



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



MONITOREO DE DINÁMICAS POBLACIONALES DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES ARTESANALES DE MEZCAL

Manuel Kirchmayr, Luis Segura Garcia, Anne Gschaedler
CIATEJ, Dpto. de Biotecnología Industrial, Guadalajara Jalisco, C.P. 44270. e-mail: aggschaedler@ciatej.net.mx

Palabras clave: mezcal, no-Saccharomyces, dinámicas poblacionales

Introducción. Desde los años 90, se ha observado un creciente interés en el estudio de fermentaciones tradicionales. En la fermentación artesanal del mezcal, la gran diversidad de microorganismos, la heterogeneidad de las poblaciones y la composición de los mostos dificultan conocer las dinámicas poblacionales específicas de levaduras aplicando técnicas microbiológicas clásicas. Surge la necesidad de emplear técnicas no convencionales, que consisten en técnicas moleculares independientes de cultivo. Este trabajo pretendió elucidar la evolución de poblaciones de levaduras en fermentaciones artesanales de mezcal mediante métodos convencionales y no convencionales y comparar los métodos empleados.

Metodología. El muestreo se realizó en la mezcalera "Las Margaritas" (San Pedro Totolapan, Oaxaca) en abril 2009. Se tomaron 11 muestras de mostos a lo largo de la fermentación. El cultivo de los microorganismos se realizó *in situ*, las muestras destinadas para la extracción de ADN se congelaron de inmediato. La cuantificación global de levaduras así como el conteo diferencial se realizaron en medio de cultivo WL. Todas las morfologías encontradas fueron aisladas, cultivadas e identificadas mediante métodos moleculares (PCR-RFLP, Secuenciación). La extracción directa de ADN a partir de los mostos se realizó con el kit GenElute Plant DNA Minikit modificado. La PCR en tiempo real se realizó en un LightCycler 1.5 con SYBR Green I. Se emplearon iniciadores universales para levaduras (1), así como dos pares de iniciadores específicos para *I. orientalis* (2) y para *Z. rouxii*.

Resultados. De los cultivos de mostos se aislaron 14 especies de levaduras. La mayoría de las colonias correspondían a las especies *S. cerevisiae*, *Z. bisporus* y *Z. rouxii*. Los resultados del conteo diferencial sugieren que las poblaciones específicas de estas 3 especies mayoritarias cambian constantemente (Fig.1A). Durante una gran parte de la fermentación, las no-*Saccharomyces* constituyen la mayoría de la población global de levaduras, la cual se mantiene entre 1 millón y 100 millones de células por ml. Los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real confirman las concentraciones, calculadas en base a los cultivos (Fig.1B). Cuando se comparan las dinámicas poblacionales específicas, se pueden observar diferencias significativas. En el caso de cepas

mayoritarias, se observa mayor concordancia entre los métodos utilizados (Fig.1C). Cuando se trata de una especie aislada de manera esporádica durante el proceso, sin embargo, las concentraciones calculadas en base al conteo diferencial tienden a sobreestimar la población. Adicionalmente se observa que en varias muestras, la PCR en tiempo real logró detectar poblaciones específicas a bajas concentraciones mientras el conteo diferencial no pudo detectarlas (Fig.1D).

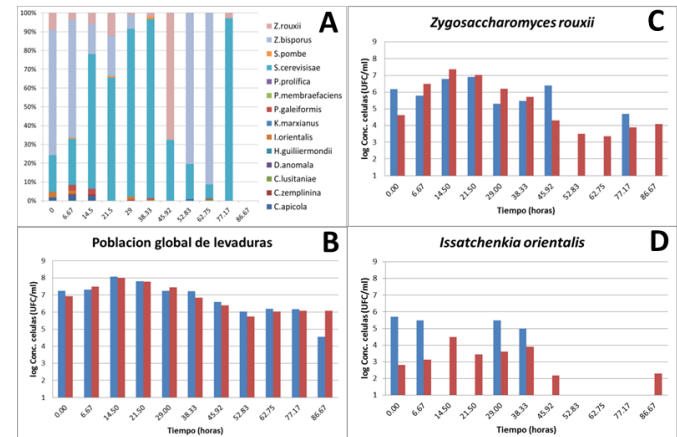


Fig.1: (A) Composición relativa de poblaciones de levaduras en mostos de mezcal. (B, C y D) Cuantificación de la población global y poblaciones específicas de levaduras mediante conteo diferencial (■) y PCR en tiempo real (■).

Conclusiones. Los métodos no convencionales representan una herramienta útil y eficaz para la cuantificación de poblaciones de levaduras, la dificultad de su desarrollo y por su fundamento técnico (ver presencia o ausencia de manera puntual), corren riesgo de cuantificar de manera sesgada. El estudio de dinámicas poblacionales en fermentaciones artesanales requiere de ambos, métodos convencionales y no convencionales.

Agradecimiento.

Proyecto SEP-CONACYT 24556

Bibliografía.

- Hierro, N., Esteve Zarzoso, B., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M.(2006). *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11): 7148-7155.
- Zott, K., Claisse, O., Coulon, L.J., Lonvaud Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. (2010). *Food Microbiol.*, 27(5): 559-567.