

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2016-2018

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: VALDÉS LA HENS

NOMBRES: Danay

Dirección Particular: Calle: Localidad: Bernal

CP: 1876 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

- Bacterias lácticas psicrótrofas para vinificaciones a bajas temperaturas.

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) bacterias lácticas psicrótrofas fermentación maloláctica

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 24-11-2016

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 24-11-2016

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Quilmes

Facultad: -----

Departamento: Departamento de Ciencia y Tecnología

Cátedra: -----

Otros: Laboratorio de Microbiología Molecular

Dirección: Calle: Roque Sáenz Peña Nº: 352

Localidad: Bernal CP: B1876BXD Tel: 011-4365 7100

Cargo que ocupa: Profesor Adjunto Ordinario DE

5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: SEMORILE, Liliana Carmen

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: B1900BAV Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1º-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Seleccionar y evaluar la aptitud de cepas de bacterias lácticas de las especies *O. oeni* y *Lb. plantarum* para conducir FML exitosas a bajas temperaturas. Se estudian características fisiológicas de las bacterias en condiciones de vinificación (viabilidad, capacidad de implantación, consumo de ácido L-málico, producción de ácido L-láctico) y se analizan los mecanismos celulares que les permiten sobrevivir y desarrollar sus actividades metabólicas en esta condición. Se evaluará si dichas características se asocian a la tolerancia/ resistencia a otros factores de estrés del vino, como etanol y pH. El perfil transcripcional de genes clave permitirá analizar mecanismos no medibles por parámetros fisiológicos, como la expresión de proteínas de estrés. Esta investigación permitirá profundizar la caracterización de cepas nativas patagónicas y del SO bonaerense, optimizando los criterios de selección a fin de formular cultivos iniciadores con buena performance maloláctica a baja temperatura y capacidad de potenciar el carácter regional de vinos tintos.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

El empleo de cultivos iniciadores malolácticos psicrótrofos, formulados con cepas nativas de BAL, resulta una valiosa herramienta para mejorar los procesos regionales de vinificación que ocurren a bajas temperaturas. Con este propósito, y en una primera etapa, se lograron obtener aislamientos psicrótrofos aplicando bajas temperaturas de incubación (30 días) de muestras de vino como presión de selección. Así se logró disponer de una colección de BAL con capacidad de mantenerse viables a temperaturas inferiores a 15 °C.

Como primer criterio tecnológico de selección de los aislamientos obtenidos se evaluó su tolerancia a sobrevivir en vino estéril incubado a bajas temperaturas. En las condiciones ensayadas, el 80% de los aislamientos de cocos se mantuvieron viables y sólo el 45% de los lactobacilos, sugiriendo que la población de cocos psicrótrofos en el vino era superior en número y/o poseía mejor capacidad de adaptación que la de lactobacilos. La pre-adaptación de las bacterias al ambiente vino, mediante un tratamiento de aclimatación por 48 h, mejoró su viabilidad en vino cuando se las inoculó en una concentración de 107 UFC/mL. En próximos ensayos, se optimizará este tratamiento de aclimatación, probando temperaturas de incubación inferiores a 21 °C (15 y 18 °C).

El análisis de consumo de ácido L-málico en el vino estéril mostró que los lactobacilos tuvieron mayor capacidad, en menor tiempo de incubación, que los cocos, que no lograron agotar el ácido presente en los 20 días de incubación examinados.

En relación al examen del grado de similitud genética entre aislamientos de cocos y de lactobacilos demostró la existencia de diversidad intra-específica en ambos casos, considerando que todos los aislamientos se obtuvieron de una única muestra de vino. Posteriormente, la secuenciación de un fragmento del gen16S rRNA permitió identificar los aislamientos, hallándose que los 16 aislamientos de cocos mostraron identidad con la especie *O. oeni* y los 9 aislamientos de lactobacilos con la especie *Lb. hilgardii*.

Ensayos de vinificación con dos cepas seleccionadas, UNQOe.19 (*O. oeni*) y UNQLh1.1 (*Lb. hilgardii*), mostraron la capacidad de ambas cepas para implantarse en vino, mantenerse viables y consumir ácido L-málico.

En estudios previos demostramos que en FML espontáneas de vinos patagónicos de los varietales Pinot noir y Merlot, las especies de lácticas dominantes eran *Lb. plantarum* y *O. oeni* (Valdés La Hens et al., 2015). Por esta razón resultó sorprendente la no recuperación de cepas psicrótrofas de *Lb. plantarum*, a partir del vino Pinot noir empleado. Esto motivó que se analizara la tolerancia al vino estéril incubado a bajas temperaturas de 7 cepas patagónicas de *Lb. plantarum* del cepario del LMM – UNQ. Todas se mantuvieron viables y fueron capaces de consumir ácido L-málico, destacándose UNQLp11, que también mostró capacidad de implantarse en vino no estéril.

Como necesario control de inocuidad de las cepas a utilizar en iniciadores malolácticos también se evaluó la presencia de los genes *hdc* y *ptc*, codificantes de enzimas para la síntesis de las aminas biogénicas histidina y putrescina, en las 16 cepas psicrótrofas de *O. oeni* y las 9 de *Lb. hilgardii*, no detectándose ninguno.

Asimismo, se inició el análisis de modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática, evaluando el potencial Z en las cepas psicrótrofas UNQOe19 y UNQOe4, seleccionadas por su mejor comportamiento en vino. Se halló una correlación positiva entre la disminución de la viabilidad celular en vino sintético y los valores de potencial Z a bajas temperaturas.

Actualmente se están probando nuevas condiciones de aclimatación, utilizando las cepas psicrótrofas UNQOe19 y UNQOe4 y empleando como control la cepa de *O. oeni* ATCC 27310, examinando en las mismas la inducción de 7 genes de estrés (*dnaK*, *hsp20*, *csp*, *rmlB*, *ldhD*, *gyrA* y *atpB*). Los ensayos se realizan a dos temperaturas, 18 y a 21 °C, esta última como control, y con distintos tiempos de incubación, observando diferencias en la expresión de los genes de estrés. Hasta el momento se destaca *hsp20*, que exhibe mayor expresión en las cepas psicrótrofas respecto de la cepa control.

Asimismo, se obtuvo la secuencia genómica de UNQOe19, la cual ha sido depositada en el GenBank, y se logró su completo ensamblaje. A partir del genoma completo de esta cepa psicrótrofa de *O. oeni* se analizará la presencia de genes de tolerancia a estrés térmico.

Referencias

- Valdés La Hens D, Bravo-Ferrada BM, Delfederico L, Caballero A, Semorile L. Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes. *Australian Journal of Wine and Grape Research* 2015, 21 (1): 49-56. Wiley Online Library, ISSN 1755-0238.

8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

8.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

Capítulo de Libro:

- Indigenous Lactic Acid Bacteria Communities Associated with Spontaneous Malolactic Fermentations in Patagonian Wines: Basic and Applied Aspects. Valdés La Hens D, Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Tymczynszyn EE, Hollmann A, Delfederico L, Semorile L (2016). In *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms* (pp. 225-248). Part II – Patagonian microorganisms for industrial and sanitary applications. Chapter 14 - Ed.: Olivera N, Libkind D, Donatti E. Springer, Berlín, 2016. ISBN 978-3-319-42801-7.

During winemaking, complex microbial interactions take place and microorganisms showing a selective advantage emerge in a given period as the dominant populations. At the beginning, yeasts, responsible for the alcoholic fermentation (AF), consume sugars present in grapes to yield ethanol and carbon dioxide, leading the transformation of must into wine. The tolerance of lactic acid bacteria (LAB) to low pH and high ethanol are the main factors that select their occurrence in winery ecosystems. LAB guide a secondary biological process, the malolactic fermentation (MLF), which produces deacidification of wine, enhancing its microbial stability and modifying the wine aroma profile. When MLF takes place spontaneously, it is carried out by one or more species of indigenous LAB present in grapes and cellars, naturally adapted to the regional peculiarities of wine. Thus, it is highly advisable to study the indigenous microbiota, best adapted to the agro-ecological conditions of a specific wine-producing area, to select the most representative strains with terroir characteristics for their use as starter cultures. In this chapter, we summarize the studies conducted so far on LAB population diversity in some Patagonian wines, as well as the methods and criteria to select potential indigenous malolactic cultures for these wines, including the adaptation to processing conditions.

Trabajos publicados:

- Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Valdés La Hens D, Hollmann A, Delfederico L, Caballero AC, Tymczynszyn EE, Semorile L. *LWT – Food Science and Technology* 2017 April, 77: 348-355. ISSN 0023-6438.

During winemaking, complex microbial interactions take place and microorganisms showing a selective advantage emerge in a given period as the dominant populations. At the beginning, yeasts, responsible for the alcoholic fermentation (AF), consume sugars present in grapes to yield ethanol and carbon dioxide, leading the transformation of must into wine. The tolerance of lactic acid bacteria (LAB) to low pH and high ethanol are the main factors that select their occurrence in winery ecosystems. LAB guide a secondary biological process, the malolactic fermentation (MLF), which produces deacidification of wine, enhancing its microbial stability and modifying the wine aroma profile. When MLF takes place spontaneously, it is carried out by one or more species of indigenous LAB present in grapes and cellars, naturally adapted to the regional peculiarities of wine. Thus, it is highly advisable to study the indigenous microbiota, best adapted to the agro-ecological conditions of a specific wine-producing area, to select the most representative strains with terroir characteristics for their use as starter cultures. In this chapter, we summarize the studies conducted so far on LAB population diversity in some Patagonian wines, as well as the methods and criteria to select potential indigenous malolactic cultures for these wines, including the adaptation to processing conditions.

8.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación)*

de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

- Survival and implantation of indigenous psychrotrophic *Oenococcus oeni* strains during malolactic fermentation in a Patagonian Pinot noir wine. Camila Manera, Nair T Olguin, Bárbara M Bravo-Ferrada, E Elizabeth Tymczyszyn, Lucrecia Delfederico, Liliana Semorile, Danay Valdés La Hens. En evaluación en International Journal of Food Microbiology.

Spontaneous malolactic fermentation (MLF) in Argentinean North Patagonian region may have to face low environmental temperatures, an important stress factor for lactic acid bacteria (LAB) that guides this process. Therefore, the induction of MLF by inoculation of native starter cultures able to lead this biological process at low temperatures, preserving the regional character of wine, has been encouraged. The goal of this work was to obtain autochthonous *Oenococcus oeni* strains, able to remain viable and to consume L-malic acid when MLF takes place at temperatures lower than 15 °C. Of the psychrotrophic LAB isolates obtained from a Pinot noir wine at spontaneous MLF stage, sixteen strains were identified as *O. oeni* by sequencing of 16S rRNA gene. The molecular typing by RAPD PCR using M13 primer, allowed the differentiation of 5 genotypic groups. After a first study of the strains based on their viability and metabolic performance in sterile wine at low temperatures, two strains (UNQOe4 and UNQOe19) were selected to evaluate their behavior in non-sterile wine (laboratory scale) incubated at 4 and 10 °C. In this condition, they showed a good implantation capacity and were able to successfully conduct the MLF, suggesting their employment as suitable starter cultures to improve this biological process in a wine region where at time of MLF of red wines the environment temperatures can be low.

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

Lactobacillus plantarum as a malolactic starter culture in winemaking: a new (old) player?. Brizuela N.S., Tymczyszyn E.E., Semorile L., Valdes La Hens D., Delfederico L., Hollmann A. and Bravo-Ferrada B.M. (Para ser enviado al Electronic Journal of Biotechnology).

Abstract

Abstract

Malolactic fermentation (MLF) is the process responsible for the conversion of L-malic acid to L-lactic acid and CO₂, which reduces total acidity, improves biological stability and modifies the aroma profile of wine. MLF takes place during or after alcoholic fermentation and is carried out by one or more species of lactic acid

bacteria (LAB) present in grapes and cellars. Traditionally, *Oenococcus oeni* is the major LAB used in commercial starter cultures for MLF. Although, in the last decade some *Lb. plantarum* were reported as malolactic starters; many works showed that *Lb. plantarum* strains can survive and even grow in harsh condition of wine (i.e. high ethanol content and low pHs). Furthermore, it was proved that some strains of *Lb. plantarum* were able to conduct MLF just as efficiently as *O. oeni*. In addition, *Lb. plantarum* exhibits a more diverse enzymatic profile than *O. oeni*, which could play an important role in the modification of the wine aroma profile. This enzymatic diversity allows the possibility to obtain several starter cultures, composed of different *Lb. plantarum* biotypes, which could result distinctive wines. In this context, this review focuses on showing the relevance of *Lb. plantarum* as a MLF starter culture in winemaking

8.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

- Aislamiento y selección de cepas psicotolerantes de bacterias lácticas enológicas de la región Patagónica. Manera C, Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Delfederico L, Olguín NT, Semorile L, Valdés La Hens D. Publicación digital completa en IV Congreso Científico Tecnológico - Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, 1-09-2017.

- Molecular tools for selection and characterization of lactic acid bacteria associated with Patagonian red wines. Brizuela NS, Manera C, Bravo-ferrada BM, Valdés La Hens D, Hollmann A, Olguin NT, Caballero A, Delfederico L, Tymczyszyn EE, Semorile L. XXth GIESCO 2017-International Meeting about Sustainable Viticulture and Winemaking in Climate Change Scenarios, November 5-10, 2017 Mendoza, Argentina.

- Isolation and selection of psychrotolerant strains of indigenous Lactic Acid Bacteria from Patagonian wines. Manera C, Tymczyszyn E.E, Delfederico L, Caballero AC, Semorile L, Valdés La Hens D. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 7° Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos, 3er Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, 18 al 20-09-17.

- Isolation and characterization of wine psychrotolerant lactic acid bacteria. C Manera, EE Tymczyszyn, L Delfederico, AC Caballero, L Semorile, D Valdés La Hens. V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas - SIBAL, Tucumán, Argentina, 2016. Modalidad Poster.

- Evaluation of indigenous lactic acid bacteria associated with Patagonian wines for their use as malolactic starter cultures. D Valdés La Hens, BM Bravo-Ferrada, NS Brizuela, E Tymczyszyn, A Hollmann, L Delfederico, AC Caballero, L Semorile. V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas - SIBAL, Tucumán, Argentina, 2016. Modalidad Exposición oral

8.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

9.2 PATENTES O EQUIVALENTES *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

- Proyecto PDTS CIN CONICET N° 173 - Vinos patagónicos: estrategias de innovación para un terroir único.

Se desarrolla en colaboración con el grupo de investigación dirigido por la Dra. Adriana Caballero, de la Universidad Nacional del Comahue, que es la Investigadora Responsable. La Dra. Semorile integra el Grupo Responsable y la Dra. Valdés La Hens el Grupo de Colaboradores.

Los objetivos de este PDTS son: 1. Seleccionar levaduras y bacterias del ácido láctico (BAL) indígenas de la Patagonia destinadas al desarrollo de cultivos iniciadores para la elaboración de vinos tintos regionales de calidad controlada y diferencial. 2. Contribuir al agregado de valor de estos productos. 3. Sustituir insumos importados.

El organismo financiador del proyecto es el CIN, con fondos de la SPU - ME. Participan además tres posibles adoptantes, que son las empresas patagónicas Bodega Humberto Canale SA, Cooperativa Agropecuaria Valle Azul (Bodega La Balsa) y Viñedos San Sebastián, quienes expresaron su conformidad en relación a los avances del proyecto (Informe de Avance PDTS N° 173, presentado en 09-2017).

La labor realizada en el Laboratorio de Microbiología Molecular corresponde parcialmente al Objetivo I del Proyecto: Aislar, identificar, seleccionar y aclimatar cepas psicrótrofas de BAL indígenas de la Patagonia, de las especies *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni*, destinadas al desarrollo de cultivos iniciadores de fermentaciones malolácticas (FML) que enfrentan condiciones de bajas temperaturas.

Este proyecto finalizará en el transcurso del corriente año.

- Proyecto de Innovación y Transferencia CIC - BA (PIT-AP-BA N° 173 - Resolución CIC-BA N° 428/16): Análisis de la microbiota de suelos, mostos y vinos de viñedos ubicados en la Provincia de Buenos Aires como primer abordaje para caracterizar el terroir de los vinos bonaerenses. Directora Dra. L. Semorile; la Dra. Valdés La Hens es investigadora mismo. Participan también dos grupos de investigación de la FCE - UNLP y los establecimientos bonaerenses Bodega Saldungaray y Al Este Bodega y Viñedos.

La microbiota de las uvas tiene el potencial de modificar las propiedades organolépticas del vino, contribuyendo a la expresión del terroir regional del mismo. Por su parte, las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de la vid pueden cumplir funciones específicas en la resistencia a enfermedades y en la

productividad. La comprensión de los factores que influyen regionalmente en la selección de ciertos microorganismos puede proporcionar información útil para elegir las prácticas de manejo más adecuadas para optimizar las propiedades del vino. En una primera etapa se propone aplicar métodos metagenómicos y bioinformáticos para analizar la microbiota de mostos, vinos y suelos de viñedos y bodegas bonaerenses, y así aportar a la construcción de un terroir local y distintivo de otras regiones vitivinícolas más desarrolladas en el país. En una segunda etapa, y mediante estudios de metatranscriptómica y metabolómica, se podrá avanzar en un análisis global de la microbiota del vino, a través de la evaluación de los distintos procesos metabólicos que tienen lugar al momento de la obtención de la muestra y que serán los responsables del complejo conjunto de aromas y sabores del vino. La aplicación de estos conocimientos a la producción de vinos bonaerenses contribuirá a que los mismos logren una marca distintiva y reconocible para los consumidores locales e internacionales.

9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES (*desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.*).

9.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

Co-Dirección de la Beca Doctoral CIC-BA de la Lic. Biotecnología Camila Manera
Tema de investigación: Selección y caracterización de cepas psicrótrofas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* de interés enológico. Período: 1-04-2017 a 31-3-2018. No se solicitó renovación de la misma.

13. DIRECCION DE TESIS. *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

Dirección de Tesis de Grado de la estudiante de Lic. Biotecnología Camila Manera.
Tema: Selección de cepas psicrotolerantes de bacterias lácticas indígenas de vinos patagónicos. Desde 9-2015 a 2-2017. Co-director: Dra. Liliana Semorile.

14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Descrito en ítem 8.5.

- Participación del V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas - SIBAL, Tucumán, Argentina, 2016. Se realizó la exposición oral del trabajo Evaluation of indigenous lactic acid bacteria associated with Patagonian wines for their use as malolactic starter cultures. D Valdés La Hens, BM Bravo-Ferrada, NS Brizuela, E Tymczynszyn, A Hollmann, L Delfederico, AC Caballero, L Semorile. .

15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Institución otorgante CIC-BA. Subsidio a Investigadores CIC-BA 2017. El monto solicitado se destinará a la adquisición de insumos como: medios de cultivo, primers para tipificación bacteriana y cajas de Petri.

17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

- Proyecto I+D Bacterias lácticas psicotolerantes para vinificaciones patagónicas a bajas temperaturas. Director: Dra. D Valdés La Hens, Inicio: 1-05-2015, finalización 30-04-2019. Proyecto integrante del Programa Microbiología Molecular Básica y Aplicada, Directora Dra. L Semorile, Organismo financiador Universidad Nacional de Quilmes. Resolución (R) N° 657/15.

- Proyecto I+D PIP (11220170100898C): Selección de cepas patagónicas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* para iniciadores malolácticos mediante análisis del comportamiento transcripcional de genes vinculados a modificaciones del perfil aromático de vinos tintos. Director: Dra. BM Bravo-Ferrada, Grupo colaborador: Dra. NT Olguin, Dra. D Valdés La Hens. Período: 4/2017 a 4/2019.

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

- Profesora Adjunta de la asignatura Microbiología General, 2016 hasta la fecha, Universidad Nacional de Quilmes, 8 hs semanales.

- Profesora de la asignatura Sistemas Biológicos de Producción, Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Quilmes. 40 hs totales.

21. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Título: Evaluación del proceso adaptativo y la capacidad de implantación de BAL psicrótrofos en vinificaciones a bajas temperaturas.

Objetivo general: Explorar la aptitud de cepas enológicas de *O. oeni* y *L. plantarum* para sobrevivir y desarrollar sus actividades metabólicas en condiciones de estrés ambiental, evaluando la expresión de genes de estrés y seleccionando las más adecuadas para optimizar procesos de FML desarrollados a baja temperatura ambiente.

Objetivos Específicos

- i- Selección de nuevas cepas psicrótrofas patagónicas de *Lb. plantarum*.
- ii- Evaluación de su comportamiento en vino estéril incubado a bajas temperaturas (viabilidad celular y evolución del proceso fermentativo).
- iii- Evaluación de la capacidad de implantación en vino no estéril de las cepas seleccionadas en el ítem ii.
- iv- Análisis de cambios en la fluidez de la membrana plasmática de cepas seleccionadas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*.
- v- Identificación de marcadores moleculares relevantes, relacionados con la adaptación a bajas temperaturas. Comparación entre cepas psicrótrofas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*.
- vi- Seguimiento de vinificaciones, a escala de laboratorio, mediante análisis del perfil transcripcional de genes de estrés en las condiciones empleadas.

Actividades experimentales:

- Aislamiento de cepas psicrótrofas de *Lb. plantarum*: se emplearán estrategias que permitan seleccionar este tipo de cepas a partir de vinos en etapa final de FA. Se propone realizar un enriquecimiento previo del vino, mediante incubación del mismo a 15 y a 18 °C, durante 30 días. Los aislamientos se identificarán presuntivamente mediante PCR con primers específicos.

- Aclimatación: los aislamientos que presuntivamente correspondan a la especie *Lb. plantarum* se someterán a aclimatación en medio conteniendo 6% etanol v/v, a 18 y a 15 °C, durante 48 h, a pH 3,5. Se inocularán en vino estéril en concentraciones de 10⁶ y 10⁷ UFC/mL, para evaluar su viabilidad. Dado que las condiciones de aclimatación son específicas de cepa, resulta necesario probar diferentes temperaturas (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2016).

- Inoculación en vino estéril: las cepas aclimatadas de *Lb. plantarum*, se inocularán (10⁶ – 10⁷ UFC/mL), por triplicado, en 100 ml de vino en etapa final de FA, esterilizado por filtración. Se incubarán a 10 y 15 °C durante 30 días. La viabilidad celular se medirá por cultivo en placa (UFC/mL). Como control se realizarán incubaciones de 100 ml de vino, por triplicado, a 21 °C. Asimismo, se medirán los cambios en la concentración de los ácidos L-málico y L-láctico mediante kits enzimáticos.

- Identificación y tipificación: Los aislamientos capaces de mantenerse viables y consumir ácido L-málico en vino estéril, a las temperaturas bajas ensayadas, se identificarán mediante secuenciación del gen 16S rRNA y se tipificarán a través de perfiles de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) con el primer M13.

- Análisis de viabilidad y de consumo de ácido L-málico en vino estéril: los cultivos aclimatados se inocularán (1 x 10⁷ UFC/mL) en vino Pinot noir estéril, que se incubarán

a 10, 15, 18 y 21 °C (control). Se tomarán muestras los días 0, 5, 10, 15 y 20, para determinar viabilidad celular y concentración remanente de ácido L-málico (g/L).

- Ensayos de vinificación a escala de laboratorio: para evaluar la capacidad de implantación y la performance maloláctica (viabilidad, consumo de ácido L-málico, producción de ácido L-láctico) en vino no estéril (presencia de biota nativa), incubado a bajas temperaturas, se seleccionarán las cepas de *Lb. plantarum* que hayan exhibido mejor comportamiento en vino estéril. Se inocularán cultivos aclimatados en muestras de vino Pinot noir, las cuales se incubarán a 10, 15, 18 y 21 °C. La capacidad de implantación se determinará tomando 10 colonias al azar de las placas para recuento de viables, las cuales se someterán a análisis por RAPD-PCR con el primer M13, comparando los perfiles obtenidos con los de las cepas inoculadas.

- Análisis de cambios en la fluidez de la membrana plasmática de las cepas psicrótrofas seleccionadas: cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum* se aclimatarán en distintas condiciones para evaluar cambios en la membrana plasmática, y simultáneamente evaluar la viabilidad y la capacidad de consumo del ácido L-málico en vino sintético, a bajas temperaturas de incubación. Las cepas se crecerán en caldo MLO y MRS según corresponda, para luego someterlas al tratamiento de aclimatación. Luego se inocularán en vino sintético (Bravo-Ferrada et al., 2015), que se incubará a 10, 15, 18 y 21 °C. Las medidas de potencial Z se realizarán a las 24 h y a los 5 días de incubación, en un equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 (CIDCA – UNLP).

- Identificación de marcadores moleculares relevantes para la adaptación de las bacterias a bajas temperaturas: se continuará evaluando distintas condiciones de aclimatación y posterior inoculación en vino de cepas psicrótrofas de *O. oeni*. Se incluirán las cepas seleccionadas de *Lb. plantarum*. Se evaluará el nivel de transcripción de los genes *dnaK*, *hsp20*, *csp*, *rmlB*, *ldhD*, *gyrA* y *atpB* (Olguin et al., 2009, 2010) en medio de aclimatación y en vino estéril a distintas temperaturas. Las cepas se crecerán hasta fase exponencial en caldo MRS o MLO, según corresponda. Luego, se centrifugarán (5.000 x g, 15 min, 4 °C), se lavarán dos veces en buffer fosfato, pH 7,0 y se aclimatarán o no, para luego inocularlas en vino sintético. Se tomarán 10 ml de vino de cada condición ensayada. Para la extracción de RNA total bacteriano se empleará el kit comercial EasyPure RNA® (TransGen Biotech). La concentración de RNA se cuantificará mediante Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA).

Referencias:

- Bravo-Ferrada, B.M., Hollmann, A., Delfederico, L., Valdés La Hens, D., Caballero, A., Semorile, L., 2013. Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 29, 1537-1549.
- Bravo-Ferrada, B.M., Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A., Semorile, L., 2014. Effect of acclimation medium on cell viability, membrane integrity and ability to consume malic acid in synthetic wine by oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *J. Appl. Microbiol.* 116, 360-367.
- Bravo-Ferrada, B.M., Hollmann, A., Brizuela, N., Valdés La Hens, D., Tymczyszyn, E.E., Semorile, L., 2016. Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiol.* 61, 365-373.
- Olguín, N., Bordons, A., Reguant, C., 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26, 197-203.
- Olguín, N., Bordons, A., Reguant, C., 2010. Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *Int. J. of Food Microbiol.*, 144, 88-95.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- C. Sistema SIBIPA:
- Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.