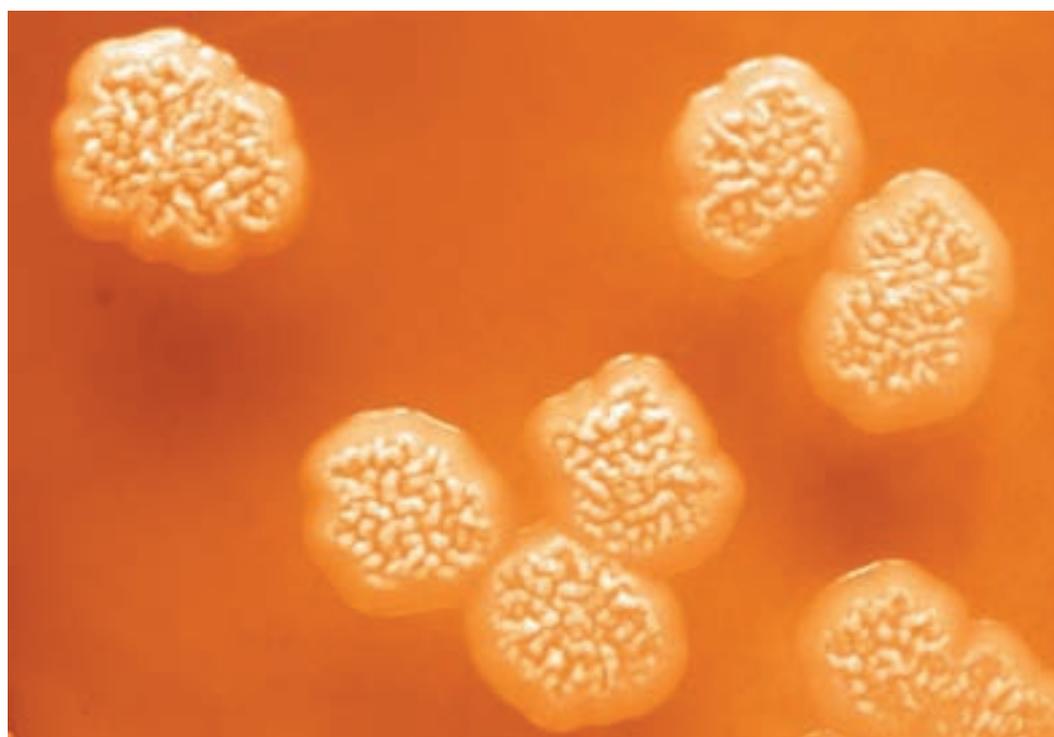


Recursos genéticos microbianos de origen sidrero

ROSA PANDO BEDRIÑANA. Área de Tecnología de los Alimentos. rpando@serida.org

BELÉN SUÁREZ VALLES. Jefa del Área de Tecnología de los Alimentos. mbsuarez@serida.org

→
Colonias de levaduras.



Los microorganismos son el grupo de seres vivos menos conocido y con más potencialidad. Desde tiempos remotos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de antibióticos, vitaminas y aminoácidos, en la fabricación de solventes y reactivos y en la elaboración de alimentos (pan, queso, leche y bebidas), entre otras aplicaciones.

La importancia de conocer y conservar la biodiversidad microbiana, y el creciente uso de microorganismos en la biotecnología, han contribuido a reconocer el valor que tienen las Colecciones de

Cultivos Microbianos en la preservación *ex-situ* de los recursos genéticos.

Origen de la Colección

El Área de Tecnología de Alimentos del SERIDA inició la conservación *ex situ* de recursos microbianos de origen sidrero en la década de los 80. El trabajo comenzó con una prospección de microorganismos en ocho lagares asturianos. Dada la importancia que tiene la elaboración de sidra en Asturias se priorizó la conservación de microorganismos autóctonos responsables de las principales



transformaciones que se producen durante la elaboración de sidra: la fermentación alcohólica (levaduras) y la transformación maloláctica (bacterias lácticas). También, se puso énfasis en que los aislados fueran representativos de las zonas geográficas con mayor producción de sidra en Asturias. Fruto de este trabajo fue el inicio de la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA, constituida por 23 cepas de levaduras y 22 de bacterias lácticas.

El número de microorganismos conservados se ha incrementado a lo largo de estos años, bien con entradas provenientes de nuevas prospecciones en lagares del concejo de Villaviciosa y/o de aislamientos realizados en muestras del Servicio de Análisis externo ofertado por el SERIDA. Actualmente, en la Colección se conservan más de 2.900 aislados autóctonos (Tabla 1).

Metodología de trabajo

Conservación

Para realizar una conservación de microorganismos, en primer lugar hay que disponer de cultivos puros microbianos y, en segundo lugar, de herramientas que aseguren su correcta preservación.

Un cultivo puro es aquél en el que todos los microorganismos provienen de una célula. Para su obtención el microorganismo tiene que aislarse de su nicho ecológico en el que, generalmente, se encuentra formando parte de poblaciones mixtas. Durante este proceso, se debe proporcionar a los microorganismos las condiciones físicas y nutritivas adecuadas que permitan la obtención de colonias aisladas en medios de cultivos sólidos. Por su parte, la conservación de cultivos se debe hacer asegurando su pureza, viabilidad y estabilidad genética. Es decir, hay que evitar que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación, la tasa de supervivencia de las células debe ser alta y éstas tienen que permanecer genéticamente estables.

En el laboratorio de microbiología del Área de Tecnología de Alimentos, la conservación comienza con la siembra de los microorganismos en medios de cul-

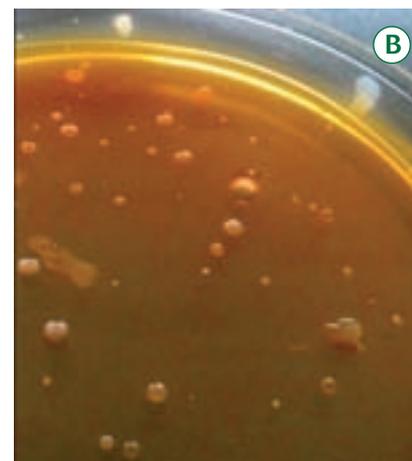
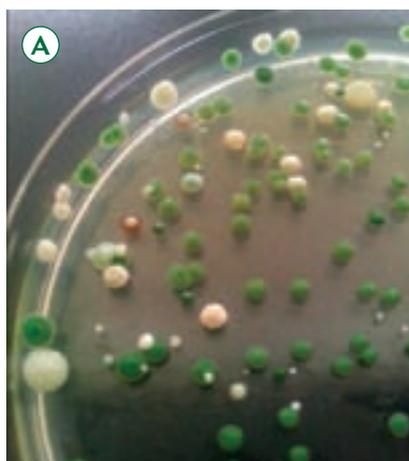
	Prospecciones	Servicio de Análisis	Total
Levaduras	900	324	1.224
Bacterias lácticas	480	1.201	1.681

tivos selectivos, que posibilitan el crecimiento de forma individualizada de los grupos microbianos: levaduras/hongos y bacterias lácticas. La selectividad de los medios utilizados está aportada tanto por el uso de antibióticos como por las diferentes condiciones de crecimiento. Una vez que se dispone de colonias aisladas, y antes de proceder a su conservación, se comprueba su pureza mediante siembra por agotamiento en los mismos medios de cultivo. Cuando se observa una total homogeneidad de colonias, se obtiene un cultivo puro a partir de una colonia.

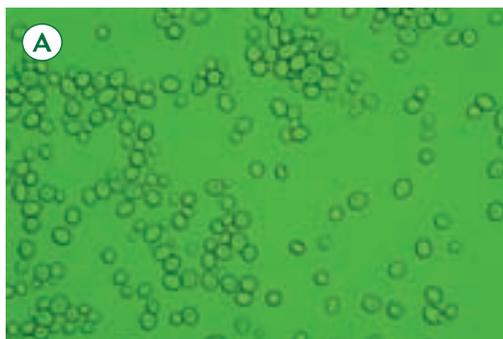
Las células se crecen hasta el final de la fase logarítmica en los medios descritos preparados como caldos, y posteriormente se separan del medio por centrifugación y se resuspenden en un agente crioprotector. La conservación se realiza por congelación de los cultivos, utilizando una tasa de enfriamiento de unos 10°C por minuto hasta alcanzar los -80°C. Los crioprotectores tienen como función minimizar los daños de las células durante la congelación, favoreciendo la vitrificación del agua y evitando la formación de cristales de hielo. De forma rutinaria, y para minimizar la probabilidad de perder aislados, se conservan dos copias de cada microorganismo almacenadas a -80°C (arcón congelador) y a -190°C (nitrógeno líquido).

↑
Tabla 1.-Microorganismos sidreros conservados en la Colección.

↓
Vista macroscópica en medios de cultivos selectivos de poblaciones mixtas de levaduras (A) y bacterias lácticas (B).



→
Vista microscópica de cultivos puros de levaduras (A) y bacterias lácticas (B).



Cuando se necesita recuperar los microorganismos, se descongelan en condiciones controladas (37°C/20 minutos) y se inoculan en los medios de cultivo para revitalizar o rejuvenecer las células. Posteriormente y antes de su uso se realizan controles de viabilidad, pureza y autenticidad de los microorganismos mediante: recuento de viables, observaciones microscópicas, siembras por agotamiento y comprobación de propiedades y características con respecto al microorganismo original.

Identificación

El valor de las colecciones de cultivo microbianas aumenta y se enriquece conforme se realizan actividades de investigación destinadas a la identificación y caracterización de los microorganismos que las constituyen. Desde el año 2000, el Área de Tecnología de los Ali-

mentos viene realizando, de forma paulatina, la identificación y caracterización de aislados de origen sidrero que constituyen la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA.

En la actualidad la identificación de microorganismos se realiza preferentemente mediante técnicas de biología molecular. Estos métodos analizan el genoma de los microorganismos de manera independiente del estado fisiológico de las células. Tienen como principal ventaja producir menos ambigüedades e incorrecciones que los métodos convencionales de identificación, en los que las características analizadas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo.

Las dos técnicas utilizadas para identificar a nivel de género o especie los recursos microbianos son: el análisis de restricción de la región ribosómica 5,8S para las levaduras (Esteve-Zarzoso y col., 1999), y la secuenciación de la región ribosómica 16S en el caso de las bacterias lácticas (Werning y col. 2006). Con estas técnicas se han identificado en sidras asturianas 14 especies de levaduras y nueve de bacterias lácticas (Tabla 2).

Caracterización molecular, fisiológica y tecnológica

Las actividades orientadas a caracterizar, es decir a diferenciar inequívocamente los distintos individuos o cepas de las Colecciones de Cultivo Microbianas y a determinar sus propiedades o atributos suelen abordarse por grupos microbianos. En este sentido, los recursos de origen sidrero se han agrupado en levaduras *Saccharomyces*, levaduras *no-Saccharomyces* y bacterias lácticas.

↓
Tabla 2.-Especies de levaduras y bacterias lácticas identificadas en la Colección.

Levaduras	Bacterias lácticas
<i>Candida glabrosa</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i>
<i>Candida vini</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomycodes ludwigi</i>	



Levaduras <i>Saccharomyces</i>	Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	Bacterias lácticas
Tolerancia al etanol	Poder fermentativo	Carácter homo-heterofermentativo
Poder fermentativo	Producción de aromas	Producción de ácido acético
Producción de aromas	Determinación de actividad pectolítica	Producción de aminas biógenas
Producción de ácido acético	Determinación de actividad proteolítica	Producción de precursores de carbamato de etilo
Producción de dióxido de azufre	Determinación de actividad glicosidasa	Producción de polisacáridos extracelulares
Producción de ácido sulfhídrico		Determinación de fenotipo ropy
Determinación del factor killer		Rendimiento transformación maloláctica
Capacidad de floculación		
Características espumantes		
Determinación de actividad glicosidasa		

←
Tabla 3.-Características fisiológicas y tecnológicas analizadas.

La diferenciación de cepas se realiza mediante métodos moleculares. Así en el caso de las levaduras *Saccharomyces* se utiliza el análisis de restricción del ADN mitocondrial (Querol y col., 1992). Dicha molécula posee un alto grado de variabilidad en las levaduras de este género y es muy estable durante los procesos de multiplicación. Las diferentes cepas se evidencian, mediante electroforesis, por la presencia de distintos perfiles de digestión. Para las levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias lácticas el polimorfismo entre individuos se evalúa por la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado cuando se utilizan cebadores o iniciadores de secuencia arbitraria y corta longitud (Zapparoli y col. 2000; Bujdosó y col. 2001).

La caracterización fisiológica y tecnológica de cepas genera información que puede ser utilizada para mejorar los procesos de elaboración y la calidad de los productos. Para cada grupo microbiano se han analizado características acordes a las actividades o funciones que poseen durante la transformación del mosto de manzana.

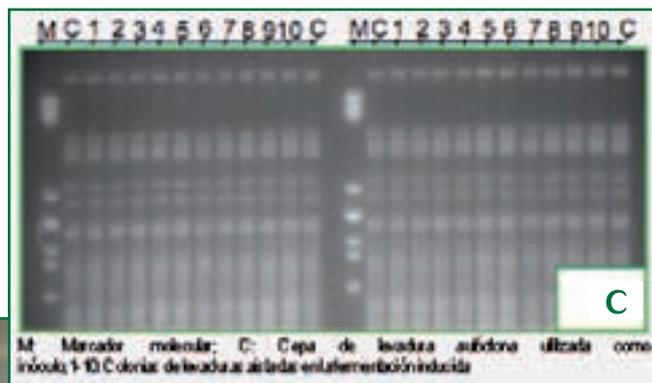
Para las levaduras *Saccharomyces*, principales responsables de la fermentación de los azúcares del mosto, se han analizado características consideradas criterios discriminantes a la hora de realizar una selección de iniciadores o *starters* (Tabla 3). Así por ejemplo, en este género se ha evaluado la capacidad de las distintas cepas para producir y tolerar etanol, producir ésteres, alcoholes superiores y compuestos volátiles que influ-

yen en el aroma de las sidras y otros aspectos como la producción de toxina *killer* o las características espumantes. En el caso de las levaduras no-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* productoras de bajas graduaciones alcohólicas y altas concentraciones de sustancias volátiles que influyen en el aroma de los fermentados, se ha analizado su tolerancia al etanol y la producción de actividades enzimáticas. Mientras que, para las bacterias lácticas responsables de la transformación maloláctica y de importantes alteraciones en sidra (picado láctico, picado alílico y filado) las características determinadas han sido: la producción de sustancias alterantes y nocivas para la salud y la capacidad de metabolizar el ácido málico en cepas *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum/pentosus*.

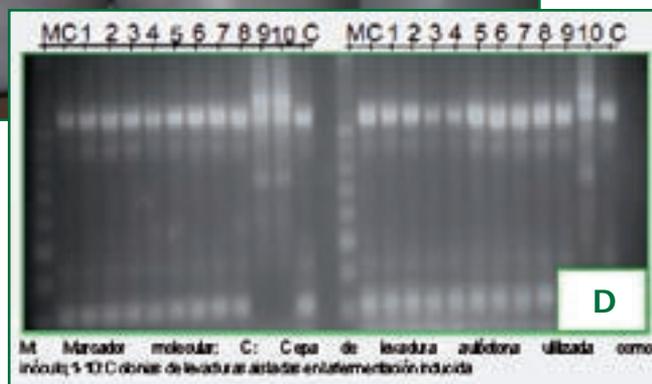
Utilización del material conservado

El mantenimiento y la incorporación de nuevos recursos genéticos microbianos en la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA permite conservar la biodiversidad de los recursos microbianos sidreros, conocer la ecología microbiana de las elaboraciones de sidra, y disponer de material para realizar investigaciones que permitan ahondar en el conocimiento de las características de las diferentes cepas. Asimismo, ha propiciado el uso de recursos microbianos de origen sidrero, en la mejora de procesos de elaboración de productos como: la sidra natural, la sidra con segunda fermentación en botella o el aguardiente de magaya.





M: Marcador molecular; C: Cepa de levadura autóctona utilizada como inóculo; 1-10: Cepas de levaduras aisladas en la fermentación inducida



M: Marcador molecular; C: Cepa de levadura autóctona utilizada como inóculo; 1-10: Cepas de levaduras aisladas en la fermentación inducida

↑
Utilización de recursos microbianos en la elaboración de aguardientes de magaya. **3A:** Obtención de biomasa de levadura; **3B:** Fermentaciones inducidas con distintas cepas autóctonas; **3C** y **3D:** Determinación del grado de implantación de los inóculos.

Proyectos financiados

La conservación y caracterización de microorganismos de origen sidrero se ha realizado con ayuda de los proyectos RM2006-00008, RM2009-00005 y RTA2009-00111 financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con fondos FEDER y PC04-24 financiado por la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT).

Referencias bibliográficas

WERNIG, M. L.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; IRAS-TORZA, A.; NAVAS, J.; LOPÉZ, P. (2006). *Pediococcus parvulus* gtf Gene encoding the gtf glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *J. Food Protection*. 69 (1): 161-169.

BUJIDOSÓ, G.; CHRISTOPH, M.; EGLI, M.; HENICK-KLING, T. (2001). Characterization of *Hanseniaspora (Kloeckera)* strains isolated in finger lakes wineries using physiological and molecular techniques. *Food Technol. Biotechnol.*, 39: 83-91.

ESTEVE-ZARSOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 341-344.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMON, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2948-2953.

ZAPPAROLI, G.; REGUANT, C.; BORDONS, A.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. (2000). Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiol.* 40: 351-355. ■