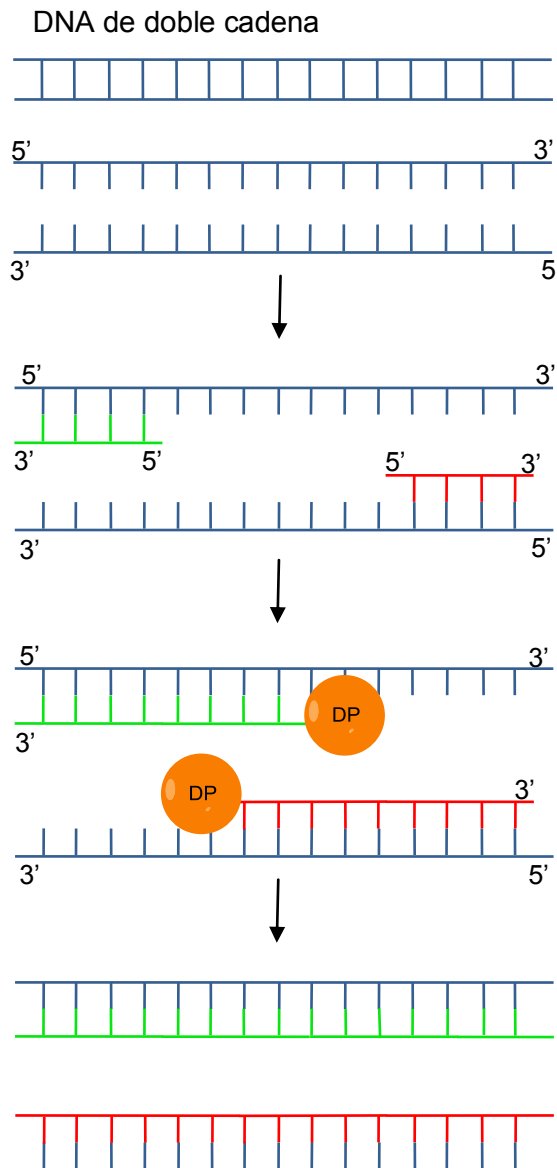
Se inicia al calentar la mezcla de reacción entre 94-98°C, a esta temperatura los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura de doble cadena del DNA se rompen, por lo que se separan las hebras dejando expuestos los nucleótidos que las forman. Así resultan dos cadenas sencillas que servirán de molde para la síntesis del DNA *de novo*.

2. Alineamiento:

Ahora la temperatura debe reducirse entre 45-60°C, con esto los cebadores reconocen a la hebra molde de DNA. Cada cebador se añade a la cadena sencilla por complementariedad con las bases expuestas en lugares específicos del genoma.

3. Polimerización o Extensión:

En este paso la temperatura se eleva nuevamente, llevándose hasta 72°C, que es la temperatura óptima para que la enzima Taq Polimerasa actúe. La DNA polimerasa elonga cada cebador colocando dinucleótidos trifosfato (dNTP's) de 5' a 3', y de esta manera se va sintetizando la nueva cadena de DNA.



PCR 30 a 40 ciclos en 3 pasos:

1. Desnaturalización: 94 -97°C

2. Alineamiento de los cebadores:
50-60°C

3. Extensión con la DNA
Polimerasa (DP) : 72°C

✓ Dos cadenas de DNA
sintetizadas de novo

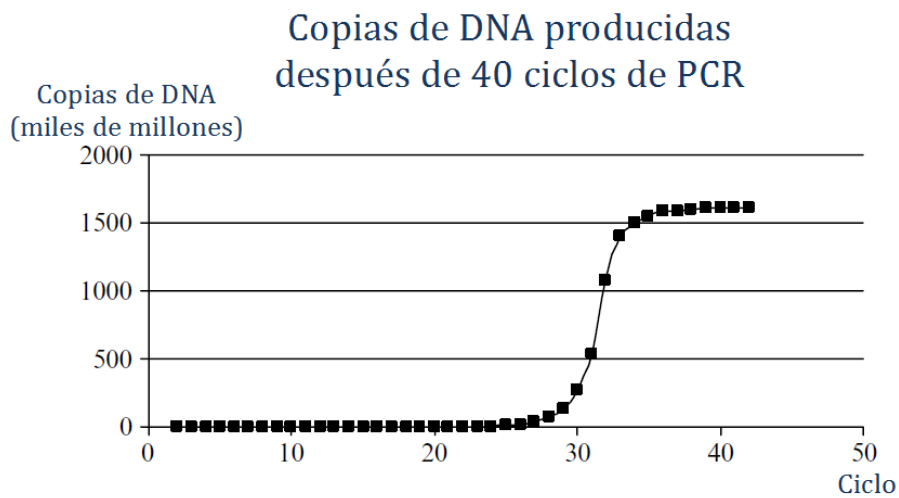
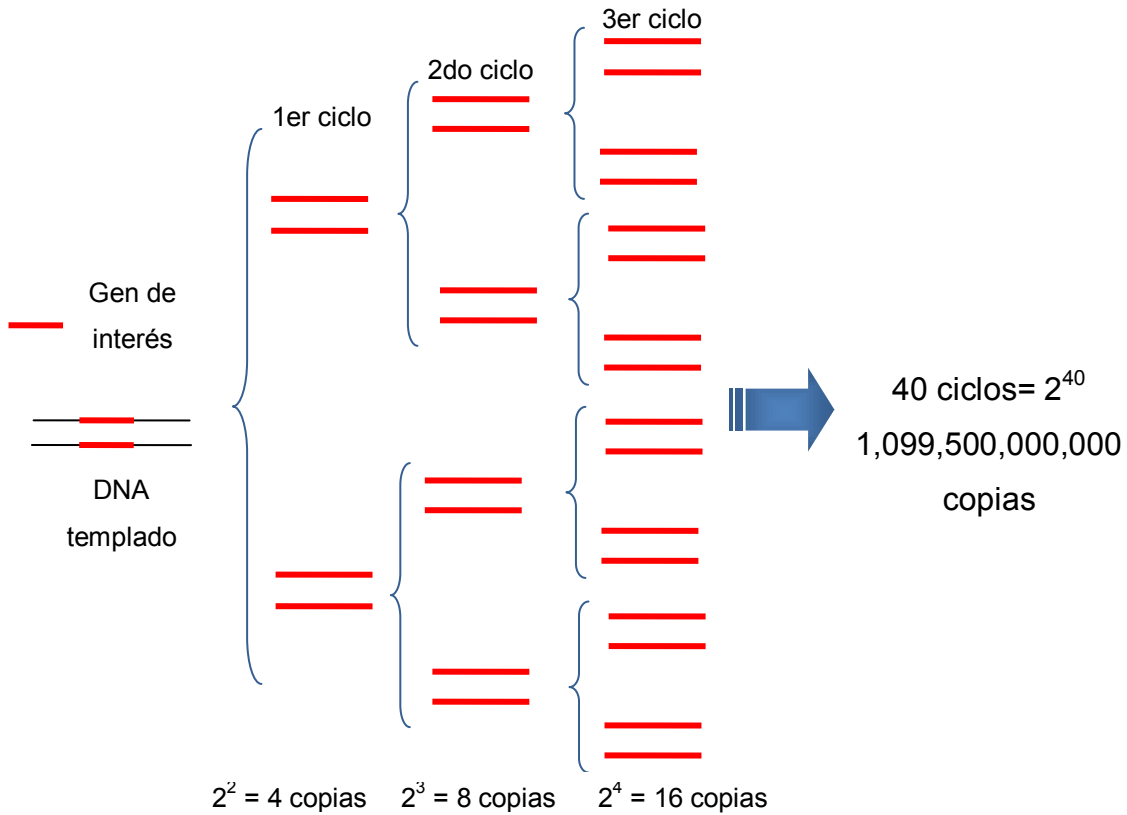
Figura 4.8 Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa

Adaptado de Fairchild *et al.*, 2006.

Después de cada ciclo de síntesis el DNA se calienta para convertir todo el DNA sintetizado de *novo* en cadenas sencillas. A su vez, cada cadena de DNA recién sintetizada será empleada para repetir el ciclo. Como resultado, el proceso



sigue una curva de crecimiento exponencial hasta que se agota alguno de los componentes de la reacción (**Figuras 4.9 y 4.10**) (Tortora, 2009; Brown, 2008).



Figuras 4.9 y 4.10 Crecimiento exponencial de las copias de DNA en la PCR
Adaptado de Fairchild *et al.*, 2006.



Para la replicación del DNA se utilizó en un inicio la DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima tiene el inconveniente de que se desactiva debido a las altas temperaturas a las que se lleva a cabo la reacción, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. El descubrimiento de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales junto a geissers a 75°C, la cual tiene una DNA polimerasa que funciona muy bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C, supuso un gran avance, ya que sólo tenía que ser añadida al principio y se mantenía activa durante todo el proceso. Esto junto con el diseño de los termocicladores o aparatos que consisten en bloques que pueden ser programados para calentarse y enfriarse rápidamente en determinados tiempos, condujo a la automatización total del proceso (Saiki *et al.*, 1988; Bertrand *et al.*, 1989; Wittbrodt y Erhardt, 1989).

Para llevar a cabo la reacción de PCR se requiere de un diseño cuidadoso y de una idea clara de lo que se busca, ya que se puede efectuar la reacción variando diversos factores como las temperaturas y tiempos de alineamiento, asimismo se puede elegir entre distintos cebadores o diseñar los propios en caso de no encontrar cebadores adecuados, también se puede optar por diferentes polimerasas que varían en sus temperaturas óptimas de actividad y en la fidelidad con la que polimerizan las nuevas cadenas de DNA, todo esto para tener éxito en la aplicación del método (Andrade, 2006).

Las dos principales limitaciones del uso de PCR son que es un método cualitativo (sólo proporciona presencia o ausencia de información) y no se puede diferenciar entre los microorganismos viables y no viables; además las reacciones de PCR son particularmente susceptibles a la contaminación por DNA externo (Sanchez, 2006).

Este método puede ser usado para identificación cuando se utilizan cebadores específicos para especie o género, sin embargo, es más usado como



un punto de partida para diferentes métodos moleculares, como se verá a continuación.

4.2.1 Métodos dependientes de cultivo (Métodos indirectos)

Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Esta técnica es una variación de la técnica de PCR convencional, ya que permite amplificar y cuantificar simultáneamente el DNA amplificado de las células que se encuentran presentes al inicio de la prueba, sin necesidad de ninguna acción posterior. Se basa en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente, el cual incrementa su señal proporcionalmente a la cantidad de DNA amplificado (Tessonnière *et al.*, 2009).

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa o PCR en tiempo real los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes, como SYBR Green, y sondas específicas marcadas con fluoróforo, como TaqMan (**Figura 4.11**) (Costa, 2004; Postollec *et al.*, 2011).

Los ensayos de QPCR con SYBR Green son sencillos, el colorante se une a cada copia nueva de doble cadena producida y al hacerlo aumenta su fluorescencia. Por lo que la cantidad de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena originada. SYBR Green no es específico para cada secuencia por lo que puede ser utilizada para ensayos con diferentes genes,



es flexible, barato y se pueden obtener resultados precisos al validarlos con la curva de disociación (Wong y Medarno, 2005; Ivey y Phister, 2011; Postollec *et al.*, 2011).

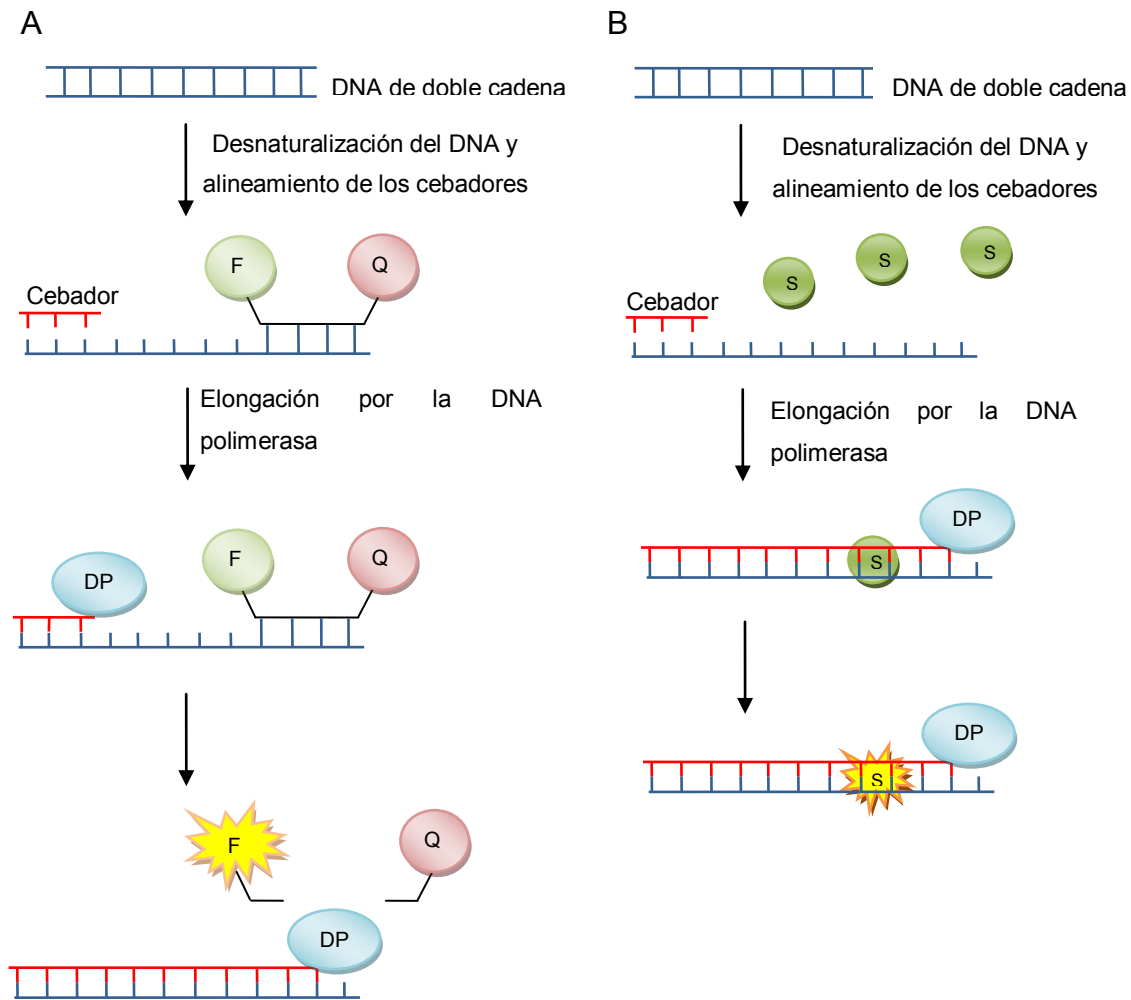


Figura 4.11 Diagrama de los tipos de sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real. Adaptado de Ivey y Phister, 2011.

El ensayo empleando TaqMan es más caro, pero la presencia de la sonda de hidrólisis garantiza que sean medidos solo amplicones específicos. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente en el extremo 5' y otra molécula que



inhibe esta fluorescencia llamada “quencher” o “apagador” en el extremo 3’, de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del apagador y emite fluorescencia. Sin embargo, para que sea válida esta técnica se requiere realizar una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de DNA que se está amplificando (Wong y Medrano, 2005; Postollec *et al.*, 2011).

Cuando la sonda está intacta, la proximidad del apagador al fluoróforo reduce la fluorescencia emitida por el reportero, si la secuencia diana está presente, la sonda hibrida entre los cebadores y como la DNA polimerasa alarga el fragmento de DNA, la sonda se degrada. Al ser digerida se libera el fluoróforo reportero del apagador y se genera la fluorescencia. La intensidad de fluorescencia producida en cada ciclo, es proporcional a la cantidad de amplicón producido. En general, la sonda se diseña para una región específica entre los dos cebadores, con lo que la sonda se utilizará para un microorganismo en concreto (Wong y Medrano, 2005; Ivey y Phister 2011).

Las ventajas de esta técnica son su rapidez, sensibilidad y alta especificidad, asimismo permite la detección de poblaciones con cuentas bajas, incluso en ausencia de un medio de enriquecimiento selectivo y en presencia de otras poblaciones dominantes, tiene un nivel de detección de hasta una célula por mililitro. Además no se necesita de otra técnica para cuantificar, por lo que reduce los tiempos de análisis. Incluso permite la detección de células viables pero no cultivables. La posibilidad de seguir el crecimiento y la actividad de las poblaciones microbianas en tiempo real y en entornos complejos, como las bebidas fermentadas, son de gran ayuda para controlar procesos industriales (Derveaux *et al.*, 2010; Zott *et al.*, 2010; Postollec *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

La principal desventaja es la obtención de falsos positivos por contaminación cruzada, es por ello que se pone especial énfasis en el diseño de los cebadores así como en la temperatura de alineación; ya que de ello depende



la especificidad de la técnica. Otro problema común es la insuficiente amplificación de DNA debido a la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras, como taninos, polisacáridos y pigmentos, que pueden llevar a un aislamiento pobre de DNA o a una baja amplificación produciendo falsos negativos. Aunado a eso se puede sobreestimar la biomasa viable contenida en la muestra debido a que el DNA es más estable que el RNA y éste puede persistir en la muestra mucho tiempo después de que el microorganismo muere (Hierro *et al.*, 2006; Tessonnière *et al.*, 2009; Le Dréan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Concretamente en la identificación de levaduras en el vino, el principal uso que se le ha dado a esta técnica es para la detección y cuantificación de levaduras contaminantes que le otorgan al vino características desagradables. Por ejemplo, la primer aplicación del QPCR en vino fue para la detección de *Dekkera bruxellensis* ó *Brettanomyces bruxellensis*. El método resultó de gran utilidad ya que su ventaja principal fue la rapidez de detección y cuantificación (3 horas) y la especificidad de la reacción con los primers elegidos (DBRUXF 5'-GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC-3' y DBRUXR 5'-GAAGGGCCACATTCACGAACCCCG-3') (Phister y Mills, 2003; Ivey y Phister, 2011).

Por otro lado Puig y cols. (2011), llevaron a cabo un estudio similar para la detección de *Brettanomyces bruxellensis* en vinos españoles. Con el kit comercial VINEO® realizaron la detección de esta levadura en 86 vinos tintos para comprobar su efectividad al compararlo con una cuenta tradicional de levaduras mediante siembra en el medio selectivo *Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium (DBM) (6.7 g L⁻¹ del medio Yeast Nitrogen Base (Difco), etanol (6% V/V), 10 mg L⁻¹ cicloheximida, 100 mg L⁻¹ ácido cumárico, 22 mg L⁻¹ de verde de bromocresol y 20 g L⁻¹) (Puig *et al.*, 2010).

Los resultados mostraron que el 17.4% de las muestras (15 muestras) dieron positivo a la presencia de *B. bruxellensis* por el sembrado tradicional



después de 5 a 7 días de incubación con un rango entre 1.2×10^1 UFC/mL y 3.4×10^4 UFC/mL mientras que el 16.3% (14 muestras) también arrojaron resultados positivos con el análisis de PCR cuantitativo en un rango entre 2.0×10^0 y 8.3×10^3 , sólo después de 7 horas de análisis. Lo que se concluye es que si bien ambos métodos llegan a cuantificar la presencia de la levadura, las diferencias entre uno y otro son muy evidentes; la discrepancia más marcada es el tiempo que necesita cada una de las pruebas, además de la diferencia en la cuantificación, ya que se obtuvo un conteo mayor de levaduras por el método de cuenta en placa, lo que se atribuyó a la obtención de falsos positivos producidos por bacterias resistentes a cicloheximida (Puig *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2001).

Actualmente, QPCR se considera el método más usado para detectar, identificar y cuantificar tanto patógenos como microorganismos benéficos, en la **tabla 4.2** se mencionan diversos artículos en los que se ha usado esta técnica para identificar y cuantificar levaduras en el vino (Salinas *et al.*, 2009; Taniguchi *et al.*, 2009; Le Dréan *et al.*, 2010; Postollec *et al.*, 2011).

Tabla 4.2 Cuantificación de levaduras presentes en vino mediante QPCR.

Especie	Muestra	Referencia
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	En vinos embotellados y en la etapa final de la fermentación.	Phister y y Mills, 2003 Delaherche <i>et al.</i> , 2004 Hierro <i>et al.</i> , 2006 Tessonnière, 2009 Benito <i>et al.</i> , 2009 Puig <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida zemplinina</i> <i>stellata</i> <i>sake</i>	Vino en proceso de maceración	Hierro <i>et al.</i> , 2006 Andorrà <i>et al.</i> , 2010 Zott <i>et al.</i> , 2010
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Vino en proceso de maceración	Hierro <i>et al.</i> , 2006 Andorrà <i>et al.</i> , 2010 Zott <i>et al.</i> , 2010



Tabla 4.2 Continuación

Especie	Muestra	Referencia
<i>Issatchenkia</i>	Mosto	Hierro <i>et al.</i> , 2006
<i>orientalis</i>		Zott <i>et al.</i> , 2010
<i>terrícola</i>		
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mosto	Zott <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccharomyces</i>	Final de la fermentación	Martorell <i>et al.</i> , 2005
<i>cerevisiae</i>	y vinos embottellados	Hierro <i>et al.</i> , 2006
<i>bayanus</i>		Salinas <i>et al.</i> , 2009
<i>ludwigii</i>		Andorrà <i>et al.</i> , 2010
<i>pombe</i>		Zott <i>et al.</i> , 2010
<i>Torulaspora</i>	Mosto, vino.	Hierro <i>et al.</i> , 2006
<i>Delbrueckii</i>		Zott <i>et al.</i> , 2010
<i>Zygosaccharomyces</i>	Vinos embotellados	Hierro <i>et al.</i> , 2006
<i>bailii</i>		Rawsthorne y Phister,
<i>rouxii</i>		2006 y 2009

Restricción de Fragmentos Polimórficos

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Es una técnica molecular con la que se obtiene un patrón de bandas conocidas como “huellas digitales”, “huellas génicas” o “fingerprinting” (del inglés), las cuales muestran la diversidad genética de una comunidad microbiana (Biondi *et al.*, 2008).

Es un método muy usado, las especies de levaduras más comunes involucradas en las fermentaciones se pueden identificar por el tamaño y polimorfismo de los fragmentos de restricción del espaciador interno transcrito,

mejor conocido como la región ITS, por sus siglas en inglés (Biondi *et al.*, 2008; Sipiczki, 2004).

Los genes ribosómicos (5.8S, 18S y 26S) se agrupan uno tras otro formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces (**Figura 4.12**). En cada unidad de transcripción existen otras dos regiones, los espaciadores internos (ITS) y los externos (ETS), que se transcriben pero no son procesadas y no forman parte de la molécula de RNAr final. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos NTS. El gen 5S no se incluye en la unidad de transcripción previamente descrita pero aparece en la misma unidad de repetición en el caso de las levaduras. Los genes ribosómicos 5.8S, 18S y 26S así como los espaciadores ITS y NTS constituyen poderosas herramientas para el establecimiento de las relaciones filogenéticas y la identificación de especies por contener secuencias conservadas, así como una evolución concertada. Esto significa que la similitud entre las unidades de transcripción repetidas es mayor dentro de la misma especie (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Beh *et al.*, 2006; Ivey y Phister)

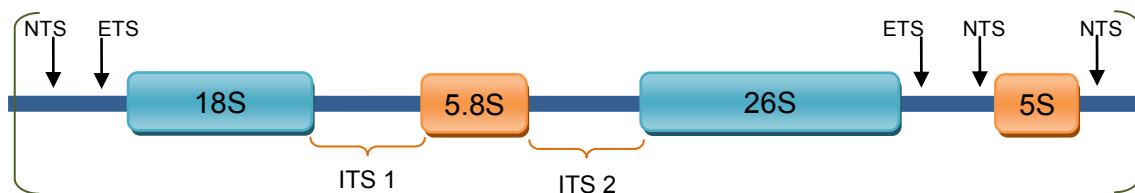


Figura 4.12 Representación esquemática de la organización de los genes ribosomales

Adaptado de Beh *et al.*, 2006.

El RFLP consiste en la diferenciación de los microorganismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en sitios específicos del genoma cuando el DNA blanco es aislado y digerido por enzimas de restricción. Estas



enzimas degradan el DNA cromosomal en pequeños fragmentos de longitud definida, estos fragmentos se amplifican mediante PCR y posteriormente con una electroforesis en gel los fragmentos son separados de acuerdo a su tamaño generando un patrón de bandeado específico para cada cepa (**Figura 4.13**) (Ferrand, 2007; Cova, 2010; Ivey y Phister, 2011; Tofalo *et al.*, 2012).

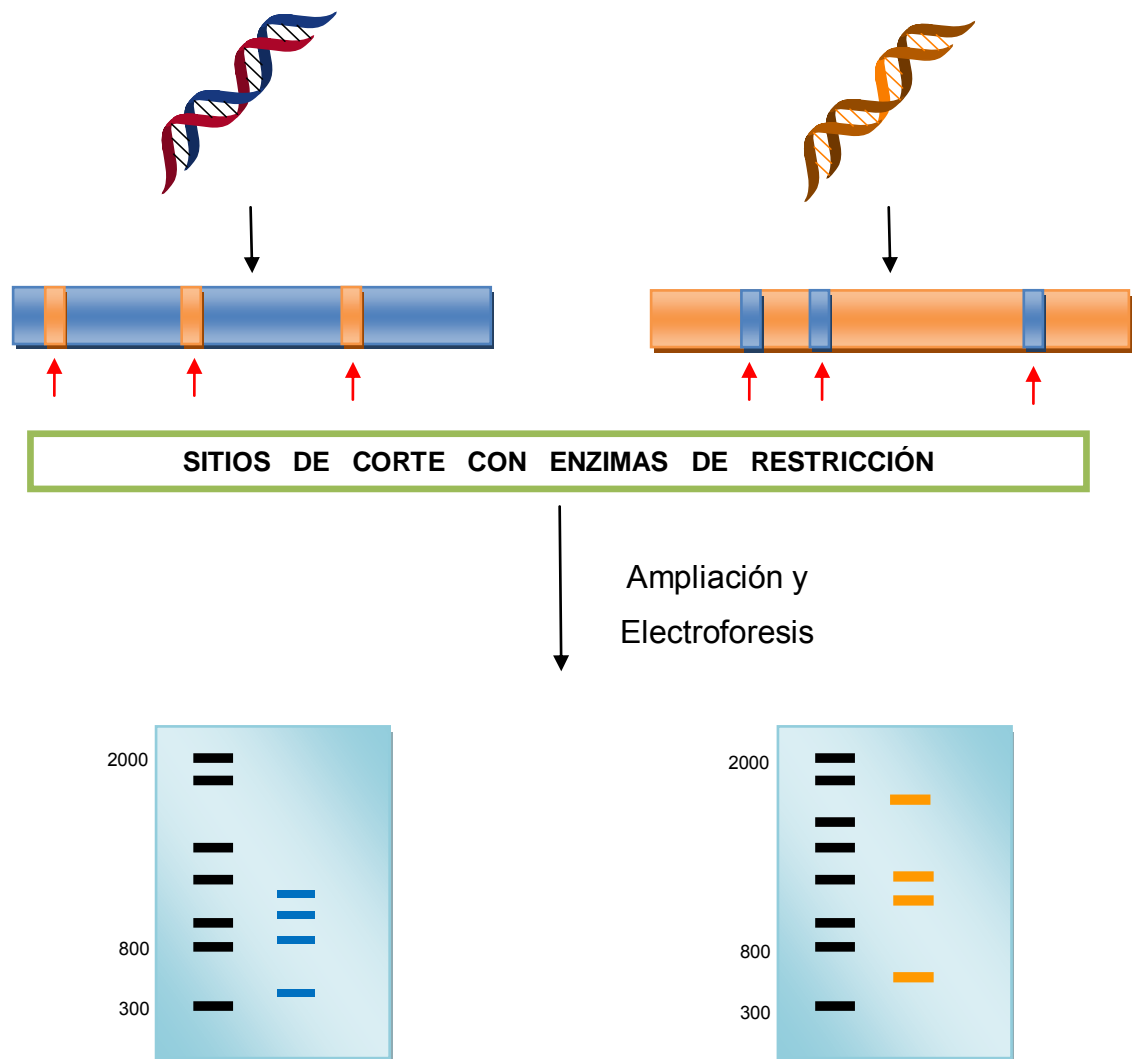


Figura 4.13 Fundamento teórico de la técnica de RFLP

Adaptado de Andrade, 2006.



Estos fragmentos se forman debido a que los organismos de diferentes géneros y especies, difieren en la distancia de los sitios de corte para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones tanto entre géneros como entre especies; y las diferencias encontradas en patrones de bandeo únicos permiten la identificación de cada microorganismo (Beh *et al.*, 2006; Ferrand, 2007; Cova, 2010; Ivey y Phister, 2011; Tofalo *et al.*, 2012).

Generalmente se necesita más de una enzima de restricción para lograr una identificación inequívoca. Algunas de las enzimas de restricción más usadas son: *Cfo I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Hpa II*, *Scr FI*, *Taq I*, *Nde II*, *Dde I*, *Dra I* y *Mbo II* (Beh *et al.*, 2006).

El método RFLP de la región ITS ha sido descrito como una herramienta muy útil para la identificación de levaduras, ya que la región ITS es una secuencia de RNA no funcional, es decir, es una región no codificante, y muestra una gran variabilidad entre cepas; lo que es muy útil en la identificación genómica (Granchi *et al.*, 1999).

La variabilidad genética de esta particular región se debe a la presencia de RNA de transferencia dentro de la región y a que la tasa de mutaciones del ITS es más alta que la de los genes ribosomales, lo que provoca un alto grado de variación incluso entre especies estrechamente relacionadas (Biondi *et al.*, 2008; Sipiczki, 2004).

La región ITS-5.8S que se encuentra entre los genes 18S y 26S RNA ribosomal es una secuencia altamente conservada de genes ribosomales de RNA. Debido a que esta región es conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica, además de ser codificante, permite el uso de cebadores universales para levaduras, lo que es de gran utilidad cuando diferentes especies



de levaduras están presentes al mismo tiempo, como sucede en las fermentaciones (Granchi *et al.*, 1999).

En particular, el análisis de restricción de la región ITS-5.8S se ha empleado para identificar a distintas especies de levaduras; ya que las secuencias más conservadas son útiles para la clasificación de altos niveles taxonómicos, como el género, y las regiones ITS variables son utilizadas para identificar a nivel especie (Granchi *et al.*, 1999).

Las ventajas de este método son su alta reproducibilidad, la rapidez de identificación y su resolución, ya que dependiendo de la enzima de restricción que se utilice se pueden hacer identificaciones hasta nivel de subespecie. Otra ventaja que ofrece el uso de la región ITS es que debido al alto número de copias de genes de RNA ribosomal que contiene es muy fácil y rápida de amplificar (Andrade, 2006; Biondi *et al.*, 2008).

Las endonucleasas de restricción más usadas para el análisis por RFLP de la región ITS-5.8S son *Hinfl*, *CfoI* y *HaeIII*, que generan patrones de bandeo específicos para cada especie, lo cual es muy útil para identificar un gran número de levaduras; sin embargo, en especies que son muy cercanas o que están muy relacionadas genéticamente las diferencias no son muy notables (Sipiczki, 2004; Cova, 2010).

Sipiczki y cols. (2004) se enfocaron en las cepas de levaduras aisladas de uvas y mostos recolectados en distintas zonas del mundo como Hungría, Eslovaquia, Holanda y California. El objetivo fue diferenciar las especies *Candida zemplinina* y *Candida stellata*. Diferentes estudios taxonómicos han revelado que *C. stellata* se confunde fácilmente con la especie *C. zemplinina*, ya que están estrechamente relacionadas.



La gran capacidad de *C. stellata* para tolerar el etanol, altas concentraciones de azúcar y su habilidad de crecer a bajas temperaturas contribuyen a su presencia durante la fermentación de las uvas para la formación del vino. Los métodos taxonómicos tradicionales han dado resultados heterogéneos y poco convincentes, debido a que se ha observado una gran variabilidad en la secuencia de la región cromosomal codificante del RNA ribosomal. La comparación de las diferencias en la secuencia del gen 26S DNA ribosomal en cepas de *C. stellata*, ayudaron a establecer una nueva especie: *Candida zemplinina* (Sipiczki *et al.*, 2004).

De igual manera se observó que las enzimas *Hinfl*, *CfoI* y *HaeIII* producen patrones idénticos para estas dos especies, por lo que su identificación es prácticamente imposible con estas enzimas. Se encontró que para lograr obtener patrones específicos para cada especie y así poder diferenciarlas se necesitan las enzimas de restricción *MboI* y *DraI* (Sipiczki *et al.*, 2004).

Por otro lado, Ocón y cols. (2010), realizaron un estudio en el que analizaron la presencia de diferentes levaduras en cuatro viñedos en Rioja, España por medio de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de levaduras del género *Saccharomyces* a través de la de la región ITS del DNA ribosomal. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la presencia de levaduras diferentes a *Saccharomyces* en los viñedos es superior a la de *S. cerevisiae*, con porcentajes superiores al 60% en todas las muestras analizadas.

También se observó que la cantidad y tipo de levaduras presentes en las uvas están relacionadas directamente con el producto o los productos utilizados para la limpieza de las mismas; señalaron que la limpieza de las bodegas antes de la recepción de las uvas no elimina completamente a las levaduras presentes, por lo que éstas posteriormente pueden convertirse en parte del proceso de vinificación (Ocón *et al.*, 2010).



En la **tabla 4.3** se mencionan diversos artículos en los que se ha usado esta técnica para identificar diferentes levaduras en el vino.

Tabla 4.3 Identificación de levaduras presentes en vino mediante RFLP

Género y especie	Especificaciones del método	Referencia
<i>Debaromyces hansenii</i>	Región ITS1-5.8S-ITS2	Guillamón <i>et al.</i> , 1998.
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Primers: ITS1 e ITS4	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 1999.
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Enzimas: <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i> ,	Ganga y Martínez, 2004.
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>MaeI</i>	Morrissey <i>et al.</i> , 2004.
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>		Antunovics <i>et al.</i> , 2005.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		Combina <i>et al.</i> , 2005.
<i>Pichia membranifaciens</i>		Zott <i>et al.</i> , 2008.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Sun <i>et al.</i> , 2009.
<i>Torulaspota delbrueckii</i>		Ocón <i>et al.</i> , 2010.
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>		
<i>Candida stellata</i>	Región:ITS1-5.8S-ITS2	Granchi <i>et al.</i> ,1999.
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Primers: ITS1 e ITS4	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 2001.
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Enzimas: <i>CfoI</i> , <i>Hae III</i> ,	Cadez <i>et al.</i> , 2003.
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>HinfI</i> , <i>DdeI</i> , <i>MboI</i> , <i>DraI</i>	Clemente-Jimenez <i>et al.</i> , 2004.
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>		Rodríguez <i>et al.</i> , 2004.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		Sipiczki, 2004.
<i>P. guilliermondii / membranifaciens</i>		
<i>Saccharomyces bayanus/ cerevisiae/ ludwigii</i>		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Torulaspota delbrueckii</i>		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		
<i>C. stellata</i>	Región:18S rRNA	Capece <i>et al.</i> , 2003.
<i>M. pulcherrima</i>	Primers: p108 y M3989	
<i>K. apiculata</i>	Enzimas: <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i>	
<i>S. pombe</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	Región:18S rRNA-ITS1	Dlauchy <i>et al.</i> , 1999.
<i>S. paradoxus</i>	Primers: NS1 e ITS2	Redzepovic <i>et al.</i> , 2002.
	Enzimas: <i>AluI</i> , <i>Hae III</i> ,	
	<i>MspI</i> y <i>RsaI</i>	



Tabla 4.3 Continuación

Género y especie	Especificaciones del método	Referencia
<i>C. stellata/oleophila</i>	Región: 26S rRNA	Van Keulen et al., 2003
<i>S. bayanus</i>	Primers: NL1 y NL4	
<i>S. cerevisiae</i>	Enzimas: <i>AluI</i>	
<i>T. delbrueckii</i>		
<i>Candida stellata</i>	Región: 26S rRNA	Baleiras Couto et al., 2005
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Primers: NL1 y LRS	
<i>Pichia kluyveri</i>	Enzimas: <i>ApaI, HinfI, MseI</i>	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>		
<i>Issatchenkia terricola</i>		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Issatchenkia occidentalis</i>		
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	Región: MET2	<i>Demuyter et al. (2004)</i>
<i>S. uvarum</i>	Primers: <i>EcoRI, PstI</i>	

Amplificación de Fragmentos Polimórficos

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Esta técnica fue desarrollada por Vos *et al.*, en 1995, y combina elementos de RFLP y PCR. El AFLP se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de la digestión del DNA genómico mediante PCR (de Barros Lopes *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Primero, el DNA blanco se corta con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente y otra de corte poco frecuente, esto produce un juego de fragmentos de restricción a los que se les unen oligonucleótidos de 17 a 21pb llamados “adaptadores”, los cuales tienen extremos compatibles con las enzimas



de restricción. Finalmente los fragmentos con los adaptadores se amplifican a través de la técnica de PCR (Vos *et al.*, 1995) (**Figura 4.14**).

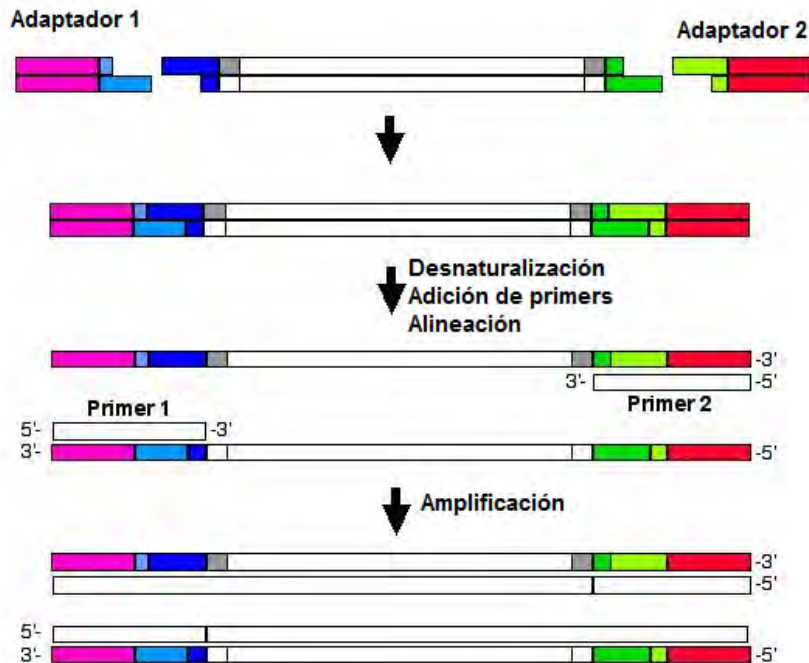


Figura 4.14 Representación esquemática de la técnica de AFLP
<http://insilico.ehu.es/AFLP/afp3.jpg>

Dependiendo de la complementariedad del cebador con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. Para interpretar los resultados, los fragmentos se separan en geles de poliacrilamida de tipo desnaturizante y se generan numerosos fragmentos en una sola reacción, de esta manera con esta técnica se obtienen perfiles muy específicos que permiten la diferenciación a nivel de cepa sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad, además que es una técnica muy reproducible (Vos *et al.*, 1995; Flores-Berrios *et al.*, 2005; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2010).

Los adaptadores para AFLP constan de una secuencia básica y una secuencia específica para la enzima (extremos cohesivos); mientras que los primers constan de tres partes, una secuencia básica (CORE), una secuencia



específica para la enzima (ENZ) y una extensión selectiva (EXT). Los oligonucleótidos más usados en ésta técnica como adaptadores y primers son *EcoRI* y *MseI* que se muestran en la **tabla 4.4**. (Vos *et al.*, 1995; Flores-Berrios *et al.*, 2005; Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Lopandic *et al.*, 2008; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2010).

Tabla 4.4 Secuencias de *EcoRI* y *MseI*

	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
Secuencia	5'-GAATTC-3'	5'-TTAA-3'
Adaptador	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'
Primer	CORE ENZ EXT 5'-GACTGCGTACC AATTC NNN-3'	CORE ENZ EXT 5'-GATGAGTCCTGAG TAA NNN-3'

Adaptado de Vos *et al.*, 1995

El AFLP es una técnica muy útil para discriminar entre las levaduras a nivel intraespecie, además de ser muy reproducible, necesitar pequeñas cantidades de DNA y tiene de la posibilidad de crear una base de datos con todos los electroferogramas generados; no obstante, tiene el inconveniente de ser una técnica muy laboriosa, ya que requiere secuenciadores automáticos y los datos que se obtienen son difíciles de interpretar. Aunque la técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar bacterias, plantas y animales, en el caso de las levaduras los trabajos son muy escasos (Vos *et al.*, 1995; de Barros Lopes *et al.*, 1999; Flores-Berrios *et al.*, 2005; Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Lopandic *et al.*, 2008; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2010).

Lopandic y colaboradores (2007), estudiaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de vinos de cuatro regiones vitivinícolas de Austria para identificar las diferencias genómicas existentes entre ellas y evaluar la influencia de estas en la formación del sabor del vino. El ensayo por AFLP mostró que las



levaduras si presentaron diferencias en su genoma y se concentraron en cuatro grupos que correspondieron con su origen geográfico, además se encontraron notables contrastes entre los perfiles de aroma liberados por las levaduras de distintas localidades, como las concentraciones de diversos ácidos y alcoholes, pero las variaciones más notables se observaron entre los ésteres identificados. Por lo que se concluye que levaduras de distintas regiones producen diferentes metabolitos secundarios durante la fermentación (Lopandic *et al.*, 2008).

Sin embargo, Salinas y colaboradores (2010), estudiaron cepas comerciales de *S. cerevisiae* aisladas de vinos con el objetivo de diferenciar su genoma y estudiar los cambios genotípicos y fenotípicos que éstas presentaban a lo largo del proceso de fermentación del vino. Analizaron las cepas aisladas por AFLP y se encontraron con que este método no es lo suficientemente sensible para diferenciar estas cepas ya que se obtuvieron patrones de amplificación similares en todos los casos.

Lo anterior indica que en diferentes localidades las levaduras presentan patrones de AFLP únicos, mientras que para la misma localidad presentan patrones idénticos de AFLP, es decir que levaduras con distinto origen geográfico presentan diferencias más marcadas en su genoma (Lopandic *et al.*, 2008).

A continuación, en la **tabla 4.5** se mencionan diversos artículos en los que se ha usado esta técnica para identificar diferentes levaduras en el vino.



Tabla 4.5 Identificación de levaduras presentes en vino mediante AFLP

Género y especie	Especificaciones del método	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adaptadores: <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i>	de Barros Lopes <i>et al.</i> , 1999
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Primers: <i>EcoRI</i> , <i>MseI</i> , <i>EcoRI-A</i> , <i>EcoRI-AG</i> , <i>MseI-G</i> y <i>PstI-A</i> .	
<i>Saccharomyces bayanus</i>		de Barros Lopes <i>et al.</i> , 2002
<i>Saccharomyces pastorianus</i>		
<i>Saccharomyces unisporus</i>		
<i>Saccharomyces exiguus</i>		
<i>Saccharomyces kluyveri</i>		
<i>Dekkera anomala</i>		
<i>Dekkera bruxellensis</i>		
<i>Brettanomyces naardenensis</i>		
<i>Brettanomyces custersianus</i>		
<i>Brettanomyces nana</i>		
<i>Torulaspota delbrueckii</i>		
<i>Issatchenkia orientalis</i>		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		
<i>Pichia fermentans</i>		
<i>Pichia membranifaciens</i>		
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Adaptadores: <i>PstI</i> y <i>MseI</i>	Curtin <i>et al.</i> , 2007
<i>Dekkera anómala</i>	Primers: <i>MseI-C</i> y <i>PstI-AC</i> .	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Adaptadores: <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i>	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 2010
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Primers: <i>EcoRI</i> , <i>MseI-C</i>	
<i>Candida zemplinina</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Adaptadores: <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i> Primers: <i>EcoRI-A</i> , <i>MseI-C</i>	Spadaro <i>et al.</i> , 2008
<i>S. cerevisiae</i>	Adaptadores: <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i>	Flores-Berrios <i>et al.</i> , 2005
<i>S. bayanus</i>	Primers: <i>EcoRI-C/MseI-C</i> ,	
<i>S. paradoxus</i>	<i>EcoRI-C/MseI-G</i> ,	
<i>S. pastorianus</i>	<i>EcoRI-C/MseI-T</i> ,	
<i>Candida spp.</i>	<i>EcoRI-AC/MseI-G</i> ,	
<i>Kloeckera spp.</i>	<i>EcoRI-AC/MseI-C</i> , <i>EcoRI-C/MseI-A</i> .	
<i>S. cerevisiae</i> (27 cepas)	Adaptadores: <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i> Primers: <i>MseI-CTT/EcoRI-AC</i> , <i>MseI-CTT/EcoRI-AT</i> , <i>MseI-CAA/EcoRI-AC</i> , <i>MseI-CAA/EcoRI-AT</i> , <i>MseI-CT/EcoRI-T</i> , <i>MseI-CG/EcoRI-A</i> , <i>MseI-CC/EcoRI-A</i> , <i>MseI-CA/EcoRI-T</i> ,	Gallego <i>et al.</i> , 2005 Azumi y Goto-Yamamoto, 2001



Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La amplificación aleatoria de DNA polimórfico es un método que fue introducido por Williams y cols. (1990), ellos propusieron la detección de polimorfismos amplificando secuencias de DNA al azar utilizando cebadores cortos con secuencias arbitrarias (Baleiras *et al.*, 1994; Cova, 2010).

RAPD es una de las técnicas más utilizadas para identificación de levaduras, ésta consiste en amplificar de manera aleatoria el DNA del microorganismo que se desea estudiar. Una de sus principales características es que para la amplificación se utiliza solamente un oligonucleótido o cebador corto, de aproximadamente 10 pb, con secuencias elegidas al azar, los más comúnmente usados son los primers OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA-03 (5'-AGTCAGCCAG-3') y OPA-09 (5'-GGGTAACGCC-3') (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA), además del primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), aunque este último es usado más comúnmente para el estudio de bacterias. Las bajas temperaturas (37°C) a las que se llevan a cabo los alineamientos promueve que el cebador se una a sitios inespecíficos y aleatorios en lugares diferentes del genoma, lo cual permite la amplificación de fragmentos polimórficos del DNA. De este modo se obtienen productos de amplificación con diferentes pesos moleculares que forman un perfil único para cada cepa, estos fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa y se observa el patrón de bandeo característico con el que es posible identificar al microorganismo (Baleiras *et al.*, 1994; Cadez *et al.*, 2002; Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Urso *et al.*, 2008; Agnolucci *et al.*, 2009; Tofalo *et al.*, 2009).

Esta técnica es una alternativa rápida de identificación, no se necesita información previa de la secuencia para el diseño de los cebadores y permite analizar el genoma completo, es por esto que en este método se detecta un mayor



polimorfismo en comparación con otros métodos que sólo analizan una región, sin embargo su principal inconveniente es que los resultados son muy poco reproducibles, se requiere de una estandarización muy fina de las condiciones experimentales (reactivos y equipo) para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Además las bajas condiciones de especificidad promueven la formación de quimeras de PCR que pueden dar lugar a resultados erróneos (Tornai-Lehoczki *et al.*, 2000; Rossetti y Giraffa, 2005; Andrade, 2006; Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Este método ha sido muy usado para estudiar las levaduras presentes durante cada etapa de la fermentación y las diferentes cepas microbianas presentes en el vino, en la **tabla 4.6** se mencionan algunos artículos en los que se ha usado esta técnica para la identificación de diferentes levaduras en el vino.

Urso *et al.* (2008), utilizó RAPD-PCR para investigar la biodiversidad y dinámica de las levaduras durante la producción de un vino dulce Italiano. Evaluaron la capacidad de las cepas iniciadoras de *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo la fermentación, variando las condiciones del proceso. En ambas fermentaciones (B y F) se inoculó el mosto con un cultivo iniciador de *S. cerevisiae*. Antes de la inoculación, se agregaron 80 mg L⁻¹ de SO₂ en ambas muestras y sólo en F se clarificó el mosto con un tratamiento de enfriamiento a 4°C por 24 horas. La fermentación F se llevó a cabo a temperatura ambiente (15-20°C), mientras que la B se dio a bajas temperaturas (por debajo de 10°C).

Lo que encontraron fue que las cuentas de levaduras en los mostos fueron diferentes en dos órdenes de magnitud, entre 10⁶ y 10⁴ UFC mL⁻¹, para B y F respectivamente. Esto debido a la clarificación en frío que se realizó en el mosto de la fermentación F, lo que pudo resultar en la eliminación tanto de levaduras como de compuestos nutritivos para su desarrollo, se encontraron, aunque en bajas cuentas, varias especies de *Saccharomyces*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Debaryomyces*,



Zygosaccaromyces, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*, *Rhodospordium* y *Cryptococcus*. Sin embargo, después de la inoculación con el cultivo iniciador, en la muestra F sólo se pudieron identificar cepas de *S. cerevisiae* y se observó que la fermentación se llevó a cabo normalmente. A pesar de que la muestra B inició con una cuenta mayor de levaduras, no se logró una fermentación eficiente, esto debido a las bajas temperaturas a las que se sometió, además se encontraron varias especies diferentes a *Saccharomyces* en esta muestra al final de la fermentación, por lo que se concluye que estas cepas contribuyen solo a dar las características finales del vino y en menor medida a la fermentación de los azúcares (Urso *et al.*, 2008).

También Tofalo y cols. (2012), utilizaron RAPD para caracterizar genéticamente las cepas de *Candida zemplinina* aisladas de diferentes fuentes de interés enológico. La subtipificación fenotípica y genotípica, así como la caracterización enológica, se llevaron a cabo en 36 aislamientos de *C. zemplinina* de uvas, mostos y vinos de diferentes regiones de Italia. El estudio reveló una alta heterogeneidad genética. La biodiversidad dentro de las especies genéticas y fenotípicas de *C. zemplinina* dieron datos útiles para comprender el papel potencial de este microorganismo en la elaboración del vino. Esta investigación representa un primer paso para la selección de cepas de *C. zemplinina* para ser utilizadas como cultivos iniciales o en la inoculación secuencial con *S. cerevisiae* para mejorar la calidad y mejorar las características particulares de los vinos.

En otro estudio Cadez y colaboradores (2002), compararon tres métodos moleculares (RAPD, PFGE y RFLP) para la identificación precisa de las especies *Hanseniaspora* y *Kloeckera*, ellos encontraron que RAPD no fue útil para la discriminación entre géneros, sin embargo, lo consideraron muy útil para la diferenciación a nivel especie, esto es debido a que con el método RAPD los patrones de bandeo que forman la mayoría de las cepas pertenecientes a la misma especie logran diferenciarse.

**Tabla 4.6** Identificación de levaduras presentes en vino mediante RAPD

Levaduras aisladas de vino	Especificaciones del método	Referencia
<i>Dekkera bruxellensis</i> <i>Pichia guilliermondii</i>	Primers: OPA 2, OPA 3 y OPA 9	Martorell <i>et al.</i> , 2006.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Primers: OPA series B y C	Gallego <i>et al.</i> , 2005.
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Primers: OPA 2, OPA 3 y OPA 9	Agnolucci <i>et al.</i> , 2009.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Candida stellata</i> <i>Candida sorbosa</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> <i>Pichia toletana</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Primer: OPB15 (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) Secuencia: 5'-GGAGGGTGTT-3'	Cordero-Bueso <i>et al.</i> , 2011.
<i>Candida apícola</i> <i>Candida zemplinina</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Primer: M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3')	Tofalo <i>et al.</i> , 2009.
<i>Candida stellata</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Hanseniaspora occidentalis</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Issatchenkia terricola</i> <i>Candida diversa</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> 99% <i>Metchnikowia pulcherrima</i> <i>Saccharomycodes ludwigii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Dekkera bruxellensis</i>	Primer: XD5 (5'-CTGGCGGCTG-3')	Di Maro <i>et al.</i> , 2007.
<i>Pichia guilliermondii</i>	Primers: OPA 3, OPA 9, OPA 10 y OPA 16	Lopes <i>et al.</i> , 2009.



Electroforesis de campo pulsado

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Schuartz y Cantor introdujeron esta técnica en 1984; el primer paso consiste en aislar el DNA cromosomal intacto, para ello las células suspendidas se mezclan con agarosa fundida y quedan contenidas en pequeños bloques de agarosa, el resultado son insertos que contienen células de levaduras completas. Las levaduras embebidas se someten a una lisis y desproteización *in situ* lo que permite obtener finalmente el DNA inmovilizado en la matriz de agarosa (Izquierdo *et al.*, 1997; Herschleb *et al.*, 2007).

La electroforesis de campo pulsado es una técnica que hace posible la separación de grandes moléculas de DNA en geles de agarosa, utilizando alternadamente dos campos eléctricos. Los métodos de preparación convencional de DNA no son adecuados para el PFGE ya que la agitación mecánica genera fragmentos cortos de DNA, lo cual resulta inadecuado para la técnica. La resolución de esta técnica abarca tamaños de DNA desde 10kb hasta 10Mb, permitiendo el análisis del cromosoma completo de las levaduras (Nassonova, 2008).

La combinación de campos eléctricos opuestos crea dos direcciones distintas en las que viajan los cromosomas a través del gel, con esto se logra la separación de las moléculas. Al aplicar el primer campo eléctrico las moléculas de DNA son elongadas y comienzan a migrar a través del gel en la dirección que les marca este campo eléctrico, posteriormente el campo se suprime y se aplica un segundo campo eléctrico, el cual forma un ángulo obtuso con el primero; entonces las moléculas de DNA se reorientan y empiezan a migrar en dirección del segundo campo. Un ángulo obtuso es la reorientación necesaria para la separación óptima durante el PFGE, el también llamado ángulo de reorientación puede variar entre



110 y 180° dependiendo del equipo utilizado, sin embargo, un ángulo de 120° es suficiente para la mayoría de los experimentos (Herschleb *et al.*, 2007).

Existen diferentes sistemas para la electroforesis de campo pulsado (FIGE, CHEF, OFAGE, TAFE y RGE) (**Figura 4.15**), los cuales varían dependiendo de la forma geométrica que dibujan los electrodos, la homogeneidad y el método de reorientación de los campos eléctricos. Las principales diferencias entre estos sistemas son la capacidad de obtener líneas rectas, velocidad de separación, resolución dentro de un rango específico de tamaños y el tamaño de la proporción del gel que provee una separación útil (Nassonova, 2008).

En 1986 Carle y cols. propusieron utilizar una cámara horizontal estándar con dos electrodos paralelos de igual longitud y cambiar el ángulo de reorientación en 180° invirtiendo la polaridad del campo eléctrico aplicado. Este método fue llamado Electroforesis por Inversión de Campo, FIGE por sus siglas en inglés. La migración neta hacia delante se consigue aumentando la proporción de avance de los tiempos de pulso en 3:1 con respecto a la de retroceso. Su principal ventaja es la facilidad de uso del instrumento (cualquier cámara estándar para electroforesis es adecuada). Su desventaja principal es que no es adecuado para determinar el tamaño preciso del DNA (Carle *et al.*, 1986; Basim, 2001).

Chu *et al.*, (1986) desarrollaron un dispositivo para PFGE con un campo eléctrico homogéneo controlado, CHEF, por sus siglas en inglés. El sistema CHEF es el más utilizado de todos los sistemas de PFGE; ya que garantiza la separación más eficiente de las moléculas de DNA en una amplia gama de tamaños al tener 24 electrodos situados alrededor de un contorno hexagonal con potenciales homogéneos con lo que se logra un campo uniforme para que todos los carriles del gel logren correr y separarse adecuadamente (Chu *et al.*, 1986; Basim, 2001).

Aunque existen diferentes equipos para llevar a cabo la electroforesis en campo pulsado, FIGE y CHEF, son los más utilizados.

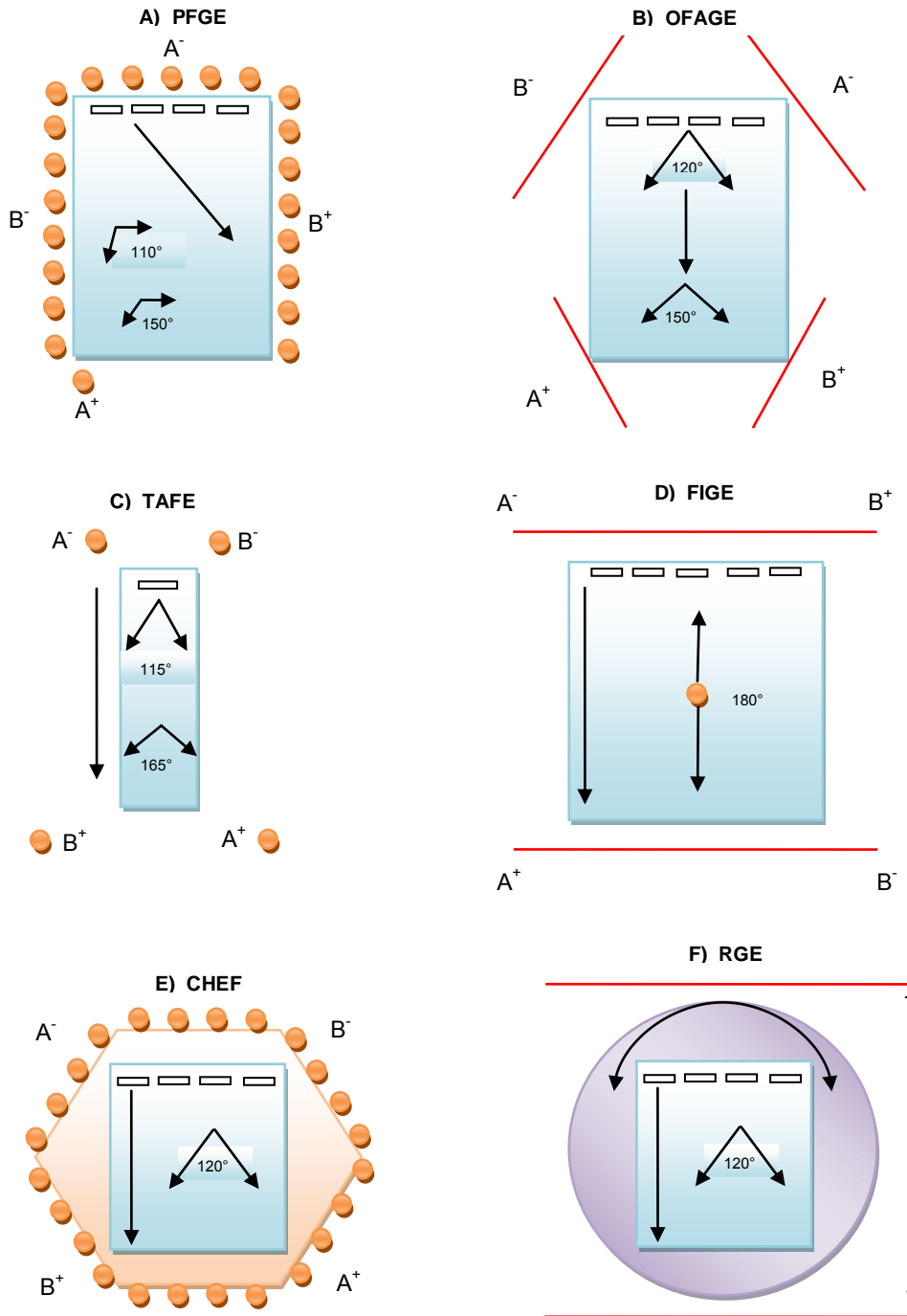


Figura 4.15 Diagramas de los equipos comúnmente utilizados para la electroforesis en campo pulsado

A) Electroforesis de gradiente en gel de campo pulsado (PFGE). B) Electroforesis en gel de campo alternado ortogonal (OFAGE). C) Electroforesis de campo alternado transversal (TAFE). D) Electroforesis en gel de campo invertido (FIGE). E) Electroforesis de campo eléctrico homogéneo en contorno cerrado (CHEF). F) Electroforesis en gel rotante (RGE). Flechas pequeñas: Indican los vectores de los campos eléctricos alternados, el ángulo de reorientación se indica al interior de cada diagrama. Los símbolos A⁺ B⁺ A⁻ y B⁻ indican la posición de los pares de electrodos de los campos alternados. ● Indican los electrodos en los sistemas PFGE, TAFE y CHEF. — Indican los electrodos en los sistemas: OFAGE, FIGE y RGE. (Adaptado de Nassonova, 2008).



La migración de las moléculas de DNA es proporcional a su tamaño, así las moléculas más grandes tardan más tiempo en reorientarse y se quedan por detrás de las más pequeñas. La resolución de las bandas obtenidas en el resultado depende de los intervalos de variación del campo eléctrico (pulsos), la concentración de agarosa, la temperatura a la cual se lleva a cabo el ensayo y el ángulo utilizado entre los diferentes campos eléctricos (Nassonova, 2008).

La electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad. Esta técnica de tipificación tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y conlleva mucho tiempo para su realización (la mayoría de los protocolos de trabajos requieren más de cuatro días para poder obtener y analizar los pulsotipos), por lo que su uso diario en el laboratorio es poco práctico. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de otros métodos de tipificación alternativos a la PFGE que sean más flexibles, rápidos, y menos laboriosos (Herschleb *et al.*, 2007; Nassonova, 2008).

Cadez y colaboradores (2002), compararon tres métodos moleculares (RAPD, PFGE y RFLP) para la identificación precisa de las especies *Hanseniaspora* y *Kloeckera*, ellos encontraron que con PFGE lograron dividir a los géneros *Hanseniaspora* y *Kloeckera* en cuatro subgrupos que comparten cariotipos similares. Las especies *H. vineae/H. osmophila* y *H. uvarum/H. guilliermondii* tuvieron cariotipos similares. Estas especies son generalmente muy difíciles de identificar por medios convencionales. Mediante el empleo de los tres métodos se logró la identificación inequívoca de las levaduras.

Miot-Sertier y Londvaud-Funel (2007), llevaron a cabo un estudio para identificar a *B. bruxellensis*. Se usó una endonucleasa de restricción (*NotI*) y el sistema Chef-DR® III (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francia) para llevar a cabo la prueba. Los resultados mostraron que los patrones de restricción obtenidos hicieron posible la distinción entre *B. bruxellensis* y las demás levaduras de estudio ya que se obtuvieron perfiles únicos para cada cepa. Por lo que se



concluye que PFGE es un método adecuado para la discriminación entre las levaduras presentes en el vino, sobre todo, en este caso, las levaduras perjudiciales.

En la siguiente tabla (**tabla 4.7**) se mencionan algunos artículos en los que se ha usado esta técnica para la identificación de diferentes levaduras en el vino.

Tabla 4.7 Identificación de levaduras presentes en vino mediante PFGE

Levaduras aisladas de vino	Especificaciones del método	Referencia
<i>Pichia anómala</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Issatchenkia terricola</i> <i>Candida valida</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	CHEF LKB-pulsaphor® (Farmacia LKB, Uppsala, Sweden). Electroforesis para <i>Saccharomyces</i> : Tiempo de cambio de los pulsos 60s por 15horas, 90s por 8h y 100s por 1h a 180V. Electroforesis para levaduras diferentes a <i>Saccharomyces</i> : Tiempo de cambio de los pulsos 150s por 24h, 300s por 24h y 600s por 20h a 100V.	Zagorc <i>et al.</i> , 2001 Povhe Jemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Chef-DR® III System (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Electroforesis: Tiempo de cambio de los pulsos 70 s por 15 h y 120 s por 11 h a 6 V.	Oelofse <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces uvarum</i> <i>S. paradoxus</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i>	CHEF Mapper System® (Bio-Rad, Richmond, California, USA) Electroforesis: Programa I: Tiempo de cambio de los pulsos inicio 70s, final 120s por 26h Programa II: Tiempo de cambio de los pulsos inicio 70s, final 120s por 24h Programa III: Tiempo de cambio de los pulsos inicio 70s, final 110s por 24h	Giudici <i>et al.</i> , 1998 Coloretti <i>et al.</i> , 2006



4.2.2 Métodos independientes de cultivo (Métodos Directos)

Electroforesis en gel desnaturizante con gradiente

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Este método fue introducido por Muyzer en 1993 y es muy usado para identificar comunidades microbianas directamente del ambiente (Barata *et al.*, 2012).

Es una técnica basada en las discrepancias que existen en el comportamiento de fusión de dos fragmentos de DNA de la misma longitud pero que difieren hasta en una sola base. La separación de los fragmentos se hace en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente desnaturizante lineal, lo que provoca la separación de las cadenas dobles del DNA. Cuando se utiliza un gradiente lineal de temperatura como agente desnaturizante, la técnica se denomina electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) (Muyzer *et al.*, 1993 Giraffa y Neviani 2001; Ogier *et al.*, 2004).

Un fragmento de DNA se desdobra a una determinada temperatura o concentración de un agente desnaturizante, de manera que cuando se llega a una concentración lo suficientemente alta para desnaturizar al DNA la molécula se funde parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel, lo que le hace cambiar su movilidad electroforética en comparación con los demás fragmentos hasta que se detiene, debido a que cada fragmento se inmoviliza en diferentes puntos a lo largo del gel, se pueden distinguir variaciones muy pequeñas en sus secuencias (**Figura 4.16**) (Cocolin *et al.*, 2011).

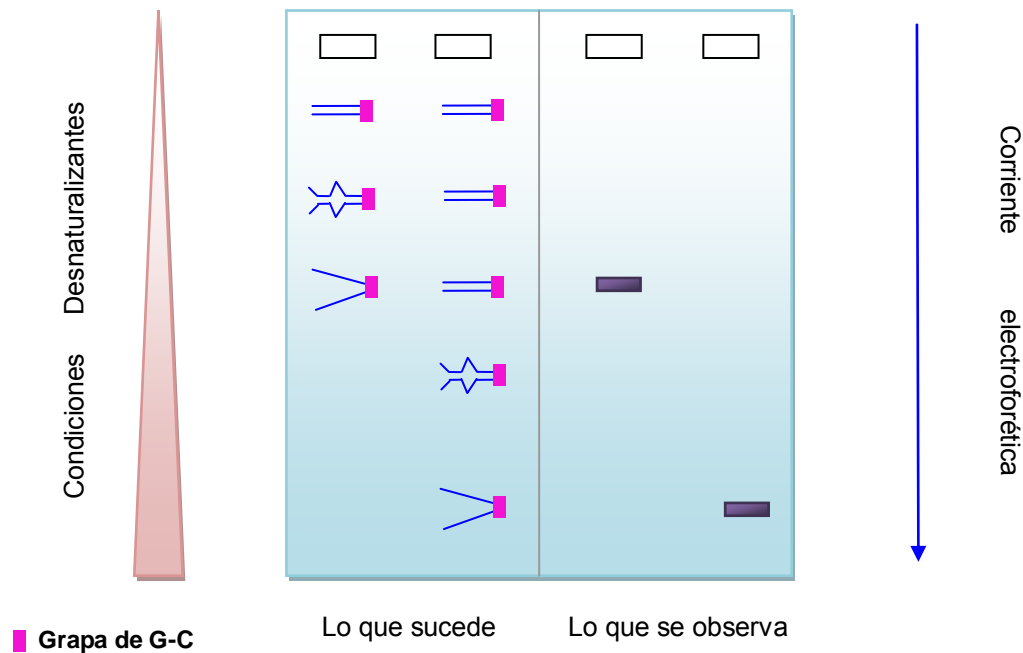


Figura 4.16 Representación esquemática del fundamento teórico de DGGE
Adaptado de Ivey y Phister, 2011.

En un gel con un gradiente químico, las condiciones desnaturalizantes están dadas por soluciones de urea y formamida. Una solución de 100% de desnaturalizante químico está constituida por urea 7M y formamida 40% en agua. Se preparan soluciones con concentraciones alta y baja (100% y 0%) del desnaturalizante, se mezclan con la solución de acrilamida y se vierten en un molde, en el cual se genera un gradiente lineal desnaturalizante. En este gel se lleva a cabo la separación de los fragmentos de DNA amplificados. La electroforesis se lleva a cabo a una temperatura constante que oscila entre 55°C y 65°C (Renouf *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2010).

La completa desnaturalización de los fragmentos previamente amplificados por PCR se previene usando cebadores que contienen “grapas” de GC (guanina-citosina), ya que las secuencias ricas en GC requieren condiciones más drásticas de desnaturalización. Esta secuencia se conoce como “grapa GC” y se sitúa en el



extremo 5' de uno de los cebadores, los cuales se amplifican junto con el segmento de DNA. La secuencia rica en GC actúa como dominio de alta fusión previniendo la disociación completa de las dos cadenas del DNA en cadenas simples. Los primers más usados en esta técnica son: NL1^{CG} (5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAG3') y LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') (Ivey y Phister, 2011).

Los patrones obtenidos en el análisis de DGGE proveen un perfil de la diversidad de poblaciones microbianas, donde cada una de las bandas representa a un organismo diferente en la comunidad, además la intensidad de cada banda probablemente representa la abundancia relativa de una especie en particular dentro de una población (**Figura 4.17**) (Rivera, 2007; Urso *et al.*, 2008).

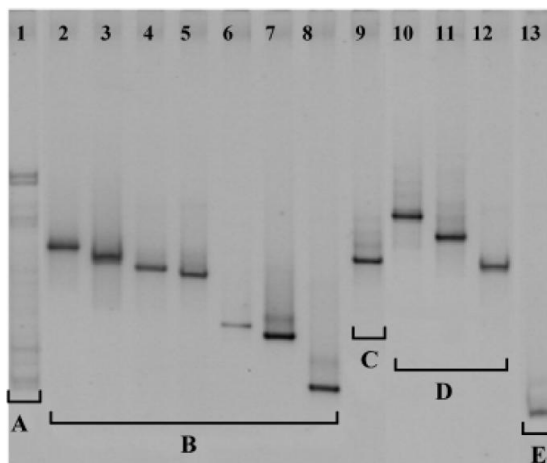


Figura 4.17 Perfiles de migración de diferentes levaduras aisladas de fermentaciones de vino.

Cada línea representa un microorganismo diferente. Línea 1, *Metschnikowia* sp.; línea 2, *Debaryomyces hansenii*; línea 3, *Pichia anomala*; línea 4, *Pichia guilliermondii*; línea 5, *Torulaspota delbrueckii*; línea 6, *Zygosaccharomyces bailii*; línea 7, *Saccharomyces cerevisiae*; línea 8, *Candida riudocensis/stellata*; línea 9, *Candida zemplinina*; línea 10, *Hanseniaspora clermontiae/uvarum*; línea 11, *Candida oleophila*; línea 12, *Hanseniaspora osmophila*; línea 13, *Hanseniaspora vineae*; línea 14: *Pichia membranifaciens*. A, B, C, D, E: Diferentes tipos de colonias detectados mediante sembrado en placa (Urso *et al.*, 2008).



Es necesario determinar cuál de las regiones variables de los genes ribosomales permite separar a los microorganismos presentes mediante la amplificación con cebadores específicos. Por lo tanto, es muy importante seleccionar el gen apropiado para el análisis. Los fragmentos de DNA deben ser relativamente pequeños, aproximadamente 500pb, y deben poseer regiones bien conservadas que puedan ser usadas para el diseño de los cebadores. Para las levaduras el gen más usado es la región D1/D2 del gen DNA ribosomal 26S (Ivey y Phister, 2011).

Otro aspecto muy importante a considerar en el diseño de cebadores para el DGGE es el sesgo (“*bias*”) introducido por la PCR. Laforgue *et al.* (2009), usaron DGGE para examinar las poblaciones de hongos y levaduras presentes en las uvas para la detección temprana de las especies que podrían participar en el desarrollo de efectos indeseables en el vino. Se amplificó un fragmento del gen de la β -tubulina debido a que se sabe que es una secuencia rica en intrones y se consideró adecuado para la discriminación de especies muy relacionadas.

El ensayo fue incapaz de detectar algunas especies de levaduras ya identificadas por métodos tradicionales. Esta contrariedad fue atribuida al sesgo producido por la PCR, ya que encontraron que el gen de la β -tubulina de los hongos es mayormente amplificado en algunos grupos que en otros, debido a la falta de accesibilidad de la región del gen, a que este gen tiene un bajo número de secuencias (12 700) en comparación con las secuencias ITS, por ejemplo, que tienen 51 350, o a que la lisis de los hongos y las levaduras se realizó de manera diferente; ya que se sabe que tanto la extracción del DNA como los pasos del PCR pueden introducir sesgos en los métodos moleculares de identificación (Huang *et al.*, 2008; Laforgue *et al.*, 2009).

Otra cuestión en el diseño de cebadores es un efecto de “enmascaramiento” cuando no se usan los cebadores adecuados en el DGGE. Por ejemplo, se ha encontrado que varios cebadores que se utilizan para el análisis de



bacterias también amplifican el gen 18S DNA ribosomal de levaduras, hongos y plantas. Sin embargo, varios autores han identificado un nuevo juego de cebadores que elimina este problema, y muchos investigadores ahora usan los cebadores *rpoB* (Renouf *et al.*, 2006).

Andorrà y colaboradores (2008) analizaron la evolución de la población microbiana durante la fermentación de vino, compararon entre diferentes temperaturas, una baja (13°C) y una temperatura óptima de crecimiento para las levaduras durante la fermentación (25°C). Encontraron que DGGE tenía una buena respuesta cuando las poblaciones de levaduras tenían cuentas similares. Sin embargo, cuando las cepas de *S. cerevisiae* comienzan a ser mayoría en la fermentación, las poblaciones minoritarias de *H. guillermondi* y *C. zemplinina* no pudieron ser detectadas por lo menos hasta tener cuentas por encima de 10^3 UFC/mL. Para superar este problema, los autores proponen llevar a cabo la técnica de QPCR, la cual es capaz de cuantificar específicamente a las levaduras que no se observaron en el DGGE.

Los análisis por DGGE son reproducibles, confiables y relativamente rápidos. Además permiten obtener una visión semicuantitativa de la dominancia de los microorganismos dentro de un ecosistema y es muy útil en la detección de organismos viables pero no cultivables. Este método es relativamente sensible, ya que es capaz de detectar poblaciones de levaduras en el vino que representan menos del 0.01% de la población dominante de *Saccharomyces* (Giraffa y Neviani, 2001; Ogier *et al.*, 2004; Andorrà *et al.*, 2010; Ivey y Phister, 2011).

Este método de identificación puede ser un problema si un nuevo microorganismo, nunca antes aislado, se presenta en la muestra. Y aunque proporciona datos muy confiables sobre las especies presentes en una muestra, no proporciona datos cuantitativos. La preparación del gel con gradiente es complicada, las grasas de GC pueden favorecer la formación de dímeros entre ellas. Además el uso de agentes químicos como formamida o acrilamida y la



necesidad de equipo especial aumenta los costos del análisis (Renouf *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Yoshikawa *et al.*, 2010).

En la siguiente tabla (**tabla 4.8**) se mencionan algunos artículos en los que se ha usado el DGGE para la identificación de diferentes levaduras presentes en el vino.

Tabla 4.8 Identificación de levaduras presentes en vino mediante DGGE

Género y especie	Especificaciones del método	Referencia
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Primers: NL1 y LS2 Gradiente de desnaturalización: Entre 45 y 70% de soluciones urea-formamida.	Bester <i>et al.</i> , 2010.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida stellata</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Rhodotorula slooffiae</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Primers: NL1 y LS2 Gradiente de desnaturalización: Entre 30 y 60% de soluciones urea-formamida.	Prakitchaiwattana <i>et al.</i> , 2004. Urso <i>et al.</i> , 2008.
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i>	Primers: Schaf ^{GC} (5'-GTAGTGAGTGATACTCTT-3') y el primer reverse Schar (5'-AGAACATGTTGCCTAGAC-3'). Gradiente: Entre 30 y 40% de soluciones urea-formamida.	Manzano <i>et al.</i> , 2004.
<i>Candida humilis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces uvarum</i>	Primers: U1 ^{GC} (GTGAAATTGT TGAAAGGGAA) y U2 (GACTCCTTGG TCCGTGTT) Gradiente de desnaturalización: Entre 30 y 50% de soluciones urea-formamida.	Merot <i>et al.</i> , 2003.



Fluorescencia de Hibridación *in situ*

FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)

Esta técnica permite la identificación y cuantificación de los microorganismos dentro de sus ambientes naturales, mediante el diseño de sondas de DNA marcadas por fluorescencia que hibridan de forma específica con el género o especie que se quiere determinar. La detección se realiza por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (Moter y Göbel *et al.*, 2000; Ivey y Phister, 2011).

Un conjunto de sondas específicas son usadas para identificar a los diferentes microorganismos presentes en una muestra, estas se marcan con fluoróforos que hibridan de manera específica con cada individuo o grupo de individuos, lo que permite la detección de varias especies al mismo tiempo. Las sondas de oligonucleótidos utilizadas en la técnica FISH son generalmente de entre 15 y 30 nucleótidos de largo y se unen covalentemente al extremo 5' de una molécula de fluorescencia. Dado que son generalmente diseñadas para detectar el RNA ribosomal, sólo se pueden detectar células viables (Moter y Göbel *et al.*, 2000; Amann *et al.*, 2001; Bottari *et al.*, 2006).

El procedimiento del método inicia cuando una sonda es marcada con un fluoróforo y posteriormente añadida directamente a las células previamente fijadas en un portaobjetos, la sonda hibrida con el ARN dentro de la célula. Una vez que la hibridación es completa, se llevan a cabo lavados para eliminar el excedente de sonda que no hibridó, finalmente las células pueden ser vistas bajo un microscopio que permite la visualización directa de la especies presentes en la muestra (**Figura 4.18**). También se puede utilizar la citometría de flujo, que es un sistema óptico que permite la estimación del número de células, así como la forma, el tamaño y la viabilidad celular a través de las mediciones de luz y dispersión (Giraffa y Neviani, 2001; Bottari *et al.*, 2006; Röder *et al.*, 2007).

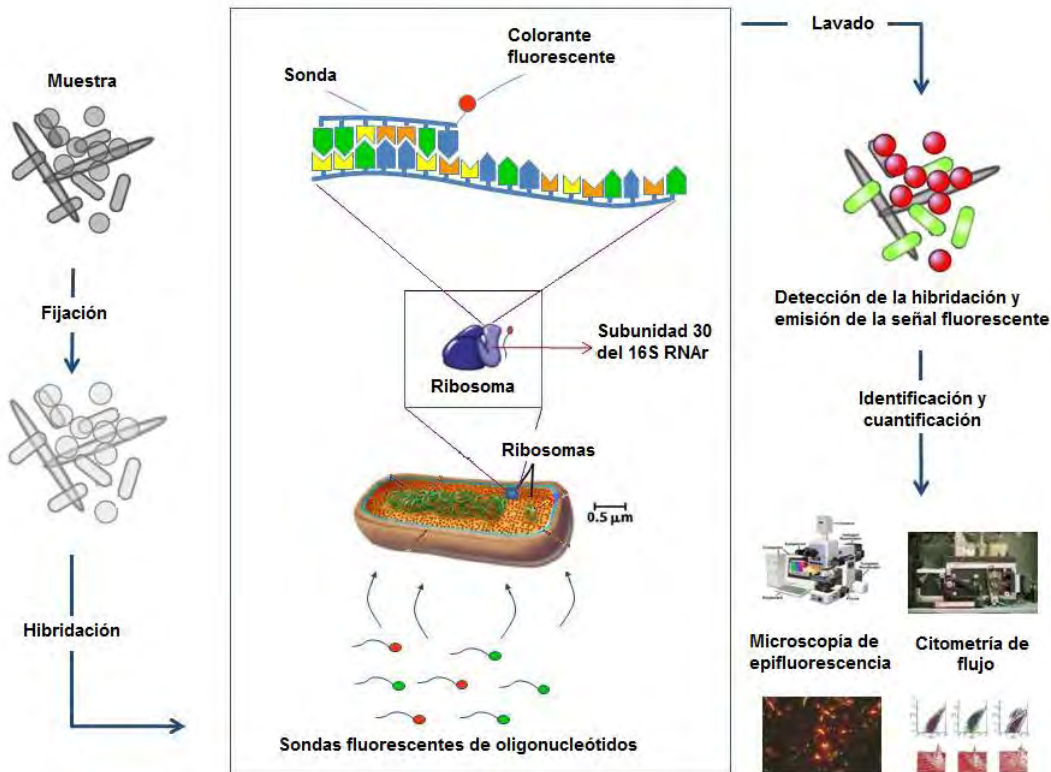


Figura 4.18 Representación esquemática de la metodología de FISH
<http://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish>

Se debe tener especial cuidado en el diseño de la secuencia de las sondas de hibridación, ya que de ello depende que se haga una buena caracterización de la comunidad. Es necesario hacer una selección cuidadosa de las secuencias de los organismos representativos que se desean visualizar, pues la sonda será tan buena como lo sea esta selección. Errores en este diseño podrían ocasionar que no puedan visualizarse organismos no cultivables que pertenezcan al grupo de interés o que se den hibridaciones cruzadas con organismos de otros grupos. También se debe tomar en cuenta que el límite de detección de la técnica es de 10^4 UFC/mL (Jasson *et al.*, 2010).

La principal ventaja de esta técnica es que permite identificar y cuantificar de forma rápida y directa los microorganismos sin necesidad de cultivo previo ni de extracción del RNA, además es una técnica útil para precisar la distribución de



los microorganismos en sus ambientes naturales. Mientras que sus principales inconvenientes son su costo y que la presencia de algunos compuestos como los polisacáridos, compuestos fenólicos, etcétera, que están presentes en algunas muestras y pueden interferir o enmascarar la fluorescencia (Röder *et al.*, 2007).

En 2006, Xufre y cols. analizaron la diversidad de la población de levaduras durante la fermentación del vino, mediante FISH y en combinación con un conteo en placa. Se siguieron las fermentaciones, una con mosto de uvas blancas y otra con mosto de uvas tintas. En ambos casos se encontró una vasta variedad de levaduras, como *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*. Algunas de estas especies diferentes a *Saccharomyces* se encontraron en cuentas significativas durante todo el proceso de fermentación (*Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans* y *Torulaspota delbrueckii*) a pesar de la inoculación de los mostos con cepas iniciadoras de la fermentación de *S. cerevisiae*. Los resultados mostraron que durante la primera etapa de la fermentación, es decir, cuando el 40-50% del azúcar total del mosto se había consumido, se observa una mezcla de diferentes especies de levaduras. Sin embargo, cuando el etanol llega a concentraciones de 4-5% (v/v) las levaduras diferentes a *Saccharomyces* son rápidamente superadas en número por *S. cerevisiae*. Con lo que se argumenta que estas levaduras son las encargadas de otorgar al vino sus características sensoriales finales.

En la **tabla 4.9** se mencionan algunos artículos en los que se ha usado la técnica FISH para la identificación de *Brettanomyces bruxellensis*.

Tabla 4.9 Identificación de levaduras presentes en vino mediante FISH

Género y especie	Especificaciones del método	Referencia
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Sondas de ácidos nucleicos con marcajes fluorescentes llamadas <i>BRE26S14/Flu.</i>	Stender <i>et al.</i> , 2001 Dias <i>et al.</i> , 2003 Röder <i>et al.</i> , 2007



4.3 Factores que afectan el desempeño de los métodos moleculares para el análisis de levaduras

Los métodos moleculares aún necesitan cumplir con ciertos criterios antes de obtener la total aceptación para su uso rutinario en los laboratorios de calidad de las industrias, más específicamente en la industria enológica. Primero, deben dar datos precisos, confiables y reproducibles, con niveles adecuados de sensibilidad y especificidad, además tienen que ser prácticos, de bajo costo y dar resultados de forma relativamente rápida (Beh *et al.*, 2006).

Por ejemplo, los ensayos de PCR forman la base de la mayoría de los métodos moleculares utilizados para identificar levaduras. En consecuencia, es importante identificar y comprender los diversos factores que afectan el rendimiento de éste método.

Independientemente del origen de la muestra, la levadura en estudio debe provenir de un cultivo axénico, es decir, el cultivo debe estar completamente puro; además la colonia debe proporcionar la biomasa para la suficiente extracción de ADN. Algunas veces, variables como el medio de cultivo y el tiempo de incubación no son consideradas como factores que afectan el desempeño de la PCR, sin embargo pueden afectarla. Incluso remanentes de los ingredientes de los medios de cultivo pueden llegar a inhibir la PCR (Bleve *et al.*, 2003; Beh *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006; Kagkli *et al.*, 2011).

De igual manera la edad fisiológica de la célula (fase de latencia, fase estacionaria, fase exponencial y muerte) en el momento del ensayo puede afectar la eficiencia de extracción del DNA y la calidad del mismo. Dependiendo de la edad del cultivo, algunas proteínas celulares, por ejemplo, pueden interactuar con el DNA lo que afecta la hibridación del cebador con la cadena molde o, de igual manera, pueden afectar la actividad de la DNA polimerasa (Senses-Ergul *et al.*, 2006; Kagkli *et al.*, 2011).



Otro problema es que algunos basidiomicetos pueden tener las paredes celulares más rígidas que las de los ascomicetos y requieren de procedimientos más vigorosos para la extracción del DNA (Orberá, 2004).

Los métodos moleculares describen procedimientos para extraer y purificar el DNA de las células levaduriformes, las técnicas más comunes de extracción de DNA incluyen la rotura mecánica por agitación con perlas de vidrio o zirconio, la digestión con enzimas líticas o con solventes químicos. Estos procesos necesitan de una estandarización para poder obtener rendimientos de DNA más reproducibles (Beh *et al.*, 2006).

Los ensayos de PCR son reacciones enzimáticas, y como todo proceso enzimático la reacción es altamente específica, y la cinética está determinada por factores como el pH, la temperatura, la concentración de los reactivos, los requerimientos de cofactores y la presencia de diferentes inhibidores (de Barros Lopes *et al.*, 1996).

Es bien sabido el hecho de que las muestras provenientes del suelo, vegetales o frutos -como las uvas de vinificación- a pesar de pasar por un proceso de lavado, muchas veces llegan a tener remanentes de compuestos húmicos, compuestos polifenólicos, polisacáridos o iones metálicos que pueden inhibir la reacción ya que afectan la actividad de la polimerasa o la disponibilidad de las plantillas de DNA desnaturalizado. Se han propuesto estrategias para reducir o eliminar estos efectos negativos en la reacción tales como el uso de centrifugaciones, lavados del DNA inmovilizado en agarosa, cromatografías, electroforesis, procedimientos de filtración, agentes quelantes o polivinilpolipirrolidona (PPPV) que es muy utilizada como agente de clarificación en los vinos por su capacidad para unirse a grupos polifenólicos (Beh *et al.*, 2006; Trung *et al.*, 2011; Tessonnière *et al.*, 2009).



Las condiciones electroforéticas usadas para la separación y la detección de los amplicones de DNA representa otro factor de variación importante al llevar a cabo la técnica del PCR. Variables como el agente gelificante (agarosa o poliacrilamida) y la concentración en la cual se usa, el tiempo que se deja correr la muestra, la temperatura, el voltaje y la composición del amortiguador, generalmente se usan de acuerdo a los intereses de una investigación dada y pueden variar mucho de un estudio a otro (Beh *et al.*, 2006).

Incluso, el grado de entrecruzamiento y el tamaño del poro en los geles de poliacrilamida afectan la resolución de las bandas de DNA y la detección de las especies de levaduras por DGGE (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

4.4 Estandarización de los métodos

La importancia comercial de las levaduras vínicas, en este caso, tiene implicaciones muy importantes a nivel internacional. Las empresas que comercializan con productos enológicos por lo general tienen acuerdos que especifican las características de los vinos y la presencia de levaduras en los mismos. En este contexto, los métodos moleculares utilizados para el análisis de levaduras vínicas necesitan satisfacer las exigencias de la ley y es requerida alguna norma de aceptación internacional. Si bien ha habido importantes avances en la estandarización de los métodos para el análisis de microorganismos, la necesidad de normalizar sigue siendo un reto para los métodos moleculares (Noguez, 2006).

Primero debe definirse la aplicación específica a evaluar. Esto seguido de la evaluación y definición de las condiciones del ensayo (especificar tratamiento de la muestra, metodología usada para la extracción de DNA, condiciones de PCR, límites de detección, por mencionar algunas), el desarrollo de ensayos como controles positivos y negativos, elección de los procedimientos de análisis de datos y finalmente el desarrollo de protocolos normalizados (Beh *et al.*, 2006).

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, para la identificación de levaduras, existen diferentes procedimientos que se adoptan en la investigación, el método a utilizar dependerá de los recursos tanto humanos como materiales que se tengan, el tiempo, el espacio y las posibilidades económicas con las que cuenta cada laboratorio.

Generalmente para estas identificaciones se secuencian uno o dos genes, los más comunes son los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S, esto debido a que contienen secuencias muy conservadas y son genes que se agrupan uno tras otro formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces, y en ocasiones, el resultado se complementa o confirma con pruebas fisiológicas y bioquímicas (Esteve-Zaroso *et al.*, 1999; Granchi *et al.*, 1999; Agnolucci *et al.*, 2009; Csoma *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el estudio de las propiedades fisiológicas de las levaduras es muy importante, ya que sirven para describir e identificar a los géneros y, en grado menor, a las especies. De estas, las principales pruebas utilizadas para propósitos de identificación de rutina son las de fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, los requerimientos de vitaminas, el crecimiento en medios con un alto contenido de solutos (osmotolerancia), tolerancia al ácido acético y etanol, entre otras (Martorell *et al.*, 2007; Csoma *et al.*, 2010).

Sin embargo, en numerosos artículos se expresa que los métodos tradicionales de identificación a pesar de usarse por su practicidad y economía son pruebas muy largas (de 3 a 15 días) y muchas veces tediosas dada la gran cantidad de muestras que normalmente se analizan, requieren de una amplia experiencia y habilidad para evaluar de 60 a 90 pruebas específicas, por lo que los



errores en la identificación ocurren con frecuencia (Arias *et al.*, 2002; Orberá, 2004; Lopandic *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006; Kagkli *et al.*, 2011).

Otro inconveniente de estos métodos es que al estudiar la morfología del estado asexual y sexual, sólo se puede obtener una identificación hasta nivel de género. De hecho, las principales desventajas que han mostrado las pruebas morfológicas se manifestaron con el descubrimiento del estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme de los ascomicetos y basidiomicetos, es decir, la relación anamorfo/telomorfo, lo cual ha generado la llamada dualidad de la nomenclatura binomial, que no es más que la misma especie nombrada de una forma diferente en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (telomorfo). En este caso se encuentra el dúo *Brettanomyces/Dekkera* responsable de otorgar características indeseables en los vinos como los olores a “caballo mojado”, “ratón”, o sabores descritos como “medicinal”, “como corral”, entre otros, esto debido a la producción de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos volátiles por parte de la levadura (Tessonnière *et al.*, 2009; Oelofse *et al.*, 2010).

Además, para la mayoría de éstas pruebas no existe un único método normalizado, por lo que los resultados con frecuencia dependen de la técnica empleada, así que el procedimiento elegido debe ser escrupulosamente cuidado y es recomendable utilizar inóculos de levaduras con 48 horas de crecimiento. Para cerciorar que los resultados obtenidos son confiables, se comparan con cultivos de referencia, obtenidos de ceparios certificados, y se contrastan las pruebas realizadas para ambas cepas (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Martorell *et al.*, 2007; Tofalo *et al.*, 2012).

Estos métodos en general, producen ambigüedades y errores en los resultados debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la prueba de fermentación de azúcares no es muy exacta debido a que las levaduras de



fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata ni en grandes cantidades para que pueda ser atrapado por una campana Durham, lo cual ha provocado que especies consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse (Orberá, 2004; Kurtzman *et al.*, 2011).

Además estas pruebas no siempre son estables ni reproducibles, debido a que entre cepas de una misma especie pueden presentarse variaciones morfológicas o fisiológicas, lo que puede llevar a una identificación errónea. Por ello para obtener un resultado más confiable y para minimizar el tiempo empleado en la identificación, durante los últimos años se han implementado diversos métodos moleculares que dependen de los estudios comparativos de DNA. Estos métodos se han introducido para asegurar una identificación exacta y fiable ya que éstos no dependen de las condiciones ambientales, estados fisiológicos de las células ni de las condiciones de cultivo (Bleve *et al.*, 2003; Lopandic *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006; Arce, 2007; Kagkli *et al.*, 2011).

El hecho de que las pruebas bioquímicas y fisiológicas tengan un limitado potencial indica que la caracterización fenotípica no es suficiente para una identificación inequívoca de las levaduras en la microbiología de los alimentos. Sin embargo, la información que dan estas pruebas tiene un gran valor en la caracterización de levaduras de importancia biotecnológica, especialmente en la diferenciación de los géneros que están implicados en los procesos de fermentación o maduración de los vinos como: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, entre otras. (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Cadez *et al.*, 2003; López *et al.*, 2003; Orberá, 2004; Lopandic *et al.*, 2006).

Los nuevos métodos basados en el análisis de genes ofrecen varias ventajas como la obtención rápida de los resultados, se pueden obtener los resultados en algunas horas a diferencia de los métodos convencionales que requieren de varios días e incluso semanas, el aumento en la especificidad del



análisis, la disminución de la carga de trabajo, el procesamiento computarizado de los datos y la posibilidad de automatizar equipos como los termocicladores, sólo por mencionar algunas. Además podemos obtener información sobre la cantidad (QPCR y FISH) y la identidad de los organismos presentes en una muestra. Se puede conocer el género o especie, e incluso hasta la cepa específica de cada organismo estudiado. Sin embargo, aún se necesita conocer más afondo acerca de la estandarización de los métodos, su exactitud, reproducibilidad, precisión, especificidad y sensibilidad de detección (Wittbrodt y Erhardt, 1989; Costa, 2004; Beh *et al.*, 2006; Röder *et al.*, 2007; Postollec *et al.*, 2011).

Por ejemplo, en un estudio Lopandic y cols. (2006) realizaron la identificación de levaduras aisladas de diferentes productos lácteos, la metodología incluyó pruebas fenotípicas (morfológicas, bioquímicas y de caracterización fisiológica) y genotípicas (RAPD-PCR).

Los resultados que obtuvieron mostraron que sólo el 54% de las cepas estudiadas fueron identificadas de manera correcta usando los métodos tradicionales, esto se confirmó mediante la toma de “huellas génicas” con el RAPD. Un análisis comparativo de las propiedades bioquímicas entre las levaduras aisladas de varios productos lácteos mostró que las pruebas bioquímicas estándar pueden generar resultados diferentes para la misma especie si éstas provienen de muestras diferentes, es decir, se generan resultados diferentes dependiendo del origen geográfico del cuál proviene la muestra, lo cual fue corroborado por el mismo autor en otros estudios; por lo que es necesario confirmar estas pruebas con métodos moleculares como el RAPD, la conclusión a la que se llega es que la caracterización fenotípica no es suficiente para la identificación de las levaduras (Lopandic *et al.*, 2006; Lopandic *et al.*, 2007).

Con todo lo anterior podemos decir que los métodos moleculares han tenido mucho auge en su aplicación, sin embargo, no debemos olvidar la importancia de la caracterización de las cepas por métodos tradicionales, ya que sólo de esta



manera podremos conocer datos de las levaduras que un análisis molecular no proporciona, como los azúcares que fermentan, los que asimilan, su capacidad de producir etanol y tolerarlo, etcétera, lo cual es de suma importancia en la industria enológica para conocer qué compuestos se están consumiendo y produciendo durante la fermentación, las cepas principales que dirigen el proceso, por mencionar algunos ejemplos, y de esta manera poder optimizar el proceso de vinificación.

6. CONCLUSIONES

- El vino ha formado parte de diferentes culturas desde hace miles de años y actualmente sigue siendo una industria muy importante que genera grandes ganancias a nivel mundial, es por ello que toma gran importancia llevar a cabo estudios e investigaciones para optimizar los procesos, reducir los costos y aumentar la calidad de los vinos.
- Los métodos tradicionales de identificación, que incluyen pruebas fenotípicas y bioquímicas, son utilizados principalmente para la caracterización de las levaduras como un complemento a la identificación molecular dado que estos métodos pueden fallar a la hora de describir la diversidad microbiana total de una muestra debido al predominio de algunas especies, las inhibiciones entre las mismas o por la incapacidad de detectar microorganismos viables pero no cultivables.
- Las pruebas fenotípicas no siempre son estables ni reproducibles debido a que entre cepas de microorganismos de una misma especie llegan a presentarse variaciones morfológicas o fisiológicas que pueden llevar a una identificación errónea, es por ello que se emplean métodos moleculares, los cuales están basados en el estudio del genoma y no son influidos por las condiciones de cultivo.
- Las pruebas de identificación molecular permiten obtener información sobre la cantidad e identidad de los organismos presentes en una muestra, de una manera más rápida y reproducible en comparación con los métodos fenotípicos.



- La utilización de los diferentes métodos moleculares depende del objetivo que se busque en la investigación, ya que se puede elegir entre un número amplio de métodos tomando en cuenta aspectos como el tipo de muestra, si se quieren resultados cuantitativos o cualitativos, el tiempo y el presupuesto con el que se cuenta, ya que cabe mencionar que los métodos moleculares son más caros que los tradicionales, sin embargo, su sensibilidad, reproducibilidad y rapidez han hecho que los investigadores los elijan sobre los otros.
- El empleo de métodos moleculares para estudiar la vinificación ha conducido a un mayor conocimiento y entendimiento de las interacciones y sucesiones entre las diferentes especies de levaduras a lo largo de la fermentación, lo que conlleva a suponer diversas maneras de conducir este proceso y obtener vinos con características sensoriales óptimas e incluso novedosas.
- Aunque los métodos moleculares han ido reemplazando el empleo de métodos tradicionales, no debemos dejar de lado la importancia de la caracterización de las cepas por métodos fenotípicos y pruebas bioquímicas, ya que la combinación de ambos nos ofrece un panorama más amplio de lo que está sucediendo durante la fermentación, porque sólo de esta manera podremos conocer datos de las levaduras que un análisis molecular no proporciona, como los azúcares que fermentan, los que asimilan, su capacidad de producir etanol y tolerarlo, etcétera, lo cual es de suma importancia en la industria enológica para conocer los compuestos que se están consumiendo y produciendo durante la fermentación, por ejemplo, y de esta manera poder optimizar el proceso de vinificación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agnolucci, M.; Vigentini, I.; Capurso, G.; Merico, A.; Tirelli, A.; Compagno, C.; Foschino, R.; Nuti, M. **2009**. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3), 238-244.
2. Aleixandre, J. **1996**. Enología. Valencia: Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. pp. 436.
3. Amann, R.; Fuchs, B.; Behrens, S. **2001**. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 231-236.
4. Andorrà, I.; Landi, S.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J. M. **2010**. Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. *Food Research International*, 43 (3), 773-779.
5. Andorrà, I.; Landi, S.; Mas, A.; Guillamón, J. M.; Esteve-Zarzoso, B. **2008**. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 25 (7), 849-856.
6. Andrade, O. **2006**. Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la región de Sola de Vega, Oaxaca. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
7. Antunovics, Z.; Irinyi, L.; Sipiczki, M. **2005**. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 971-979.
8. Arce, G. **2007** Levaduras aisladas de atole agrio de maíz elaborado en San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Puebla, México. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F.
9. Arias, C. R.; Burns, J. K.; Friedrich, L. M.; Goodrich, R. M.; Parish, M. E. **2002**. Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different



- Identification Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4), 1955-1961.
10. Arroyo-López, F. N.; Durán-Quintana, M. C.; Ruiz-Barba, J. L.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A. **2006**. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23 (8), 791-796.
 11. Azumi, M.; Goto-Yamamoto, N., AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* **2001**, 18 (12), 1145-1154.
 12. Baleiras Couto, M. M.; Reizinho, R. G.; Duarte, F. L. **2005**. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (1), 49-56.
 13. Baleiras Couto, M. M.; van der Vossen, J. M. B. M.; Hofstra, H.; Huis in't Veld, J. H. J. **1994**. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 249-260.
 14. Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. **2012**. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (3), 243-259.
 15. Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. **2000**. Yeasts: characteristics and identification. Tercera edición. Cambridge: Cambridge University Press. pp.1139.
 16. Basim, E.; Basim, H. **2001**. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turkish Journal of Biology*, 25, 405-418.
 17. Beh, A.; Fleet, G.; Prakitchaiwattana, C.; Heard, G. **2006**. Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 69-106.
 18. Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J.A. **2009**. A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1743-1751.



19. Bertrand, O.; Delfau, M.H.; Garbarz, M.; Picat, C.; Devaux, I.; Dhermy, D.; Boivin, P.; Grandchamp, B. **1989**. An efficient laboratory made apparatus for DNA amplification. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 18 (3), 227-235.
20. Bester, L.; Cameron, M.; Toit, M. d.; Witthuhn, R. C. **2010**. PCR and DGGE detection limits for wine spoilage microbes. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 31 (1), 26-33.
21. Beutin, L.; Miko, A.; Krause, G.; Pries, K.; Haby, S.; Steege, K.; Albrecht, N. **2007**. Identification of human-pathogenic strains of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of *Shiga* toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (15), 4769-4775.
22. Biondi, E.; Mengoni, A.; Bazzicalupo, M. **2008**. Analysis of microbial population genetics **En:** Varma, A.; Abbott, L.; Werner, D.; Hampp, R. (eds.) *Plant Surface Microbiology*. Heidelberg: Springer, Capítulo 28. pp 551-565.
23. Blevé, G.; Rizzotti, L.; Dellaglio, F.; Torriani, S. **2003**. Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7), 4116-4122.
24. Bottari, B.; Ercolini, D.; Gatti, M.; Neviani, E. **2006**. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73 (3), 485-494.
25. Brown, T. **2008**. Genomas. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. pp. 738.
26. Cadez, N.; Poot, G. A.; Raspor, P.; Smith, M. T. **2003**. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1671-1680.
27. Cadez, N.; Raspor, P.; de Cock W.A.M., A.; Boekhout, T.; Smith, M. **2002**. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research*, 1, 279-289.



28. Capece, A.; Salzano, G.; Romano, P. **2003**. Molecular typing techniques as a tool to differentiate *non-Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 33-39.
29. Carle, G.F., Frank, M., and Olson, M.V. **1986**. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 232, 65-68.
30. Chavan, P.; Mane, S.; Kulkarni, G.; Shaikh, S.; Ghormade, V.; Nerkar, D. P.; Shouche, Y.; Deshpande, M. V. **2009**. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26 (8), 801-808.
31. Checa, M. A. **2007**. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*, 20 (3), 213-221.
32. Chu, G.; Vollrath, D.; Davis, R. W. **1986**. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234, 1582-1585.
33. Clemente-Jimenez, J. M.; Mingorance-Cazorla, L.; Martínez-Rodríguez, S.; Heras-Vázquez, F. J.; and Rodríguez-Vico, F. **2004**. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21, 149-155.
34. Cocolin, L.; Campolongo, S.; Alessandria, V.; Dolci, P.; Rantsiou, K. **2011**. Culture independent analyses and wine fermentation: an overview of achievements 10 years after first application. *Annals of Microbiology*, 61 (1), 17-23.
35. Coloretti, F.; Zambonelli, C.; Tini, V. **2006**. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiology*, 23 (7), 672-676.
36. Combina, M.; Mercado, L.; Borgo, P.; Elia, A.; Jofré, V.; Ganga, A.; Martinez, C.; Catania, C. **2005**. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1055-1061.
37. Cook, M. **1979**. Cuadernos de biología: Genética de poblaciones. Barcelona: Ediciones Omega. pp. 100.



38. Cordero-Bueso, G.; Arroyo, T.; Serrano, A.; Tello, J.; Aporta, I.; Vélez, M. D.; Valero, E. **2011**. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (1), 132-139.
39. Costa, J. **2004**. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305.
40. Cova, C. **2010**. Caracterización molecular de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
41. Csoma, H.; Zakany, N.; Capece, A.; Romano, P.; Sipiczki, M. **2010**. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2-3), 239-248.
42. Curtin, C. D.; Bellon, J. R.; Henschke, P. A.; Godden, P. W.; de Barros Lopes, M. A. **2007**. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research*, 7 (3), 471-481.
43. Curtis, H.; Barnes, S.; Schnek, A. **2008**. Biología. Séptima edición. Santiago: Editorial Médica Panamericana. pp. 1160.
44. de Barros Lopes, M.; Sandra, R.; A., H. P.; Peter, L. **1999**. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 915-924.
45. de Barros Lopes, M.; Soden, A.; Henschke, P.A.; Langridge P. **1996**. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4514-4520.
46. de Barros Lopes M., Bellon J. R., Shirley N. J., and Ganter P. F. **2002**. Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species, *FEMS Yeast Reserch*, 1, 323-331.
47. Delaherche, A.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A. **2004** Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 910–915.



48. Demuyter, C.; Lollier, M.; Legras, J. L.; Le Jeune, C. **2004**. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (6), 1140-1148.
49. Derveaux, S.; Vandesomepele, J.; Hellemans, J. **2010**. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50 (4), 227-230.
50. Di Maro, E.; Ercolini, D.; Coppola, S. **2007**. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2), 201-210.
51. Dias, L.; Dias, S.; Sancho, T.; Stender, H.; Querol, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. **2003**. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 20 (5), 567-574.
52. Dlauchy, D.; Tornai-Lehoczki, J.; Gárbor, P. **1999**. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 445-453.
53. Espinel-Ingroff, A.; Stockman, L.; Roberts, G.; Pincus, D.; Pollack, J.; Marler, J. **1998**. Comparison of RapID Yeast Plus System with API 20C System for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (4), 883-886.
54. Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburul, 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.
55. Esteve-Zarzoso, B.; Hierro, N.; Mas, A.; Guillamón, J. M. **2010**. A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (10), 1480-1484.
56. Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Toran, M. J.; Garcia-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. **2001**. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5), 2056-2061.



57. Fairchild, A.; Lee, M.; Maurer, J. **2006**. PCR basics **En:** Maurer, J. (ed.) *PCR Methods in Foods*. Nueva York: Springer, Capítulo 1. pp. 1-26.
58. Falentin, H.; Henaff, N.; Le Bivic, P.; Deutsch, S.-M.; Parayre, S.; Richoux, R.; Sohier, D.; Thierry, A.; Lortal, S.; Postollec, F. **2012**. Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiology*, 29 (1), 132-140.
59. Fernández-Espinar, M.; Martorell, P.; de Llanos, R.; Querol, A. **2006**. Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. **En:** Querol, A.; Fleet, G. (eds.) *The yeast hand book: Yeasts in Food and Beverages*. Heidelberg: Springer. Capítulo 3. pp. 55-82.
60. Ferrand, C. **2007**. Caracterización de levaduras por medio de la secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26S durante la fermentación del aguamiel para la producción de pulque en el estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
61. Ferrari, M. R.; Spirito, S. E.; Sabalza, M. G. **1995**. Taxonomía numérica: Su aplicación al análisis de los resultados de una evaluación. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 17 (2), 159-164.
62. Flanzky, C. **2003**. Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. Segunda edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. pp.797.
63. Fleet, G. H. **2003**. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 11–22.
64. Fleet, G. H. **2008**. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979-995.
65. Flores Berrios, E. P.; Alba Gonzalez, J. F.; Arrizon Gavino, J. P.; Romano, P.; Capece, A.; Gschaedler Mathis, A. **2005**. The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in Applied Microbiology*, 41 (2), 147-152.
66. Freifelder, F. **2003**. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Barcelona: Reverté. pp. 631.



67. Fugelsang, K.; Edwards, C. **2007**. Wine microbiology: practical applications and procedures. Segunda edición. Nueva York: Springer. pp. 393.
68. Gallego, J.; Pérez, A.; Núñez, Y.; Hidalgo, P. **2005**. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 22 (6), 561-568.
69. Ganga, M. A.; Martínez, C. **2004**. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 76-83.
70. García, M.; López-Munguía, A. **2004**. Bebidas alcohólicas no destiladas. **En:** García, M.; Quintero, R.; López-Munguía, A. (eds.) *Biotecnología Alimentaria*. México: LIMUSA. Capítulo 8. pp. 263-312.
71. Gayon-Ribéreau, P.; Dubourdiou D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. **2006**. Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. Vol. 1. Segunda edición. Inglaterra: Wiley. pp.497.
72. Gil, M.; García, F.; García, P. **2009**. El vino y su servicio. Madrid:Editorial Paraninfo. pp. 348.
73. Giraffa, G. **2004**. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251-260.
74. Giraffa, G.; Neviani, E. **2001**. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19-34.
75. González, J.; Rodríguez, L. **2001**. Estudio de la inhibición de *Botrytis* utilizando distintos microorganismos. **En:** Vázquez, M. (ed.) *Avances en seguridad alimentaria*. Lugo: Altaga. Capítulo 6. pp. 200-235.
76. Granchi, L.; Bosco, A.; Messini, A.; Vicenzini, M. **1999**. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 949-956.
77. Griffin, D. **1994**. Fungal physiology. Segunda edición. Nueva York: Wiley-Liss. pp. 458.



78. Guaragnella, N.; Pereira, C.; Sousa, M. J.; Antonacci, L.; Passarella, S.; Côte-Real, M.; Marra, E.; Giannattasio, S. **2006**. YCA1 participates in the acetic acid induced yeast programmed cell death also in a manner unrelated to its caspase-like activity. *FEBS Letters*, 580 (30), 6880-6884.
79. Guillamon, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. **1998**. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.
80. Heelan, J. S.; Sotomayor, E.; Coon, K.; D'Arezzo, J. **1998**. Comparison of the Rapid Yeast Plus Panel with the API20C Yeast System for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (5), 1443-1445.
81. Hernández, A. **2003**. Microbiología Industrial. San José, Costa Rica: EUNED. pp. 266.
82. Herrera, M. **2008**. Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada, Baja California.
83. Herschleb, J.; Ananiev, G.; Schwartz, D. C. **2007**. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2 (3), 677-684.
84. Hidalgo, J. **2010**. Tratado de enología. Tomo II. Segunda edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 1823.
85. Hierro, N.; Gonzalez, A.; Mas, A.; Guillamon, J. M. **2004**. New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (4), 792-801.
86. Hierro, N.; Esteve-Zarzoso, B.; González, A.; Mas, A.; Guillamon, J. M. **2006**. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), 7148-7155.
87. Huang, C.H.; Lee, F.L.; Tai, C.J. **2008**. The β -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95 (2), 135-142.



88. Ivey, M.; Phister, T. **2011**. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (10), 1619-1634.
89. Izquierdo-Cañas, P. M.; Ubeda-Iranzo, J. F.; Briones-Pérez, A. I. **1997**. Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepeñas in two consecutive vintages. *Food Microbiology*, 14, 221-225.
90. Jackson, R. **2008**. Wine science: Principles and applications. Tercera edición. San Diego: Academic Press. pp. 751.
91. Jacques, B.; Peynaud, E. **2003**. Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino. Cuarta edición. Madrid: Mundi-Prensa Libros. pp. 353.
92. Jasson, V.; Jacxsens, L.; Luning, P.; Rajkovic, A.; Uyttendaele, M. **2010**. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27 (6), 710-730.
93. Jensen, S. L.; Umiker, N. L.; Arneborg, N.; Edwards, C. G. **2009**. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Food Microbiology*, 26 (8), 915-921.
94. Johnsn, E.; Echavarri-Erasun, C. **2011**. Yeast Biotechnology. **En:** Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T. (eds.) *The Yeasts: a taxonomic study*. Quinta edición. Londres: Elsevier. Capítulo 3. pp. 21-44.
95. Kagkli, D. M.; Weber, T. P.; Van den Bulcke, M.; Folloni, S.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Ermolli, M.; Gribaldo, L.; Van den Eede, G. **2011**, Application of the modular approach to an in-house validation study of Real-Time PCR methods for the detection and serogroup determination of verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (19), 6954-6963.
96. Khan, A.; Melvin, C.; Dagdag, E. **2007**. Identification and molecular characterization of *Salmonella spp.* from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain *S. enterica serovar Tempe*. *Food Microbiology*, 24 (5), 539-543.



97. Kitch, T.; Jacobs, M.; McGinnis, M.; Appelbaum, P. **1996**. Ability of RapID Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. *Journal of clinical microbiology*, *34* (5), 1069-1071.
98. Koneman, E.; Allen, S.; Winn, W.; Janda, W.; Procop, G.; Woods, G. **2008**. Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color. Sexta edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. pp. 1691.
99. Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T. **2011**. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. **En:** Kurtzman, C.; Fell, J. y Boekhout, T. eds. *The Yeasts: a taxonomic study*. Quinta edición. Londres: Elsevier. Capítulo 1. pp. 3-8.
100. Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T.; Robert, V. **2011**. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **En:** Kurtzman, C.; Fell, J. y Boekhout, T. eds. *The Yeasts: a taxonomic study*. Quinta edición. Londres: Elsevier. Capítulo 7. pp. 87-110.
101. Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T. **2011**. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeasts species recognition. **En:** Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T. (eds.) *The Yeasts: a taxonomic study*. Quinta edición. Londres: Elsevier. Capítulo 10. pp. 137-144.
102. Laforgue, R.; Guérin, L.; Pernelle, J. J.; Monnet, C.; Dupont, J.; Bouix, M. **2009**. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology*, *107* (4), 1208-1218.
103. Lambertz, S. T.; Nilsson, C.; Hallanvuo, S. **2008**. TaqMan-based Real-Time PCR method for detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, *74* (20), 6465-6469.
104. Lambertz, S. T.; Nilsson, C.; Hallanvuo, S.; Lindblad, M. **2008**. Real-Time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, *74* (19), 6060-6067.
105. Lappe-Oliveras, P.; Moreno-Terrazas, R.; Arrizón-Gaviño, J.; Herrera-Suárez, T.; García-Mendoza, A.; Gschaedler-Mathis, A. **2008**. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled agave beverages. *FEMS Yeast Research*, *8* (7), 1037-1052.



106. Le Dréan, G.; Mounier, J.; Vasseur, V.; Arzur, D.; Habrylo, O.; Barbier, G. **2010**. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 138 (1-2), 100-107.
107. Lee, B. **2000**. Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Zaragoza: Acribia. pp. 475.
108. Linares, M.; Solís, F. **2007**. Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, Capítulo 11, 1-20.
109. Lopandic, K.; Gangl, H.; Wallner, E.; Tscheik, G.; Leitner, G.; Querol, A.; Borth, N.; Breitenbach, M.; Prillinger, H. r.; Tiefenbrunner, W. **2007**. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research*, 7 (6), 953-965.
110. Lopandic, K.; Tiefenbrunner, W.; Gangl, H.; Mandl, K.; Berger, S.; Leitner, G.; Abd-Ellah, G. A.; Querol, A.; Gardner, R. C.; Sterflinger, K.; Prillinger, H. **2008**. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. *FEMS Yeast Research*, 8 (7), 1063-1075.
111. Lopandic, K.; Zelger, S.; Bánszky, L. K.; Eliskases-Lechner, F.; Prillinger, H. **2006**. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23 (4), 341-350.
112. López, V.; Fernández-Espinar, M. T.; Barrio, E.; Ramón, D.; Querol, A. **2003**. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 81 (1), 63-71.
113. Lopes, C. A.; Jofré, V.; Sangorrín, M. P. **2009**. Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 177-184.
114. Loureiro, V. **2000**. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Reserch International*, 33, 247-256.



115. Madigan, M.; Martinko, J.; Sthal, D.; Clark, D. **2012**. Brock: Biology of Microorganisms. Treceava edición. San Francisco: Pearson Education. pp. 1043.
116. Malorny, B.; Lofstrom, C.; Wagner, M.; Kramer, N.; Hoorfar, J. **2007**. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by Real-Time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (5), 1299-1304.
117. Manzano, M.; Cocolin, L.; Longo, B.; Comi, G. **2004**. PCR–DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 23-27.
118. Martorell, P.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Fernández-Espinar, M. T.; Loureiro, V.; Querol, A. **2006**. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (1), 79-84.
119. Martorell, P.; Querol, A.; Fernandez-Espinar, M. **2005**. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11), 6823-6830.
120. Martorell, P.; Stratford, M.; Steels, H.; Fernández-Espinar, M. T.; Querol, A. **2007**. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (2), 234-242.
121. Masneuf-Pomarède, I.; Bely, M.; Marullo, P.; Lonvaud-Funel, A.; Dubourdieu, D. **2010**. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus var. uvarum* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 139 (1-2), 79-86.
122. Medina, K.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau, F. **2012**. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 0.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012
123. Mesas, J. M.; Alegre, M. T. **1999**. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2 (4), 174-183.



124. Mijares, M.; Sáez, J. **2007**. El vino: de la cepa a la copa. Cuarta edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 208.
125. Mills, D. A.; Johannsen, E. A.; Cocolin, L. **2002**. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10), 4884-4893.
126. Mills, D.A.; Phister, T. **2008**. Wine Fermentation **En**: Cocolin, L. y Ercolini, D. eds. *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Nueva York: Springer, Capítulo 6. pp. 162-192.
127. Miot-Sertier, C.; Lonvaud-Funel, A. **2007**. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (2), 555-562.
128. Mittrakul, C.M.; Henick-Kling, T.; Egli, C.M. **1999**. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiology*, 16, 3–14.
129. Molina, R. **2000**. Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas. Madrid: Mundi-Prensa Libros. pp. 316.
130. Montiel, M. **1991**. Introducción a la flora de Costa Rica. Segunda edición. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica. pp. 345.
131. Morrissey, W. F.; Davenport, B.; Querol, A.; Dobson, A. D. W. **2004**. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (3), 647-655.
132. Muyzer, G.; De Waal, E.; Uitterlinden, A. **1993**, Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
133. Nasonova, E. S. **2008**. Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology*, 2(6), 557-565.
134. Nobelprize.org. **2011**. *The Nobel Prize in Chemistry 1993*. [En línea] Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/ [Último acceso 30 de mayo de 2012].



135. Noguez, V. **2006**. El papel de la microbiología enológica y su importancia en la elaboración de vinos de calidad. Trabajo Monográfico de Actualización. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
136. NMX-V-012-1986. Bebidas alcohólicas. Vinos. Especificaciones. [En línea] Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-012-1986.PDF> [Último acceso 31 de mayo de 2012].
137. Ocón, E.; Gutiérrez, A.; Garijo, P.; López, R.; Santamaría, P. **2010**. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*, 27, 1023-1027.
138. Oelofse, A.; Malherbe, S.; Pretorius, I. S.; Du Toit, M. **2010**. Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 143 (3), 136-142.
139. Ogier, J. C.; Lafarge, V.; Girard, V.; Rault, A.; Maladen, V.; Gruss, A.; Leveau, J. Y.; Delacroix-Buchet, A. **2004**. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9), 5628-5643.
140. Orberá, T. **2004**. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 15-19.
141. Pando Bedriñana, R.; Querol Simón, A.; Suárez Valles, B. **2010**. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27 (4), 503-508.
142. Passarge, E. **2010**. Genética: Texto y Atlas. Tercera edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana. pp. 486.
143. Phister, T. G.; Mills, D. A. **2003**. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7430-7434.
144. Postollec, F.; Falentin, H.; Pavan, S.; Combrisson, J.; Sohier, D. **2011**. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28 (5), 848-861.



145. Povhe Jemec, K.; Cadez, N.; Zagorc, T.; Bubic, V.; Zupec, A.; Raspor, P. **2001**, Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18 (3), 247-259.
146. Prakitchaiwattana, C.; Fleet, G.; Heard, G. **2004**. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4 (8), 865-877.
147. Puig, E. **2007**. La cultura del vino. Barcelona: Editorial UOC. pp. 177.
148. Puig, A.; Bertran, E.; Franquet, R.; García, J.; Mínguez, S. **2010**. *Brettanomyces bruxellensis* prevalence in wines produced and marketed in Spain. *Annals of Microbiology*, 61 (1), 145-151.
149. Rawsthorne, H.; Phister, T.G. **2006**. A real time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 1-7.
150. Rawsthorne, H.; Phister, T. G. **2009**. Detection of viable *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices using ethidium monoazide bromide and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 131 (2-3), 246-250.
151. Redzepovic, S.; Orlic, S.; Sikora, S.; Majdak, A.; Pretorius, I. S. **2002**. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 305-310.
152. Renouf, V.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A. **2007**. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (1), 149-164.
153. Renouf, V.; Claisse, O.; Miot-Sertier, C.; Lonvaud-Funel, A. **2006**. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 23 (2), 136-145.
154. Reyner, A.; de la Iglesia-González, J. **2002**. Manual de viticultura. Sexta edición. Madrid: Mundi Prensa Libros. pp. 497.
155. Rivera, A. **2007**. Comparación de la diversidad de levaduras entre una fermentación natural y una inoculada en mostos de agave 100% para la



- producción de tequila. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
156. Röder, C.; König, H.; Fröhlich, J. **2007**. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Research*, 7 (6), 1013-1026.
157. Rodrigues, N.; Gonççalves, G.; Pereira-da-Silva, S.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. **2001**. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 588-590.
158. Rodríguez, M. E.; Infante, J. J.; Molina, M.; Rebordinos, L.; Cantoral, J. M. **2011**. Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (1), 331-335.
159. Rodríguez, M. E.; Lopes, C. A.; van Broock, M.; Valles, S.; Ramón, D.; Caballero, A. C. **2004**. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 84-95.
160. Rossetti, L.; Giraffa, G. **2005**. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63 (2), 135-144.
161. Rubio, M. **2003**. Pruebas morfológicas y fisiológicas de identificación de levaduras. **En:** Díaz, R.; Gamazo, C.; López-Goñi, I. (eds.) *Manual práctico de microbiología*. Segunda edición. Barcelona: Masson, Capítulos 19 y 20. pp.76-83.
162. Ruiz, J. **2008**. Viaje al asombroso mundo de los hongos. Volumen 218 de la colección "La ciencia para todos". México: FCE, SEP y CONACyT.
163. Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K.; Erlich H. **1988**. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839), 487-491.
164. Salinas, F.; Garrido, D.; Ganga, A.; Veliz, G.; Martínez, C. **2009**. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiology*, 26 (3), 328-332.



165. Salinas, F.; Mandaković, D.; Urzua, U.; Massera, A.; Miras, S.; Combina, M.; Angelica Ganga, M.; Martínez, C. **2010**. Genomic and phenotypic comparison between similar wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* from different geographic origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108 (5), 1850-1858.
166. Sanchez, S. **2006**. Making PCR a normal routine of the food microbiology lab. **En:** Maurer, J. (ed.) *PCR Methods in Foods*. Nueva York: Springer, Capítulo 4. pp. 51-68.
167. Schuller, D.; Valero, E.; Dequin, S.; Casal, M. **2004**. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 231 (1), 19-26.
168. Senses-Ergul, S.; Ágoston, R.; Belák, Á.; Deák, T. **2006**. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (1), 120-124.
169. Sipiczki, M. **2004**. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology*, 44(6), 471-479.
170. Smith, M.; Dunklee, D.; Vu, H.; Woods, G. **1999**. Comparative performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. *Journal of clinical microbiology*, 37 (8), 2697-2698.
171. Sokal, R. **1966**. Numerical Taxonomy. *Scientific American*, 215 (6), 106-116.
172. Spadaro, D.; Sabetta, W.; Acquadro, A.; Portis, E.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L. **2008**. Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiological Research*, 163 (5), 523-530.
173. Stender, H.; Kurtzman, C.; Hyldig-Nielsen, J. J.; Sorensen, D.; Broomer, A.; Oliveira, K.; Perry-O'Keefe, H.; Sage, A.; Young, B.; Coull, J. **2001**. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (2), 938-941.



174. Suárez, J.; Íñigo, B. **2004**. Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación. Tercera edición. Madrid:Ediciones Mundi-Prensa. pp. 716.
175. Sun, H.; Ma, H.; Hao, M.; Pretorius, I. S.; Chen, S. **2009**. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. *Annals of Microbiology*, 59 (1), 69-76.
176. Taniguchi, K.; Kajiyama, T.; Kambara, H. **2009**. Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. *NATURE METHODS*, 6 (7), 503-506.
177. Tessonnière, H.; Vidal, S.; Barnavon, L.; Alexandre, H.; Remize, F. **2009**. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 237–243.
178. Tofalo, R.; Chaves-López, C.; Di Fabio, F.; Schirone, M.; Felis, G. E.; Torriani, S.; Paparella, A.; Suzzi, G. **2009**. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3), 179-187.
179. Tofalo, R.; Schirone, M.; Torriani, S.; Rantsiou, K.; Cocolin, L.; Perpetuini, G.; Suzzi, G. **2012**. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, 29 (1), 18-26.
180. Tornai-Lehoczki, J.; Dlačny, D. **2000**. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 37-45.
181. Tortora, G.; Funke, T.; Case, C. **2009**. Microbiology: an introduction. Novena edición. Londres: Pearson International Edition.
182. Trung, T. T.; Hetzer, A.; Gohler, A.; Topfstedt, E.; Wuthiekanun, V.; Limmathurotsakul, D.; Peacock, S. J.; Steinmetz, I. **2011**. Highly sensitive direct detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* bacteria in environmental soil samples by using Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (18), 6486-6494.
183. Urso, R.; Rantsiou, K.; Dolci, P.; Rolle, L.; Comi, G.; Cocolin, L. **2008**. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as



- determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8 (7), 1053-1062.
- 184.van Keulen, H.; Lindmark, D. G.; Zeman, K. E.; Gerlosky, W. **2003**. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 149-154.
- 185.Varnam, A.; Sutherland, J. **1994**. Bebidas: Tecnología, química y microbiología. Zaragoza:Editorial Acribia. pp. 473.
- 186.Vasdinyei, R.; Deák, T. **2003**. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1-2), 123-130.
- 187.Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. **1995**. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.
- 188.Wang, Q. M.; Li, J.; Wang, S. A.; Bai, F. Y., Rapid Differentiation of Phenotypically Similar Yeast Species by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, 74 (9), 2604-2611.
- 189.Wang, X. D.; Bohlscheid, J. C.; Edwards, C. G. **2003**. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 349-359.
- 190.Willemsen, M.; Breynaert, J.; Lauwers, S. **1997**. Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 3 (3), 369-375.
- 191.Wittbrodt, J.; Erhardt, W. **1989**. An inexpensive and versatile computer-controlled PCR machine using a Peltier element as a thermoelectric heat pump. *Trends in Genetics*, 5 (7), 202-203.
- 192.Wong, M.; Medrano, J.F. **2005**. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39, 75-85.



193. Wu, J. J.; Ma, Y. K.; Zhang, F. F.; Chen, F. S. **2012**. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, 30 (1), 289-297.
194. Xufre, A.; Albergaria, H.; Inacio, J.; Spencermartins, I.; Girio, F. **2006**. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 376-384.
195. Yoshikawa, S.; Yasokawa, D.; Nagashima, K.; Yamazaki, K.; Kurihara, H.; Ohta, T.; Kawai, Y. **2010**. Microbiota during fermentation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce mash inoculated with halotolerant microbial starters: Analyses using the plate count method and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Food Microbiology*, 27 (4), 509-514.
196. Zagorc, T.; Maráz, A.; Cadez, N.; Jemec, K. P.; Péter, G.; Resnik, M.; Nemanič, J.; Raspor, P. **2001**. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*, 18 (4), 441-451.
197. Zavala, J. **2005**. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Vol. 7. Mérida:UADY. pp. 195.
198. Zhang, G.; Brown, E. W.; Gonzalez-Escalona, N. **2011**. Comparison of Real-Time PCR, Reverse Transcriptase Real-Time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and the FDA Conventional Microbiological Method for the Detection of Salmonella spp. in Produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (18), 6495-6501.
199. Zott, K.; Claisse, O.; Lucas, P.; Coulon, J.; Lonvaud-Funel, A.; Masneuf-Pomarede, I. **2010**. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology*, 27 (5), 559-567.
200. Zott, K.; Miot-Sertier, C.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A.; Masneuf-Pomarede, I. **2008**. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (2), 197-203.