

Levaduras autóctonas y su potencial biotecnológico

Fermentaciones tradicionales locales desde nuestros ancestros a la actualidad

La fermentación se usa para conservar y mejorar las características organolépticas de los alimentos por más de 6.000 años, siendo uno de los procesos con mayor impacto en los hábitos nutricionales y la cultura alimentaria de la humanidad. En el mundo existen muchos alimentos y bebidas fermentadas de gran valor tradicional y cultural, derivando esto de la heterogeneidad de los usos, las preferencias culturales y las diferentes áreas geográficas en las que se producen (con sus condiciones ambientales asociadas). En Latinoamérica subsisten procedimientos de fermentación cuyo origen se pierde en la historia precolombina, basados en la fermentación del maíz, de diversos frutos amiláceos o azucarados o de savia de plantas suculentas ricas en azúcares. Estos productos fermentados se usaban en las culturas precolombinas como estimulantes, en medicina tradicional o en ceremonias religiosas. Pero a lo largo del siglo XX, la industrialización y la migración del campo a las grandes urbes de América Latina, ocasionaron una disminución del consumo de productos fermentados tradicionales y hoy se está perdiendo su producción.

Desde lo microbiológico, las fermentaciones tradicionales son procesos complejos en los que intervienen levaduras, hongos y bacterias lácticas, siendo las primeras las responsables de la fermentación alcohólica y conducir el proceso fermentativo. Proviene de la materia vegetal utilizada, de insectos que sirven de vectores de inoculación (especialmente *Drosophila*, mosca de la fruta), y en gran medida, de los utensilios y recipientes utilizados, que en la mayoría de los casos se reutilizan sin limpiar porque favorece las sucesivas fermentaciones.

Durante la fermentación alcohólica las levaduras producen principalmente etanol y CO₂, así como metabolitos secundarios que influyen significativamente en las características organolépticas de la bebida y constituyen el aroma secundario. Las levaduras responsables de la transformación del mosto de frutas u otras materias primas en sus respectivas bebidas fermentadas pertenecen al género *Saccharomyces*, y en general a la especie *S. cerevisiae* (S.c). Otras especies, tales como *S. uvarum* y en menor medida *S. paradoxus* e híbridos entre diferentes especies del género también se han descrito en diversas fermentaciones, mayormente las industrializadas. También participan de este proceso, especies de levaduras denominadas en conjunto no-*Saccharomyces*, particularmente cuando se realizan de manera espontánea y fundamentalmente en los estadios iniciales. El desarrollo de una u otra levadura tendrá un impacto directo en las características organolépticas del producto final.

ESTADO ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

La microbiota implicada en las fermentaciones tradicionales es casi desconocida y este es el asunto al que intentamos poner algo de luz con nuestra investigación. En la región Patagónica no existen estudios de la diversidad microbiana en las fermentaciones tradicionales, propias de los pueblos que habitaban el territorio antes de la llegada de los españoles, como los Mapuches. Estas comunidades aborígenes de la Patagonia argentina y chilena, típicamente recolectoras elaboraban diferentes bebidas fermentadas a partir de semillas o frutos de plantas regionales (como el *Mudai*, producto

sigue >>

de fermentación de la semilla del Pehuén o *Araucaria araucana*) o de frutos introducidos posteriormente como la chicha de manzana silvestre. Mientras que el *Mudai* se utiliza principalmente en ceremonias religiosas, la chicha de manzana se emplea como bebida refrescante y aún hoy se consume. La diversidad de las levaduras presentes en los procesos fermentativos de origen precolombino pudo verse alterada por la introducción no conciente de cepas de origen europeo en los últimos 500 años. Esta pérdida puede acentuarse con la introducción del uso masivo de levaduras secas activas (seleccionadas en otros países) en fermentaciones de interés comercial (producción de pan, vino, cerveza, etc.), que podrían reemplazar a la microbiota nativa a través de su dispersión por insectos (principalmente *Drosophila*) o por la propia actividad humana. Existen reportes que indican que, en algunos casos, las mujeres que elaboraban las bebidas en los pueblos habitantes de la Patagonia, incorporaban levadura a las fermentaciones.

Se ha analizado la diversidad de levaduras asociadas a la producción del *Mudai*, bebida obtenida por triturado, hervido y fermentado espontáneo de las semillas de la *Araucaria araucana*. Además de una extraordinariamente baja riqueza específica en las fermentaciones analizadas, todas las cepas de *Saccharomyces* aisladas (se obtuvieron muestras de diferentes sitios de la Norpatagonia) presentaron características moleculares idénticas a las de levaduras comerciales de panadería de *S. cerevisiae* (S.c). Lo que evidenció que las levaduras utilizadas actualmente para la elaboración de pan por estas familias, contaminan los mostos destinados a la elaboración de *Mudai*, volviéndose mayoritaria y eliminando la biota original. No obstante, se detectaron diversas cepas de las especies de levaduras *S. eubayanus* (S.e) y *S. uvarum* sobre la superficie de las semillas y corteza de *A. araucana*, lo cual podría indicar que estas especies fermentativas hayan sido las responsables de la producción del *Mudai*, previo a la introducción de las levaduras comerciales para la fabricación de pan.

PUNTO DE VISTA BIOTECNOLÓGICO

Existe principal interés biotecnológico por la particularidad que presentan dos especies del género: *S. uvarum* y *S. eubayanus* (S.e) debido a su tolerancia a las bajas temperaturas, típicamente encontradas en la Patagonia (temperaturas inferiores a 15-20°C son frecuentes durante la cosecha y fermentación de estas bebidas). Del total de 7 especies naturales que se consideran actualmente en el género *Saccharomyces* solo *S. kudriavzevii*, S.e y *S. uvarum* (y la mayoría de los híbridos que involucran partes de ellos) se han relacionado con la tolerancia a bajas temperaturas y de

ellas, sólo *S. uvarum* y varios híbridos, incluyendo *S. bayanus* (grupo de cepas híbridas entre *S. uvarum* y S.e), *S. pastorianus* (híbrido entre *S. cerevisiae* y S.e, con o sin el aporte de *S. uvarum*) e híbridos entre *S. cerevisiae* (S.c) y *S. kudriavzevii* se han asociado a fermentaciones propiamente dichas, realizadas a bajas temperaturas, mientras que el resto se aíslan únicamente de ambientes naturales. Debido a que son pocas las cepas disponibles en el mundo de estas especies criotolerantes, el descubrimiento de las mismas en la Patagonia resulta biotecnológicamente relevante.

PRODUCCIÓN FAMILIAR Y CEREMONIAL

La producción de chichas de manzana se realiza actualmente por emprendimientos familiares y en fechas estratégicas. En la Patagonia Argentina existen varias comunidades que elaboran estas bebidas de manera tradicional, aprovechando los recursos naturales. La reducida escala económica y espacial de producción, típica de este tipo de desarrollos, es un rasgo que distingue a los agricultores familiares de los empresariales. Estas particularidades constituyen un desafío para el desarrollo de tecnologías de manejo de los recursos naturales, que no pueden descansar mayoritariamente en la utilización de insumos y de energía fósil, como sucede con la agricultura de mayor escala. La caracterización de la biota de levaduras responsable de las fermentaciones tradicionales, como las chichas de manzana, podría convertirse entonces en el primer paso para la generación de cultivos iniciadores propios de estos sustratos, que aporten al producto características diferenciales y permitan a su vez fortalecer el desarrollo social y productivo de la región, acentuando la diversidad productiva, colaborando con el desarrollo de pequeñas familias y con la recuperación y conservación de la diversidad microbiana propia de la región y de enorme valor biotecnológico.

NUESTRO APORTE

Estos datos en conjunto, llevaron a considerar necesario continuar con el estudio de estas chichas, incrementando el área de muestreo y los sustratos, con el fin de detectar cepas nativas valor biotecnológico y desarrollar un cultivo iniciador local de levaduras adaptado a este tipo de fermentaciones, para su disponibilidad por familias productoras de estas bebidas tradicionales. Este cultivo permitirá reducir los tiempos de fermentación a las temperaturas habituales en la zona, obtener productos reproducibles año a año e incluso mejorar las características organolépticas del producto, promoviendo el desarrollo de los pequeños productores regionales. Se incluyó además en este planteo, el aislamiento de levaduras a partir de restos arqueológicos de cerámicas utilizadas por los antiguos

sigue >>

Mapuches para la elaboración o almacenamiento de las bebidas fermentadas, lo cual podría arrojar luz sobre las especies y cepas que participaban en estos procesos antes de la introducción de los cultivos comerciales de S.c.

Como parte de la investigación hecha en el laboratorio de Biotecnología del Instituto Probien CONICET-UNCOMA se abordaron cuestiones que tienen relación directa con lo expuesto anteriormente, con el objetivo de conocer qué levaduras podemos encontrar hoy en lugares donde las fermentaciones ocurren naturalmente a baja temperatura y que se desarrollan en la piel de manzanas que crecen en montes libres de manera asilvestrada. Se enfocó el trabajo en aislar, identificar y comparar fisiológica y genéticamente cepas de *Saccharomyces* obtenidas de mostos de manzana fermentados de manera tradicional (chichas) y en frutales para finalmente evaluar su potencialidad para su empleo como cultivos iniciadores en la producción familiar de estas bebidas.

MUESTREO y ANÁLISIS

Los manzanos asilvestrados de la cordillera neuquina fueron sujetos de muestreo en una campaña que se realizó en la zona del río Alumine y el lago Moquehue (Fig.1 A- manzano de lago Moquehue. B- manzano de costa del río Aluminé). De esta misma zona se pidió a pobladores chicha de manzana realizada por ellos mismos, usando sus utensilios y su propia receta de elaboración.

Se aislaron y estudiaron levaduras en los tiempos inicial, medio y final de fermentación de una chicha realizado por métodos tradicionales por un poblador de Aluminé (Fig 2). Se disecó en condiciones de esterilidad muestras de piel de 1 cm × 1 cm de superficie de manzanas recolectadas en 13 sitios de muestreo. Las mismas fueron cultivadas en medio de cultivo líquido GPY. También se realizaron microfermentaciones (5ml), ambos incubados a 13 y 25°C. Una vez que se observó turbidez fueron aisladas levaduras en medio sólido.



Figura 1. A) Manzano de Moquehue.

B) Manzano de Aluminé.

sigue >>



Figura 2. Biodiversidad de levaduras aisladas de piel de manzanos asilvestrados.

ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS QUE ACTUALMENTE RESIDEN EN LA CORDILLERA NEUQUINA

Se secuenció el dominio D1/D2 del gen 28S rDNA para analizar la identidad de los aislados encontrados en la chicha de Alumine, aquí se detectaron los géneros *Pichia*, *Metschnikowia*, *Wickerhanomyces*, *Cyberlindnera* y *Meyerozyma* pero solo *S.e* formando parte de este género (Fig. 3).

Lo mismo se realizó en las levaduras obtenidas de manzanos asilvestrados. La identidad de todas las cepas de *S.e* fue confirmada mediante PCR-RFLP de los genes *CBT* y *GSY*.

Variabilidad intraespecífica en chicha mediante mADN-RFLP. 37 aislados de levaduras pertenecieron a la especie *S.e* (positivas para crecimiento a 37°C y con capacidad de esporulación condiciones que definen que pertenecen al género). Fueron detectados 13 perfiles mitocondriales. Del total analizado 24 pertenecen al perfil *Ac*. Se observa un aumento de la variabilidad en el estadio final de fermentación. Variabilidad interspecífica en frutos mediante mADN-RFLP. Fueron estudiados 13 aislados de levaduras pertenecientes a la

especie *S.e* desde la piel de los frutos recolectados en los manzanos asilvestrados (positivas para crecimiento a 37°C y con capacidad de esporulación). Las mismas fueron obtenidas de 14 sitios de muestreo. Se detectaron 5 perfiles mitocondriales distintos.

ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS EN RESTOS ARQUEOLÓGICOS DE LA CORDILLERA NEUQUINA

El estudio se extendió al poder acceder a muestras arqueológicas de recipientes cerámicos que datan de hasta 900 años antes del presente, intentando comparar si la biota que hoy encontramos presente en la piel de las manzanas silvestres pudieron haber estado residiendo naturalmente en la Cordillera Neuquina, antes de la introducción de *S.c* con la llegada de los españoles.

El objetivo en esta parte del estudio fue evaluar la presencia de levaduras fermentativas en restos arqueológicos utilizados por comunidades aborígenes para la elaboración o almacenamiento de bebidas fermentadas. Colegas arqueólogos nos enviaron gentilmente muestras de vasijas de 13 sitios arqueológicos.

sigue >>



Figura 3. *Saccharomyces eubayanus* en placa.

Luego de recuperar en condiciones de esterilidad y asegurándonos que solo muestreamos capas profundas de los trozos de cerámica donde podrían haber habitado levaduras fermentadoras, se obtuvieron levaduras en las muestras provenientes de los sitios Mirador de Bello (MB) y Lago Meliquina (LM). Asombrosamente las mismas pertenecen a la especie *S.e.*, reportada en superficie de piñones y corteza de la *A. araucana* y en los manzanos asilvestrados de la norpatagonia andina y chicha de Alumine.

La caracterización intraespecífica de los aislados mediante mtDNA-RFLP demostró la presencia de una misma cepa mayoritaria (iguales perfiles moleculares) en aislados obtenidos de los dos sitios, además de dos perfiles diferentes entre los aislados en el sitio Mirador de Bello.

CONCLUSIÓN

Podemos pensar en el uso de estas levaduras autóctonas y que datan de antes a la llegada de los españoles para aportar improntas organolépticas a bebidas como cerveza, vino, sidra, Perry y también contribuir a

mejorar las condiciones en las que pobladores locales realizan sus chichas. •

Bibliografía

Naumov *et al.*, 2002; Rementería *et al.*, 2003; Demuyter *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006; Le Jeune *et al.*, 2007; Morrissey *et al.*, 2004; Suárez Valles *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2014; Boynton y Greig, 2014; Rodríguez *et al.*, 2014.