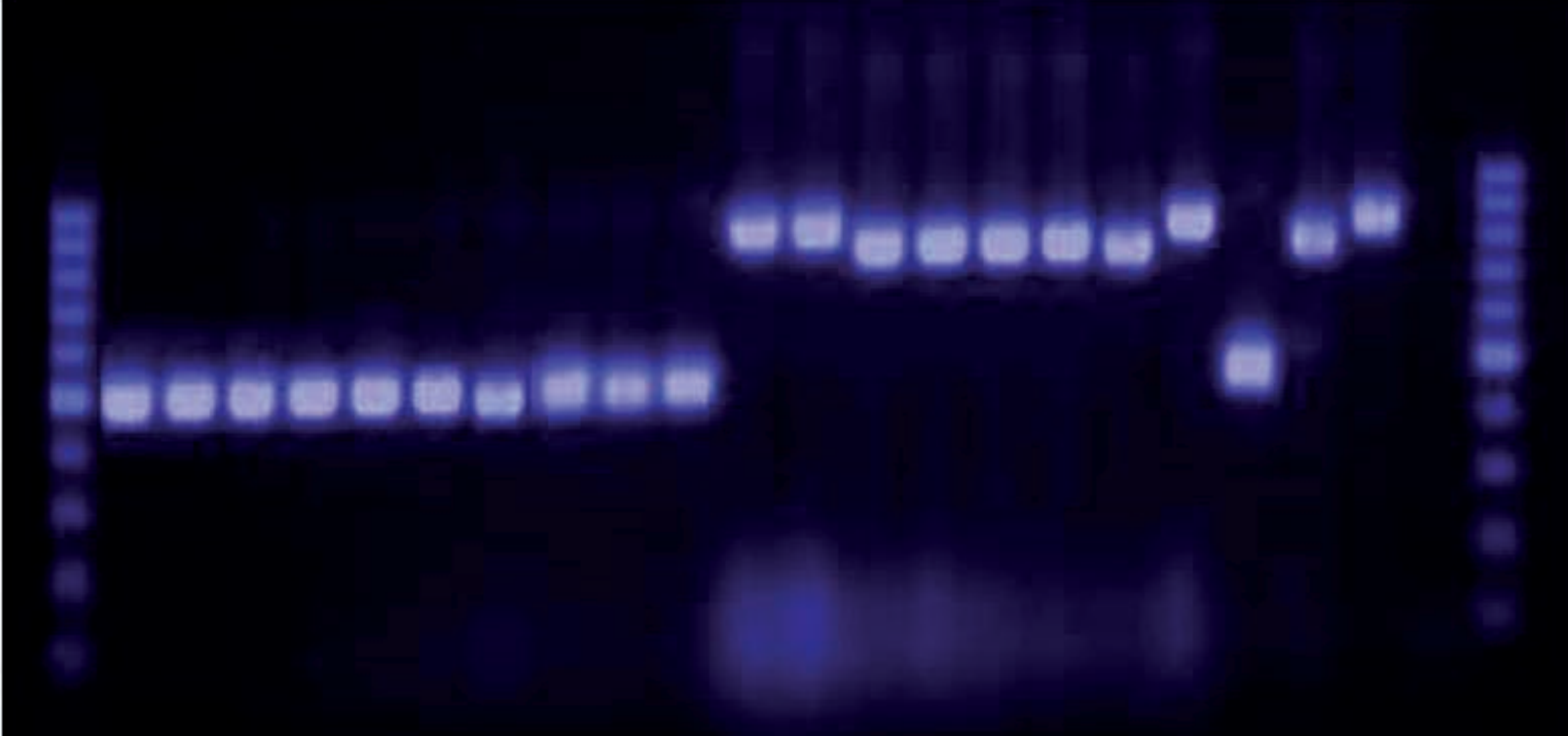




Microorganismos de origen sidrero, recursos genéticos microbianos, al servicio de la biotecnología (II)

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

MARÍA TERESA VALDERAS HERRERO. Área de Tecnología de los Alimentos. maitev@serida.org

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

La mayoría de las propiedades tecnológicas que poseen los microorganismos utilizados en la industria agroalimentaria son cepa-dependiente. Este hecho evidencia la importancia de preservar y mantener las colecciones de cultivo, apoyando la búsqueda de nuevos aislados y los estudios de conservación de microorganismos.

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. En este sentido, desde los años 2000, el Área de Tecnología de los Alimentos viene realizando, de forma paulatina, la identificación y caracteriza-

ción de aislados de origen sidrero que constituyen la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA.

Identificación de recursos microbianos

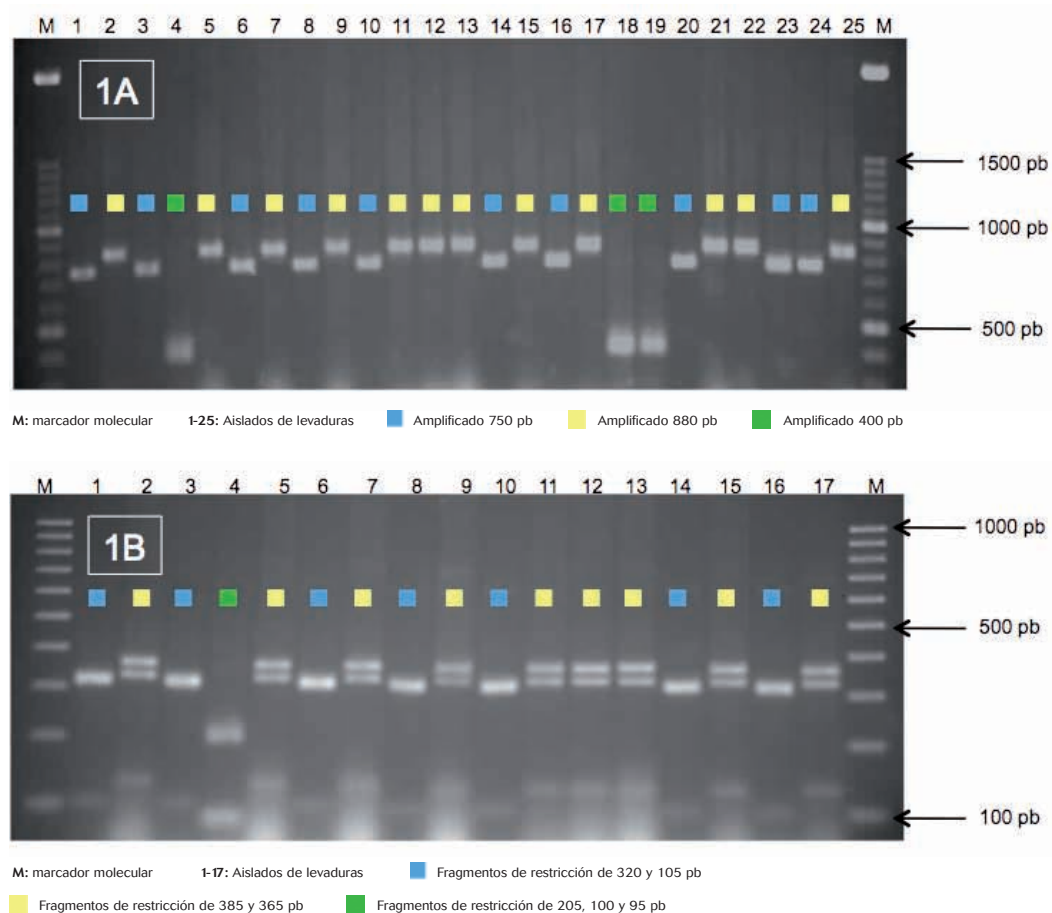
En la actualidad, la identificación de microorganismos se realiza mediante técnicas de biología molecular. Estos métodos analizan el genoma de los microorganismos de manera independiente al estado fisiológico de las células. Tienen como principal ventaja producir menos ambigüedades e incorrecciones que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



Figura 1. Perfiles de amplificación y restricción de la región ribosómica 5,8S-ITS de levaduras visualizados mediante electroforesis.

1A: Amplificados obtenidos en la reacción de PCR.

1B: Fragmentos de restricción derivados de la actividad del enzima Cfo I sobre los amplificados.



Las dos técnicas utilizadas para identificar a nivel de género o especie los recursos de origen sidrero son: el análisis de restricción de la región ribosómica 5,8S (levaduras) y la secuenciación de la región ribosómica 16S (bacterias lácticas).

En el caso de las levaduras la metodología consiste en amplificar mediante PCR la región 5,8S-ITS del ADN ribosomal y luego digerir dicha región con enzimas de restricción (Figura 1). Las diferencias de tamaño de las secuencias nucleotídicas, visualizadas mediante electroforesis, dan lugar a patrones especie-específicos (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Finalmente la identificación se obtiene comparando los tamaños moleculares de los fragmentos de ADN con cepas de referencia y con la base de datos Yeast-id (<http://www.yeast-id.com>). Con esta técnica se han identificado en torno a 2000 levaduras detectándose la presencia, en sidras asturianas, de 14 especies (Tabla 1).

Por su parte, para la identificación de las bacterias lácticas se realiza en primer

lugar una amplificación de un fragmento del ADN ribosómico 16S de aproximadamente 530 pares de bases (Werning y col. 2006). Posteriormente este fragmento se secuenciar y la secuencia nucleotídica obtenida es alineada, empleando el programa informático BLAST y comparada con la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para obtener la asignación de la bacteria a nivel de género o de especie (Figura 2). Hasta el momento se ha realizado la identificación de aproximadamente 400 bacterias lácticas que han sido clasificadas en nueve especies (Tabla 1).

Caracterización molecular, fisiológica y tecnológica de recursos microbianos

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 microbia-

nos. En este sentido, los recursos de origen sidrero se agrupan en levaduras *Saccharomyces*, levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias lácticas.

La diferenciación de cepas se realiza mediante métodos moleculares (Figura 3). 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

Levaduras	Bacterias lácticas
<i>Candida glabrata</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>	

productos. En este sentido, para cada grupo microbiano se han analizado características acordes a las actividades o funciones que poseen durante la transformación del mosto de manzana (Figura 4).

Para las levaduras *Saccharomyces*, principales responsables de la fermentación de los azúcares del mosto, se han analizado características consideradas

↑

Tabla 1.-Especies de levaduras y bacterias lácticas a las que pertenecen los recursos microbianos de origen sidrero.

←

Figura 2.-Perfiles de amplificación visualizados mediante electroforesis y electroferograma de la región ribosómica 16S de bacterias lácticas.
2A: Amplificados obtenidos en la reacción de PCR.
2B: Electroferograma derivado de la secuenciación del fragmento de ADN amplificado.

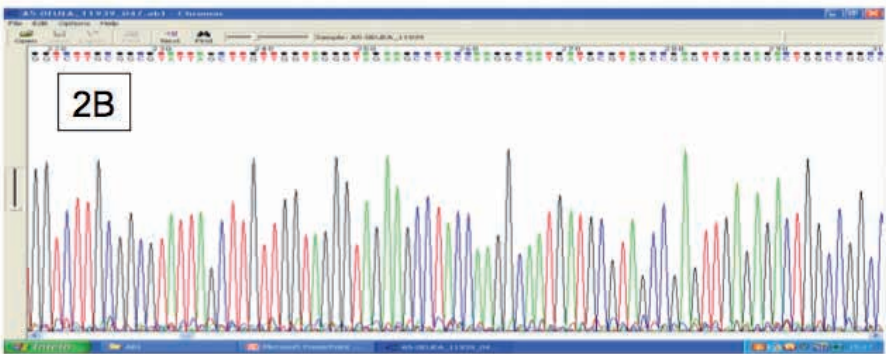




Figura 3.-Caracterización molecular de recursos microbianos de origen sidrero.

3A: Perfiles de restricción del ADN mitocondrial de levaduras del género *Saccharomyces*.

3B: Perfiles de amplificación obtenidos mediante RAPD con el oligonucleótido RM13 de levaduras no-*Saccharomyces*.

3C: Perfiles de amplificación obtenidos mediante RAPD con el oligonucleótido M13 de bacterias lácticas.

M: Marcador molecular.

1-14: Aislados de levaduras *Saccharomyces*

M: Marcador molecular.

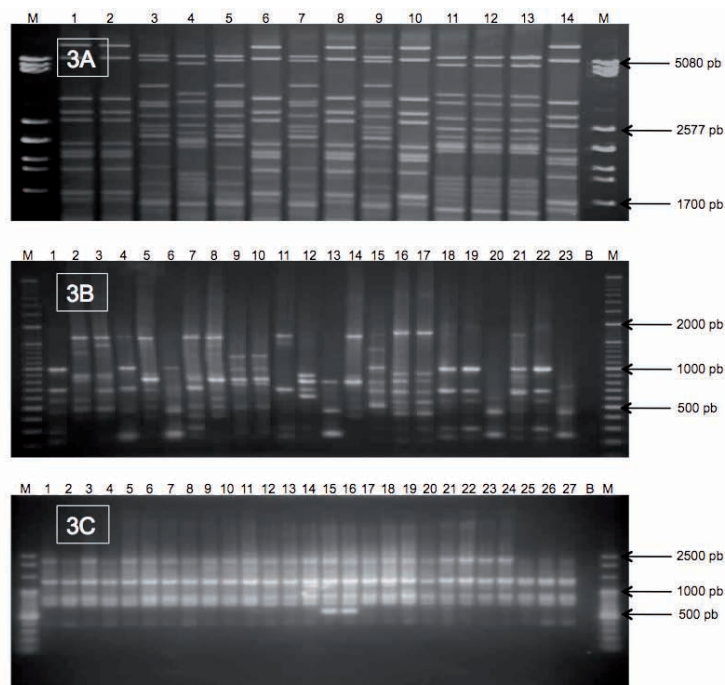
B: Blanco de reacción.

1-23: Aislados de levaduras no *Saccharomyces*.

M: Marcador molecular.

B: Blanco de reacción.

1-27: Aislados de bacterias lácticas.



criterios discriminantes a la hora de realizar una selección de iniciadores o *starters* (Tabla 2). 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 influyen 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*, 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. Finalmente, para las bacterias lácticas, responsables de la transfor-

mación 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*.

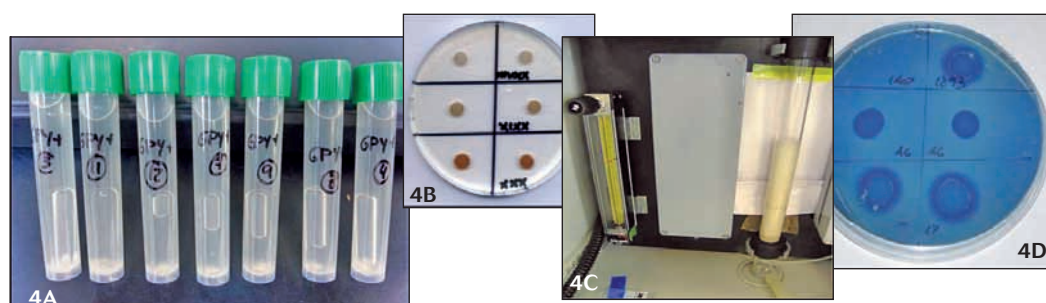
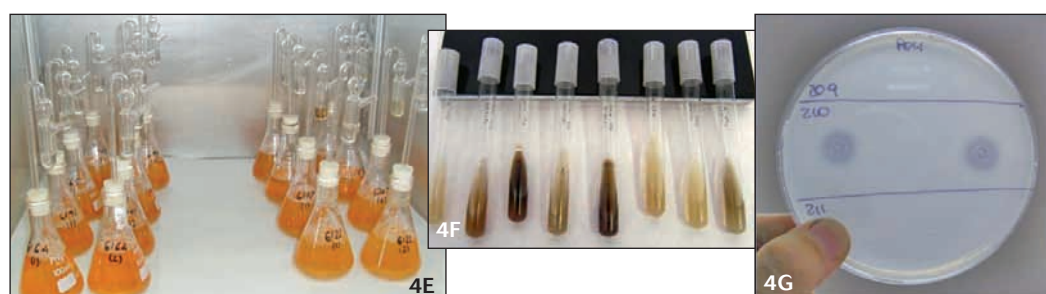
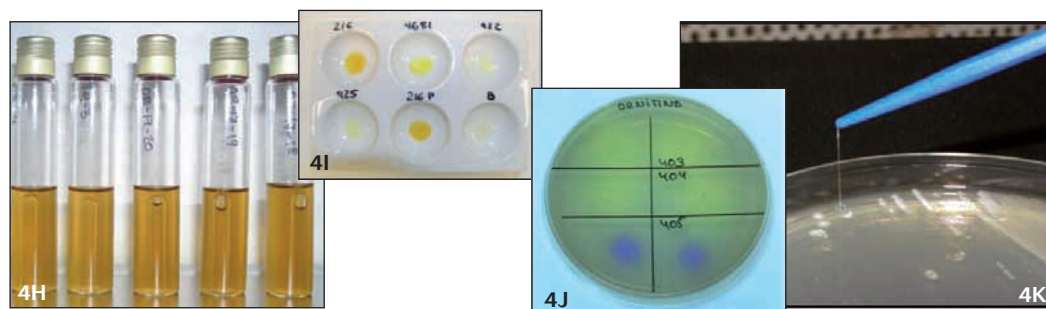
Por último, cabe destacar que la información asociada a las acciones de investigación sobre la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA ha propiciado el uso de recursos microbianos de origen sidrero en la mejora de procesos de elaboración de productos como la sidra natural, la sidra de segunda fermentación en botella o el aguardiente de magaya.



Tabla 2.-Características fisiológicas y tecnológicas analizadas en recursos microbianos de origen sidrero.

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 del fenotipo ropy
Determinación del factor <i>killer</i>		Rendimiento transformación maloláctica
Capacidad de floculación		
Características espumantes		
Determinación de actividad glicosidasa		




Características evaluadas en aislados *Saccharomyces*

Características evaluadas en aislados no-*Saccharomyces*


Características evaluadas en aislados de bacterias lácticas

Figura 4.-Caracterización fisiológica y tecnológica de recursos microbianos de origen sidrero.

- 4A: Poder fermentativo;
4B: Producción de ácido sulfhídrico;
4C: Características espumantes;
4D: Determinación del factor killer;
4E: Producción de aromas;
4F: Determinación actividad glicosidasa;
4G: Determinación actividad proteolítica;
4H: Carácter homo-heterofermentativo;
4I: Producción de precursores de carbamato de etilo;
4J: Producción de aminas biógenas;
4K: Determinación de fenotipo "ropy".

Agradecimientos

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.; LÓPEZ, 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.

BLUDOSÓ, 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.; URIBURU, 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. ■