

800.121
✓ 1-21
2005

PROYECTO FONTEC 201-2711
INFORME FINAL

"Innovación en el proceso de fermentación de la producción de vino orgánico"

Empresa Beneficiaria: Viña Carmen S.A.
Entidad Ejecutora: Viña Carmen S.A. y Universidad de Santiago de Chile.

Enero 2005

1. RESUMEN EJECUTIVO.

Viña Carmen es una de las Viñas más antiguas de Chile, siendo Don Cristian Lanz quien fundó esta viña en el corazón del valle del Río Maipo. En 1985, Viña Santa Rita S.A. adquirió los derechos del nombre Carmen, y creó una nueva razón social con el nombre de Sociedad Vitivinícola Bodegas Centenarias Ltda. En vista de su éxito a nivel nacional, en el año 1992 se decidió darle un fuerte impulso al mercado de las exportaciones, motivada por los excelentes precios en que se transan los vinos chilenos de alta calidad en los mercados del hemisferio norte. Es así como la exportación promedio de Viña Carmen a la fecha constituye un 2,3% de la exportación del total de vinos del país. Esta sociedad, se mantuvo como sociedad vitivinícola Bodegas Centenarias hasta 1996. Mediante escritura pública en el año 1996, Viña Carmen se transformó en sociedad anónima, continuadora legal de Bodegas Centenarias Ltda. Actualmente, la distribución y venta de los productos Carmen en el mercado nacional lo hace Viña Santa Rita S.A. bajo licencia de Viña Carmen S.A.

Viña Carmen ha sido pionera en la incorporación de tecnología de punta al proceso de vinificación debido al gran equipo de expertos profesionales que aseguran una alta calidad de sus vinos.

La calidad de un vino está influenciado por numerosos factores entre los que son posibles de definir el clima, el suelo y factores de índole microbiológico. El mosto o jugo de uva es transformado en vino debido al desarrollo de levaduras procedentes de la uva y de la bodega. Inicialmente existe una gran heterogeneidad de los microorganismos participantes, sin embargo, al final del proceso, cepas de levaduras pertenecientes al Género *Saccharomyces* son las responsables directas de la fermentación alcohólica. Con el fin de evitar cualquier inconveniente que pudiese traer la presencia de levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* y asegurar la calidad del producto final, actualmente a nivel industrial son agregados inóculos de levaduras *Saccharomyces* que han sido seleccionadas en distintos lugares del mundo, cuya selección se ha basado en las cualidades fisicoquímicas y organolépticas que éstas le entregan al producto final.

Durante los últimos años, a nivel mundial, existe una nueva tendencia a la elaboración de vinos, lo conocido como vino orgánico que persigue tener una elaboración lo más tradicional posible. Viña Carmen ha sido una de las pioneras de este tipo de producto, habiendo enfocado inicialmente en lograr obtener viñedos orgánicos, es decir, sin uso de fungicidas o cualquier otro producto químico en el cultivo de sus uvas.

La utilización de levaduras seleccionadas de otros ecosistemas, no propios de donde se ha cultivado la uva, es permitido en la concepción de vino orgánico. Sin embargo, Viña Carmen con el fin de entregar un producto totalmente nativo lo elabora sin adición de levaduras comerciales. Por ello, la fermentación de este vino es responsabilidad de las propias levaduras que traen las uvas del viñedo. Este tipo de fermentación hace que el proceso se realice en forma azarosa, debido a las numerosas variables tanto geográficas como climáticas. Este tipo de fermentación, por lo general, tarda sobre 21 días. El poder contar con levaduras de la misma zona donde se cultiva la uva,

permitirá asegurar la calidad del producto final año tras año disminuyendo además el tiempo del proceso fermentativo debido a que las levaduras agregadas homogenizarán toda la biota levaduriforme, imponiéndose y evitando que otras levaduras entreguen propiedades no deseadas a los vinos.

Con el apoyo de investigadores del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile, durante los años 2002-2003 se recolectaron levaduras donde Viña Carmen cultiva sus uvas de manera orgánica. Mediante el uso de técnicas microbiológicas y métodos moleculares se aislaron, identificaron y caracterizaron 206 cepas diferentes de levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el uso de metodologías biotecnológicas desarrolladas por el grupo de la Universidad de Santiago, fue posible definir que las levaduras aisladas corresponden a levaduras autóctonas y no a levaduras comerciales contaminantes que pudieron ser incorporados accidentalmente a los campos. En un primer estudio, utilizando como materia prima mosto sintético, se definieron 20 cepas de levaduras con potencialidades enológicas. Posteriormente, mediante fermentaciones en mosto natural, de variedades Cabernet Sauvignon y Chardonnay, estas levaduras fueron ensayadas. Los vinos producidos fueron analizados y degustados por nuestros enólogos, concluyendo que un subconjunto de estas levaduras entregaron resultados enológicamente interesantes. De manera de estudiar el comportamiento de estos microorganismos, pero ahora a nivel semi-industrial (180L), durante la vendimia 2004 se ensayaron 4 de estas levaduras en las mismas variedades de uvas antes señaladas. Los análisis referentes a velocidad de fermentación, análisis químicos y panel de degustación permitieron definir que las levaduras nativas entregan similares características a los vinos obtenidos con cepas comerciales, destacándose los ensayos en el vino C. Sauvignon donde una de las cepas nativas produjo vinos con un menor grado alcohólico al compararla con la levadura utilizada como control.

El proyecto desarrollado por nuestra empresa vislumbra interesantes resultados en el uso de levaduras nativas para nuestros vinos orgánicos. Debido a este hecho queremos continuar con los ensayos, pero ahora a nivel industrial. El desarrollo de este proyecto ha permitido aislar y conservar un gran número de levaduras de nuestros viñedos orgánicos, constituyendo una importante fuente para futuros estudios, así como un resguardo de nuestro propio ecosistema. La fermentación con levaduras nativas permitirá otorgar al vino un sello particular, traduciéndose en una identidad propia del producto, lo que tendría un interesante impacto a nivel comercial, así como permitirá disminuir los costos de producción como consecuencia de la reducción en los tiempos del proceso. Así también Viña Carmen podrá unir en su producto el concepto de vino orgánico desde su origen (uvas) hasta su elaboración (levaduras), concepción innovadora en este tipo de producto.

2. EXPOSICION DEL PROBLEMA.

2.1 ORIGEN DEL PROYECTO:

El interés de los consumidores en adquirir productos libres de origen o sustancias potencialmente dañinas para la salud se ha intensificado en los últimos años. Esto se comprueba en el hecho que el consumidor está dispuesto a pagar más por un producto que asegure esta condición, lo cual ha motivado a la industria de alimentos, en general, a desarrollar productos elaborados mediante métodos limpios y que respeten el medio ambiente.

La industria vitivinícola también está siendo afectada por esta tendencia. El mercado del vino no sólo se hace cada vez más exigente en cuanto a la calidad del vino que consume, sino que también se está volviendo más exigente en cuanto a sus formas de elaboración.

La industria vitivinícola nacional no puede ignorar esta tendencia, en primer lugar ahora que sus expectativas de comercio apuntan específicamente a aquellos mercados donde la condición de sanidad de origen es buscada. El efecto para la salud del consumo moderado y controlado de algunos tipos de vinos es materia de investigación en países desarrollados. Los resultados de estos estudios han generado una importante presión de los consumidores por vinos que sean producidos en forma limpia, los cuales tendrían un efecto beneficioso para la salud. Estos vinos, denominados orgánicos, son productos libres de pesticidas u otros compuestos nocivos o ajenos al proceso de elaboración natural. Si bien su proceso de producción no está estrictamente normado, existe una serie de controles que abarcan su materia prima principal, la uva. Esta debe ser producida bajo normas certificadas como producto orgánico y las empresas que producen este tipo de vino se someten a continuos controles por parte de empresas certificadores internacionales. En Chile sólo recientemente se está intentando normar sobre esta materia y, a diferencia de lo que ocurre en otras latitudes, el proyecto de norma nacional incluye también a los microorganismos participantes del proceso fermentativo, las levaduras.

Por otra parte, la industria vitivinícola nacional ha alcanzado una fase de desarrollo que puede ser definida como de transición desde una producción masiva de vino a la producción de nuevos tipos de vinos de mayor valor, como una forma de adecuarse a la mayor oferta que se está produciendo en el mercado mundial. Otros países productores de vino están aumentando sus volúmenes de producción y, por lo tanto, una de las estrategias de la industria nacional es infringir en sus vinos características que los distingan dentro de la oferta mundial. Esta individualidad está fuertemente influenciada por las formas de elaboración y los insumos de origen biológico, los cuales dada sus características de origen, difícilmente pueden ser obtenidos en otras regiones.

De las etapas existentes en la elaboración de vino, la fermentación del jugo de uva es la que mayores modificaciones ha sufrido en las últimas décadas. Esto es básicamente por la introducción en el mosto de levaduras seleccionadas en forma de inóculo que permite asegurar un proceso fermentativo controlado, con poca incidencia de detenciones y fermentaciones incompletas. Este cambio, en relación al proceso fermentativo natural, ha permitido además tener un mayor control de la calidad del vino producido, al poder disponer de cepas de levaduras particulares por tipo de producto final esperado. Sin embargo, donde mayor impacto ha tenido esta práctica, es en el tiempo que demora la fermentación. Las fermentaciones controladas por inóculo tienen un tiempo de duración de cerca de 10 días para la fermentación de vino tinto y 12 a 15 días para el blanco. Por el contrario, la fermentación natural, es decir, aquella que se realiza sin agregar inóculo, puede tomar varias semanas y la calidad del vino resultante depende de la cepa de levadura nativa que inicialmente estaba presente en el mosto y que logra imponerse finalmente. Esto hace que las fermentaciones naturales presenten una alta variabilidad en la calidad del vino producido en las distintas temporadas de producción, pudiendo ser un año de elevada calidad y al siguiente completamente distinto. Esto se debe a que la biota levaduriforme naturalmente presente en los viñedos es fuertemente influenciada por las condiciones estacionales, pudiendo perderse cepas de levaduras que sean

altamente ventajosas para la elaboración de vino o ser desplazadas por otras más eficientes.

La elaboración de vino orgánico está regulada por los distintos mercados que lo consumen y requiere de importantes modificaciones en relación al proceso tradicional. Su elaboración puede dividirse en dos etapas principales: la producción de uva orgánica y la fermentación de esta materia prima. La producción de uva orgánica sólo puede obtenerse de viñedos debidamente certificados luego de al menos tres años consecutivos de cultivo sin la adición de productos químicos de origen sintético, en especial pesticidas y fertilizantes. Además, estos cultivos deben ser aislados adecuadamente de otros cultivos tradicionales donde se apliquen compuestos sintéticos. En la etapa de vinificación está restringido el uso y la cantidad de SO₂ al igual que en los productos de terminación y filtrado.

El uso de levaduras seleccionadas en la producción de vino orgánico está permitido, siempre y cuando éstas no sean producto de modificación por metodologías de ingeniería genética. Sin embargo, la adición de levaduras seleccionadas presenta el inconveniente de inferir al vino características ajenas al lugar de producción, ya que las levaduras actualmente en uso han sido en su totalidad seleccionadas en otras regiones del planeta. Por el contrario, el uso de levaduras seleccionadas de la propia región de origen de la uva orgánica permite inculcar al producto final un auténtico sello de origen geográfico difícil de igualar por otros productos. Además, el uso de levaduras nativas y autóctonas seleccionadas disminuye el riesgo de problemas de paradas de fermentación y fermentaciones incompletas al estar estos microorganismos más adaptados a las condiciones ecológicas de la región productora.

Desde el punto de vista del producto final, el uso de levaduras nativas seleccionadas permite asegurar la calidad del vino producido en distintas temporadas. Esto debido a que al disponer de estas cepas, debidamente mantenidas en ceparios, ellas pueden utilizarse como inóculo y dominar sobre otras cepas presentes en la biota levaduriforme del mosto.

2.2. OBJETIVOS TECNICOS:

2.2.1. *Objetivo general:*

- Aislamiento, identificación y selección de levaduras nativas de la región del Valle del Maipo para la producción de vinos orgánicos de Viña Carmen.

2.2.2. *Objetivos específicos:*

- Colectar levaduras nativas de la región del Valle del Maipo.
- Identificar fisiológica y molecularmente las levaduras aisladas en la región del Valle del Maipo y verificar experimentalmente su carácter autóctono.
- Seleccionar en base a parámetros enológicos las levaduras nativas que entreguen las mejores condiciones de fermentación.
- Definir las estrategias para la producción de las levaduras seleccionadas.

Para alcanzar el logro de los objetivos específicos, se realizaron colectas de microorganismos en los viñedos orgánicos que posee Viña Carmen, así como a partir de fermentaciones de sus mostos orgánicos. Dado que se conoce que las condiciones climáticas influyen en la cantidad y calidad de los microorganismos presentes en las uvas, este objetivo se realizó mediante la realización de muestreos durante dos vendimias seguidas (años 2002 y 2003).

Posteriormente, mediante técnicas de microbiología clásica se realizó una identificación taxonómica preliminar de las levaduras colectadas en cada muestreo. Además, se realizó una caracterización molecular de las levaduras

pertenecientes al género *Saccharomyces* aisladas. Con esta información, y con la ayuda de una base datos de patrones moleculares con que cuenta el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile, se definió si las levaduras colectadas correspondían a levaduras autóctonas. Esto permitió definir que las levaduras seleccionadas no correspondían a levaduras comerciales que pudieron haber sido introducidas accidentalmente a la Viña como parte de las actividades regulares de vinificación.

Con el objeto de evaluar enológicamente a las levaduras colectadas, se realizaron microvinificaciones en mosto sintético con un subconjunto de ellas, seleccionando aquellas que entregaron las mejores condiciones fermentativas según los criterios de los enólogos de la viña. Con estas levaduras seleccionadas se realizaron nuevas microvinificaciones en mosto natural y, finalmente, ensayos en bodega con el fin de definir si el comportamiento de las cepas de levaduras seleccionadas en las microvinificaciones es mantenido bajo condiciones semi-industriales.

Por último, y con el objeto de establecer las bases para la obtención de levadura que cubra los requerimientos de la viña, se realizó un estudio de producción de levaduras.

2.3. TIPO DE INNOVACION:

Este Proyecto significa una mejora importante del proceso fermentativo necesario para la elaboración de vino orgánico. Por una parte, se pretende obtener un producto final de calidad equivalente al actualmente elaborado, incorporando a él la selección de las mejores cepas de levaduras disponibles en los terrenos de Viña Carmen y que se han seleccionado a través de años de elaboración de vinos de alta calidad, evitando de paso variaciones anuales en las propiedades organolépticas del vino elaborado. Por otra parte, se introduce una mejora significativa en el proceso fermentativo disminuyendo sobre un 50% el tiempo de fermentación. Además, es pionero en el tema de ampliar el concepto de Denominación de Origen a todos los componentes biológicos

utilizados en la elaboración de dicho producto, lo cual lo hace completamente diferenciado de otros productos de similar diseño.

Con el presente proyecto Viña Carmen cuenta con levaduras autóctonas seleccionadas de sus propios viñedos del Valle del Maipo. Esto permitirá mejorar el proceso productivo del vino orgánico sin alterar sus condiciones nativas. Concretamente las fermentaciones orgánicas dirigidas con este tipo de levaduras, disminuirán el tiempo de elaboración de sus vinos orgánicos, ya que los mostos permanecerán menor tiempo en los tanques de fermentación, pudiendo destinar estos tanques a nuevos procesos fermentativos, permitiendo así aumentar el volumen de producción de vino orgánico para exportación. De hecho el vino orgánico que hoy en día es producido en Viña Carmen es realizado con las levaduras que provienen de sus viñedos. Este proceso tarda habitualmente cerca de 21 días (vino tinto). El hecho de inocular sus mostos con levaduras nativas permitirá que la fermentación sólo tarde entre 7 a 10 días, lo que se traducirá en una mejora significativa del proceso fermentativo.

Además este proyecto permite a Viña Carmen S. A. ser propietaria y disponer de las mejores cepas de levaduras presentes en sus viñedos para la elaboración de vino. Por otra parte, el disponer de distintas cepas de levaduras permite al enólogo controlar las características del producto final adecuándolo a los distintos mercados que se pretende ocupar, sin salirse del concepto de vino orgánico. También, el adecuado mantenimiento de las cepas nativas seleccionadas permitirá obtener en distintas temporadas vino orgánico de similar calidad evitando la dominación de la fermentación por levaduras nativas de menor calidad. Además, la adecuada caracterización genética y propiedad de las cepas generadas en este Proyecto pueden ser comercializadas a otras empresas de la región para su uso, ya sea en la elaboración de vino orgánico o vino tradicional.

Para Viña Carmen S.A., este proyecto reviste gran interés ya que lo considera una etapa necesaria para el fortalecimiento de *NATIVA*, línea de productos bajo la denominación de Vino Orgánico. De hecho, Viña Carmen S. A. ejecutó un proyecto apoyado por Fontec relacionado con la primera etapa de la producción de vino orgánico tendiente a desarrollar un método de manejo de

plagas, enfermedades y nutrientes en viñedos especialmente destinados a la producción de uva orgánica. Ahora, este proyecto aborda la segunda etapa de la producción de vino orgánico y además, le agrega un componente único relacionado con una completa certificación de origen y trazabilidad de los vinos producidos, sumando un gran valor en imagen como empresa que respeta el medio ambiente y con capacidad de innovar y adaptarse a las exigencias del público. Además de lograr un producto de una calidad más uniforme en el tiempo.

3. METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO.

3.1. ACTIVIDADES:

Para alcanzar el objetivo general del proyecto se realizaron las siguientes actividades principales:

- Colecta de levaduras, vendimia 2002.
 - Identificación taxonómica de levaduras colectadas.
- Colecta de levaduras, vendimia 2003.
 - Identificación taxonómica de levaduras colectadas.
- Definición del carácter autóctono de las levaduras colectadas.
- Evaluación enológica de las levaduras colectadas
 - Fermentación en mosto sintético. Selección de 20 biotipos.
 - Fermentación en mosto natural. Selección de 4 biotipos.
 - Evaluación en bodega. Fermentación en 220 L.

3.2. METODOLOGIA:

3.2.1. Colecta de levaduras:

Ambas colectas se realizaron a partir de muestras tomadas de los viñedos orgánicos de Viña Carmen, en la Parcela de Garrido, Alto Jahuel. Esta parcela está habilitada y certificada para la producción de uva orgánica y se encuentra dividida en varios cuarteles. La uva y mosto utilizados provienen principalmente de los cuarteles 1 a 3, que comprenden un total aproximado de 10 Has con uva de la variedad Cabernet Sauvignon ubicados en la zona Oeste de la parcela, y del cuartel 7, con sobre 6 Has de uva de la variedad Chardonnay, ubicadas en el sector NorEste.

La obtención de levaduras a partir de uva se realizó mediante el lavado con agua mineral estéril de 7 racimos de uva sanos, uno de cada cuartel muestreado (1 al 7). El agua utilizada fue filtrada en cuadruplicado y todos los filtros fueron depositados sobre medio de cultivo YPD suplementado con ampicilina, estreptomicina o tetraciclina. Las colonias resultantes fueron

traspasadas individualmente a medio YPD con antibiótico y dejadas desarrollar hasta su caracterización fisiológica.

Por otra parte, para obtener levaduras a partir de mosto, se tomó mosto antes que éste entrara a los fermentadores y, con el fin de evitar cualquier contaminación con levaduras que se estén usando en bodega, se realizaron microvinificaciones que se comenzaron en el laboratorio de la empresa y se continuaron y finalizaron en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago. El mosto obtenido fue depositado en bidones plásticos de 20 L de capacidad, rotulados y dejado fermentar a 22 – 24 °C. Hacia fines de la fermentación, asépticamente se tomaron muestras y se diluyeron en agua estéril, y alícuotas de diferentes diluciones se depositaron sobre medio de cultivo YPD en placas Petri. Allí se les dejó incubar a 22 °C por 24 – 48 horas y se tomó registro del número y características morfológicas de las colonias que se originaron (figura 1).

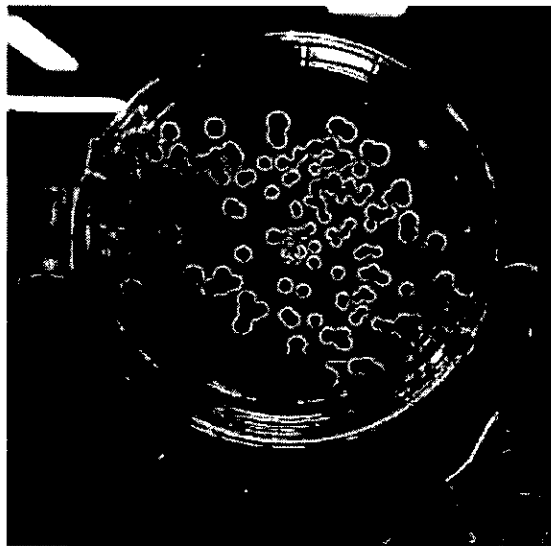


Figura 1. Ejemplo de placa Petri con colonias de levaduras obtenidas por los procedimientos señalados.

Finalmente, con el objeto de mantener vivos los distintos aislados colectados durante las etapas de muestreo se procedió a la conservación en glicerina a baja temperatura de todos ellos. De esta forma, se guardaron los aislados analizados por técnicas moleculares y en forma conjunta gran parte del resto. Se dispone de dos tubos con 1 mL de cada uno.

3.2.2. Identificación taxonómica:

La identificación taxonómica de las levaduras colectadas se realizó mediante dos aproximaciones metodológicas: habilidad para crecer sobre medio de cultivo definido (identificación fisiológica) y caracterización molecular de su genoma (identificación molecular).

3.2.2.1. Identificación fisiológica:

La identificación primaria de los aislados se realizó mediante replica en placa en medios YPD y agar WL-lisina (Oxoid), seleccionando aquellas colonias que carecían de la habilidad de crecer en este último medio. Esta metodología permite separar e identificar aquellos aislados pertenecientes al género *Saccharomyces*.

3.2.2.2. Identificación molecular:

Para una identificación más precisa de la posición taxonómica de los aislados, fue necesario el uso de técnicas más sofisticadas, a nivel del DNA de los microorganismos. En base a esto, al realizar un análisis de amplificación molecular de la región del DNA ribosomal de la levadura y posterior digestión con enzimas de restricción, se permite identificar diferentes especies de levaduras (Esteve-Zarzoso y col., 1999.; Guillamón y col., 1998). Para ello se obtuvo DNA de cada aislado mediante el sistema Wisard[®], Genomic DNA, purification Kit (Promega, USA). Este DNA fue sometido a amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores ITS1 e ITS4. Los productos de la amplificación fueron separados

mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio en un transiluminador a 260 nm. Un fragmento amplificado de 880 pb permitió seleccionar aquellos aislados pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Finalmente, para resolver entre estas dos especies, se sometió este fragmento amplificado a tratamiento con las enzimas de digestión *Cfo* I, *Hae* III y *Hin* fI y comparación del tamaño de los fragmentos de restricción con lo descrito por Esteve-Zarzoso y col. (1999).

3.2.3. Definición del carácter autóctono de las levaduras colectadas:

Para definir si las cepas seleccionadas corresponden a cepas comerciales o derivadas recientes de éstas y, además, son propias de la zona de colecta, se aplicó un método recientemente desarrollado que permite comparar patrones moleculares de los aislados en base al cálculo de las distancias genéticas entre las cepas analizadas. Esto permite agrupar las cepas según su origen geográfico y este agrupamiento es útil para inferir si una cepa es autóctona de la región donde esta fue colectada (Martínez y Ganga, 2002., Martínez y col. 2004). Para ello se realizó una caracterización molecular de las levaduras colectadas mediante las técnicas de restricción del DNA mitocondrial y cariotipo electroforético.

3.2.3.1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial:

La digestión del mtDNA con enzimas de restricción se realizó utilizando el método desarrollado por Querol y cols. (1992). Para ello, 1 microgramo de DNA de la levadura fue digerido con una unidad de la enzima de restricción *Hin*fI (10 U/microlitro) en tampón H 10x (Boehringer Mannheim) por 3 h a 37 °C. Las bandas generadas de la restricción del mtDNA fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5x a 70 volt y visualizadas por tinción con bromuro de etidio con un transiluminador UV (TCP-20.M, Vilber Lourmat). Todos los geles de las digestiones fueron fotografiados con una cámara digital (DC120, Kodak) para mantener un registro. En consideración que la distancia migrada por los fragmentos de restricción es

inversamente proporcional al logaritmo de su longitud en pares de bases, los tamaños de los fragmentos obtenidos se determinaron comparándolos con fragmentos cuyos tamaños son conocidos. Para esto, el DNA del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Winkler & Zawadzky Ltda.) se utilizó como marcador de tamaño molecular y mediante el programa computacional Quantity One (Bio-Rad) se obtuvieron los tamaños de los fragmentos de los perfiles de restricción para cada cepa.

3.2.3.2. Análisis del cariotipo electroforético:

Para la obtención de los patrones de cariotipo electroforético se realizaron preparaciones de cromosomas intactos de levadura según el método modificado de Swartz y Cantor (1984).

Para esto, cultivos de 50 mL en YPD fueron crecidos a 27 °C toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación a 3200 rpm por 5 min a 15 °C (Centra MP4R, Thermo IEC) y se lavaron dos veces con EDTA 50 mM pH 8,0. Luego, las células se resuspendieron en un volumen de no más de 1 mL de EDTA 50 mM pH 8,0 y se incubaron con 2,5 mg de zimoliasa 20T (Seikagaku Corp.) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con 3 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en EDTA 125 mM previamente fundida y mantenida a 42 °C y rápidamente la mezcla se vertió en moldes para generar así bloques de agarosa que contendrán los cromosomas intactos de levadura. Estos bloques se mantuvieron sumergidos en solución LET con 2 mg de zimoliasa 20T por 16 h a 37 °C. Luego, se lavaron los bloques dos veces con EDTA 50 mM y se incubaron durante 24 h a 50 °C en solución NDS conteniendo 0,5 mg/mL de proteinasa K (Gibco-BRL). Finalmente, se realizaron seis lavados con TE a intervalos de 30 minutos, tres a 50 °C y tres a temperatura ambiente. Los bloques fueron conservados en EDTA 50 mM pH 8,0 a 4 °C. La separación de las bandas cromosómicas se realizó mediante electroforesis de campo pulsado en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0,5x utilizando un aparato CHEF DRII (Bio-Rad), con el siguiente programa: el primer bloque con un pulso de 60 s por 12 h y el segundo de 120 s por 12 h, ambos a 6 V/cm, 14 °C, y un ángulo

de 120°. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados con un transiluminador UV y registrados fotográficamente. Se utilizó la cepa tipo YNN 295 como marcador de tamaño molecular cromosómico. Utilizando el programa Quantity One se obtuvieron los tamaños de las bandas cromosomales de cada cepa analizada, teniendo en cuenta que los fragmentos de DNA sobre cientos de kilobases muestran una movilidad electroforética a través de la matriz de agarosa inversamente proporcional a su tamaño.

3.2.4. Fermentación en mosto sintético:

Para evaluar la capacidad fermentativa de las cepas colectadas, se procedió a fermentar con ellas mosto sintético (0.05% ácido tartárico, 0.05% ácido málico, 0.003% cloruro de calcio, 0.013% sulfato de magnesio, 0.012% fosfato de amonio, 2.1% azúcar, 0.025% hidróxido de potasio). Estas microvinificaciones se hicieron en duplicado y, para ello, se inocularon $>10^6$ ufc/mL de la levadura en matraces de 500 mL que contenían 200 mL del mosto. Los cultivos fueron mantenidos en estufa de cultivo a 16 y 22 °C, evaluándose la pérdida de peso del sistema hasta la finalización de la fermentación. Los datos de peso se interpretan como pérdida de CO₂ y se graficaron contra el tiempo de fermentación, con lo cual es posible deducir parámetros como velocidad de fermentación. Además, al final del periodo de fermentación, se procedió a la toma de muestra del vino producido y se analizó la concentración de azúcares reductores y el nivel de acidez volátil según lo descrito por Bordeau y Scarpa (1998). Paralelamente se evaluó la concentración de etanol producido mediante un sistema de detección enzimático (R-Biopharm, Roche), según instrucciones del fabricante.

3.2.5. Fermentación en mosto natural en laboratorio:

Durante la vendimia 2003 se separaron y congelaron 200 L de mosto orgánico tinto (Cabernet Sauvignon) y 200 L de blanco (Chardonnay). Este mosto fue mantenido a -20 °C en dependencias de la Universidad de Santiago de Chile y fue utilizado en el mes de Diciembre de dicho año para micro-

vinificaciones con las veinte cepas seleccionadas en los experimentos con mosto sintético. Además, se incluyeron dos cepas de uso comercial, una para tinto, EC1118, y otra para blanco, FA362. Para ello, se establecieron fermentaciones de 2,5 L de mosto en garrafas de vidrio de 5 L de capacidad (figura 2). En el caso de la fermentación tinto, se consideró dos tercios del volumen con mosto y un tercio con orujo. La concentración de sólidos solubles inicial en el mosto tinto fue de 23 °Brix y del blanco 23,3 °Brix. Las microvinificaciones se realizaron a 16 y 26 °C para blanco y tinto respectivamente, y fueron llevadas a cabo en la planta piloto de la Facultad Tecnológica de la Universidad de Santiago.

Las micro-vinificaciones fueron iniciadas mediante la inoculación de los mostos con las levaduras a una concentración final promedio de 5×10^6 ufc/mL, precultivadas en el mismo mosto pasteurizado a 60 °C por 10 minutos. Cada 2 días se tomaron 5 mL del mosto fermentando y se congeló para los análisis químicos. Además, la fermentación se siguió mediante evaluación de la densidad mediante el uso de un picnómetro. Finalizada la fermentación, cuando la densidad se hizo estable a aproximadamente 995 Kg/L se procedió a embotellar el vino producido e iniciar los análisis químicos correspondientes (alcohol, glicerol, acidez, pH y azúcar reductores).

A partir de estos resultados unidos a un panel de degustación realizado por los enólogos de la empresa, se seleccionaron 4 cepas para fermentar mosto natural en mayor escala.