

## DIVERSIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVADURAS AISLADAS DE MIELES PATAGÓNICAS

Kleinjan Victoria<sup>1,2</sup>; González Flores Melisa<sup>1,3</sup>; Rodríguez M. Eugenia<sup>1,4</sup>; Apablaza Olga<sup>5</sup>; Lopes Christian A.<sup>1,3</sup>

1- PROBIEN, CONICET-UNCo, Neuquén, Neuquén.

2- Facultad de Ingeniería, UNCo, Neuquén, Neuquén.

3- Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo, Cinco Saltos, Río Negro.

4- Facultad de Ciencias Médicas, UNCo, Cipolletti, Río Negro.

5- INTI Neuquén.

Email: [christian.lopes@faca.uncoma.edu.ar](mailto:christian.lopes@faca.uncoma.edu.ar)

### RESUMEN

La Miel es el producto dulce elaborado por abejas a partir de néctar de flores o exudados de plantas. En este trabajo se evaluó la diversidad de levaduras fermentativas presentes en 19 muestras de miel provenientes de la Norpatagonia. Se identificaron 7 especies de levaduras siendo *Starmerella magnoliae* mayoritaria, presente en todas las mieles. Se detectaron 4 perfiles moleculares (cepas) diferentes, de un total de 40 aislados de esta especie. Todas las cepas analizadas crecieron en un rango de 13°C a 30°C, incluso algunas hasta 37°C. La mayoría toleró concentraciones de hasta 4 mM de sulfito y hasta 8% v/v de etanol. En ensayos de fermentación, consumieron más del 90% de la fructosa y solamente el 10% de la glucosa presentes en el mosto (capacidad fructofílica). Los datos demuestran el potencial de estas levaduras para fermentar mostos con mayor proporción de fructosa respecto de glucosa, como el de manzana.

**Palabras clave:** fermentaciones, *Starmerella magnoliae*, estrés, fructosa.

### 1. Introducción

La Miel o Miel de Abejas es el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir de la transformación del néctar de las flores o de exudados de plantas (ANMAT, 2023). Es una mezcla compleja compuesta mayoritariamente por hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen (Piana *et al.*, 1989). Entre los azúcares presentes predominan la fructosa y la glucosa y en menor medida la sacarosa (Calderón *et al.*, 2017). Debido a su riqueza nutricional, son varios los microorganismos que pueden sobrevivir y proliferar en la miel; sin embargo, poco se conoce a nivel mundial y nada a nivel regional sobre la biodiversidad de estas. Existen algunos reportes bibliográficos sobre biodiversidad de levaduras asociadas a la miel, el polen, las abejas y los sustratos que visitan (Teixeira y col., 2003; Kurtzman *et al.*, 2011). Las características propias de la miel como el alto contenido de azúcares y por lo tanto elevado poder osmótico, junto con la abundancia relativa de fructosa y el hecho de que es el sustrato para la elaboración de

bebidas fermentadas como la Hidromiel o Aguamiel, hacen que resulte interesante indagar sobre la diversidad de levaduras fermentativas nativas que podrían existir en las mieles patagónicas y su potencial biotecnológico. Conocer las características de estas levaduras puede incluso abrir posibilidades para su uso en otras bebidas fermentadas, mejorando su perfil organoléptico y aumentando así su valor económico.

### 2. Metodología

#### 2.1. Material biológico

Se utilizaron 19 muestras de mieles provenientes de 12 diferentes localidades de las provincias de Neuquén (2 de Aluminé, 2 de Chos Malal, 2 de Huinganco, 2 de Junín de los Andes, 2 de Neuquén, 1 de San Martín de los Andes, 1 de Tricao Malal y 2 de Villa Nahueve), Río Negro (1 de Peñas Blancas) y Chubut (2 de Cholila, 1 de Epuyen y 1 de El Maitén), provistas por personal del INTI Neuquén.

#### 2.2. Aislamiento de levaduras fermentativas

A partir de cada muestra se elaboraron mostos que permitieran el desarrollo de levaduras

fermentativas mediante el agregado de agua, fosfato de amonio y ácido tartárico (Calderón *et al.*, 2017). Los mostos sin esterilizar se incubaron a 25°C y luego de 30 días se realizó el aislamiento de levaduras en placas con medio GPY-agar (% p/v: glucosa 2, peptona 0,5, extracto de levaduras 0,5, agar 2) suplementado con cloranfenicol (50 mg/L). Las placas se incubaron a 25°C durante 48-72 h y posteriormente un número representativo de colonias de levaduras se aislaron de acuerdo a su morfología y frecuencia.

### 2.3. Identificación de levaduras

El ADN total de las levaduras se obtuvo mediante la técnica descrita por Lopez *et al.* (2001). La identidad de las mismas se obtuvo mediante secuenciación del dominio D1/D2 perteneciente al ADNr 26S y comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en la base de datos NCBI usando BLASTn (Kurtzman *et al.*, 2011).

### 2.4. Caracterización de los aislados de *Starmerella magnoliae*

#### Caracterización molecular a nivel de cepas

Los aislados identificados como *S. magnoliae* fueron caracterizados a nivel de cepa mediante análisis de ADNmt-RFLP (López *et al.*, 2001).

#### Tolerancia a factores de estrés

Se evaluó la tolerancia al sulfito (0, 1, 2, 3 y 4 mM de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y al etanol (0, 3, 7 y 8% v/v) y el crecimiento a diferentes temperaturas (8, 13, 20, 30 y 37°C) de cepas de *S. magnoliae* representativas de cada perfil mtDNA-RFLP y de cada sitio de muestreo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado siguiendo la metodología descrita por Origone *et al.* (2020).

### 2.5. Fermentaciones

Se llevaron a cabo en frascos de 100 mL conteniendo 80 mL de mosto preparado como se indicó previamente pero sometido a vapor fluente (100°C, 40 min). Las mismas se inocularon con una concentración de 2x10<sup>6</sup> cel/mL del correspondiente cultivo puro a 25°C por duplicado. El seguimiento se realizó por medición diaria de °Brix y producción de CO<sub>2</sub>.

### 2.6. Medición de azúcares

La determinación de la glucosa, fructosa y sacarosa del mosto y del final de fermentación se realizó utilizando el kit enzimático Sacarosa/D-Glucosa/D-Fructosa (Mezayme Ltd®). Los valores de azúcares se compararon y analizaron mediante ANOVA y Test de Fisher LSD, con  $\alpha=0,05$ , empleando el paquete Statistica 8.0.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Levaduras detectadas en las muestras de mieles Patagónicas

Se aislaron levaduras a partir de las 19 muestras de mieles luego de transcurridos los 30 días de incubación. En la Tabla 1 se muestra la identidad de las levaduras aisladas, separadas por origen de aislamiento. Como puede observarse, se identificaron en total 8 especies de levaduras; sin embargo, la especie *Starmerella magnoliae* fue aislada de todas las muestras analizadas, en general acompañada por otras especies minoritarias.

*S. magnoliae* (antes *Candida magnoliae*) es una especie reconocida por su asociación con abejas, flores y miel (Kurtzman *et al.*, 2011; Roxo *et al.*, 2023) y muy utilizada en la industria alimentaria debido a su elevada capacidad de producir los endulzantes eritritol y manitol (Yu *et al.*, 2006). Su presencia en la miel se debe principalmente a su marcado poder fructofílico y su elevada osmotolerancia (Kurtzman *et al.*, 2011). El estudio de las diferencias intraespecíficas, tanto genéticas como fisiológicas, puede ser un punto de partida para la selección de las mejores cepas para ser utilizadas en procesos de interés industrial.

### 3.2. Caracterización molecular intraespecífica de *S. magnoliae*

En este trabajo, 40 aislados representantes de las diferentes mieles fueron caracterizados molecularmente a nivel de cepa (mtDNA-RFLP). Se encontraron cuatro perfiles (cepas) diferentes correspondientes a los perfiles A, B, C y D. Las cepas del perfil A fueron predominantes, y se encontraron en 9 de las 12 zonas de muestreo (60%), mientras que las cepas del perfil B se encontraron en 6 sitios de muestreo diferentes (32,5%). Por otro lado, las cepas del perfil C y D fueron minoritarias (menor del 10%) y se pudieron aislar en las ciudades de Junín de los Andes y Cholila respectivamente.

### 3.3. Análisis fisiológico de diferentes cepas de *S. magnoliae*

Un aislado de cada perfil mtDNA-RFLP y de cada sitio de muestreo fue seleccionado para realizar ensayos a nivel fisiológico (17 aislados en total). A cada aislado se le asignó un código de la colección de cultivo del laboratorio (NPCC).

**Tabla 1.** Especies de levaduras detectadas en las mieles y agrupadas por origen.

Origen de la miel	Muestra*	Especies detectadas
Aluminé	1	<i>Starmerella magnoliae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	2	<i>Starmerella magnoliae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Chos Malal	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
Huinganco	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
Neuquén	1	<i>Starmerella magnoliae</i>
	2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
Neuquén	1	<i>Nakaseomyces glabratus</i> , <i>Saccharomyces uvarum</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	2	<i>Nakaseomyces glabratus</i> , <i>Saccharomyces uvarum</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
San Martín de los Andes	1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	2	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
Villa Nahueve	1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	1	<i>Starmerella magnoliae</i>
Río Negro	2	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	1	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
Cholila	2	<i>Starmerella magnoliae</i>
	1	<i>Starmerella magnoliae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella bombi</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
Chubut	1	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>
	1	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Starmerella magnoliae</i>

\*Número de mieles muestreadas por zona

En cuanto a la temperatura, la especie *S. magnoliae* presenta un rango amplio de crecimiento, pudiendo desarrollarse entre 8 y 30 °C naturalmente. Sin embargo, se han reportado algunos aislados que pueden crecer a 37°C. De los 17 aislados analizados, 4 presentaron crecimiento a 37°C (Figura 1), 3 de estos aislados presentaban perfil B (mtDNA-RFLP) y 1 de ellos perfil A. No se observó una relación entre el origen de aislamiento y la capacidad de crecimiento a una determinada temperatura. Sin embargo, se observa que algunos aislados que crecen a 37°C (NPCC1795, de perfil B y NPCC 1803, de perfil A) coexisten en el mismo sitio de muestreo con otros que no lo hacen, como ocurre en los sitios de muestreo de Junín de los Andes y Peñas Blancas. El crecimiento en diferentes rangos de temperaturas, podría ser un mecanismo adaptativo que les permite a diferentes aislados de la misma especie coexistir en un mismo ambiente.

Respecto de la tolerancia al sulfito, todos los aislados de *S. magnoliae* pudieron crecer hasta la primera dilución a una concentración de 4 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> equivalente a 500 mg/L de SO<sub>2</sub> total. Sin embargo, se observó que aislados del perfil A presentaron mayor tolerancia al sulfito (Figura 1). Según lo establecido por el CAA (Código

Alimentario Argentino), el valor máximo permitido de SO<sub>2</sub> total en bebidas fermentadas es de 200 mg/L, este valor es significativamente menor al tolerado por *S. magnoliae*, con lo cual esta especie no presentaría inhibición de crecimiento por este compuesto en las concentraciones usadas en la industria. Este resultado coincide con el obtenido por Fiore et al. (2005), donde observaron que una cepa de *S. magnoliae* toleraba concentraciones de hasta 300 mg/L de SO<sub>2</sub> total.

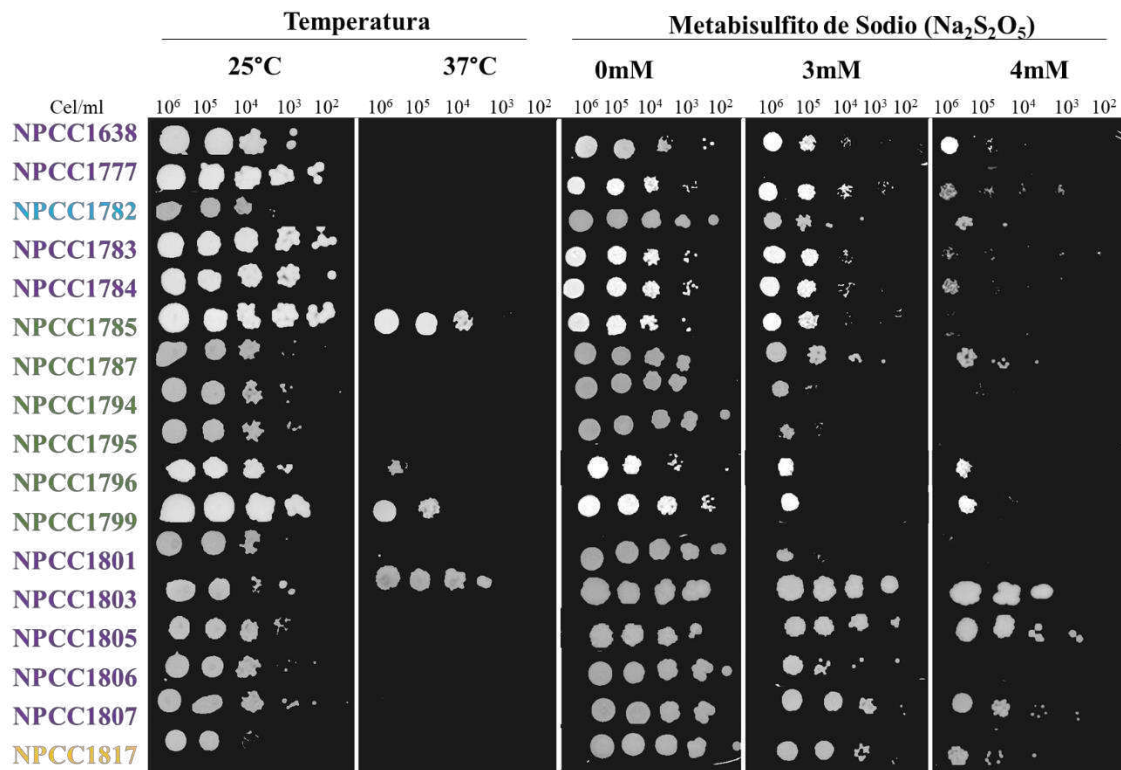
Por último, evaluar la tolerancia al etanol es de gran importancia en la industria de bebidas fermentadas. Todos los aislados de *S. magnoliae* fueron capaces de desarrollarse en medios conteniendo hasta 8% v/v de etanol (datos no mostrados). No obstante, los resultados evidenciaron un cierto grado de variabilidad intraespecífica respecto a su susceptibilidad a las diferentes concentraciones de alcohol. Trabajos previos realizados sobre cepas de esta especie aisladas de frutos de manzana, mostraron una tolerancia de hasta el 10% v/v (Desai et al., 2012).

### 3.4. Microfermentaciones de hidromiel con *S. magnoliae*

Una cepa de cada perfil mitocondrial fue seleccionada para realizar microfermentaciones

(100 mL) utilizando un mosto conteniendo 287 g/L de azúcares (129, 121 y 37 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente). Se agregó una cepa de la especie *S. cerevisiae*, aislada en este trabajo, como referencia.

este trabajo (95,65 g/L de azúcares totales). Respecto al consumo de azúcares, todas las cepas de *S. magnoliae* mostraron una clara preferencia por la fructosa respecto a la glucosa, esto coincide con el carácter fructofílico de esta



**Figura 1.** Ensayos de goteo de 17 aislados de *S. magnoliae* en respuesta a diferentes temperaturas de crecimiento y concentraciones de sulfito. Los colores en los nombres de los aislados indican el perfil molecular de cada uno (violeta: A, verde: B, celeste: C y amarillo: D).

En cuanto a la cinética de fermentación, ninguna de las cepas de *S. magnoliae* pudo finalizar completamente la fermentación a los 45 días, dejando más de 100 g/L de azúcares residuales, mientras que la cepa control de *S. cerevisiae* pudo consumir todos los azúcares a los 16 días (Tabla 2). Son escasos los trabajos que evalúan la aptitud fermentativa de diferentes cepas de *S. magnoliae*. Soares de Medeiros *et al.* (2014) demostraron la capacidad de la misma para fermentar y consumir todos los azúcares en mostos de frutas (manzana, pera, durazno y naranja); sin embargo, todos estos mostos contenían menor cantidad de azúcares que los evaluados en

especie, descrito por varios autores (Yu *et al.*, 2006). No obstante, se encontraron diferencias a nivel intraespecífico, las cepas NPCC1806 (perfil A) y NPCC1782 (perfil C) presentaron un mayor carácter fructofílico que el resto (Tabla 2). Con respecto a la sacarosa, todas las cepas consumieron este azúcar, aunque de forma variable. Este mismo comportamiento fue descrito por Yu *et al.* (2006) para *S. magnoliae*, quienes observaron que al comienzo de la

**Tabla 2:** Valores de azúcares residuales en microfermentaciones de hidromiel con diferentes cepas de *S. magnoliae* y una cepa de *S. cerevisiae* aislada en mieles patagónicas.

Azúcares	<i>S. magnoliae</i> NPCC1782	<i>S. magnoliae</i> NPCC1785	<i>S. magnoliae</i> NPCC1806	<i>S. magnoliae</i> NPCC1817	<i>S. cerevisiae</i> NPCC1634
Glucosa	125,47±7,54 <sup>a</sup>	160,07±2,06 <sup>a</sup>	148,44±40,81 <sup>a</sup>	145,16±6,12 <sup>a</sup>	1,81±2,08
Sacarosa	0,01±1x10 <sup>-3a</sup>	0,446±0,63 <sup>a</sup>	0,79±1,12 <sup>a</sup>	3,90±0,07 <sup>b</sup>	0,55±0,78
Fructosa	9,03±0,06 <sup>ab</sup>	17,44±1,38 <sup>b</sup>	5,37±3,45 <sup>a</sup>	34,12±6,61 <sup>c</sup>	1,8±9,4x10 <sup>-16</sup>

Letras en superíndice por fila indican diferencias significativas entre cepas, test de LSD de Fisher p value 0,05. No se incluyó en el análisis de ANOVA la cepa control NPCC1634.



fermentación había una acumulación de glucosa y fructosa causada por la hidrólisis de la sacarosa asociada a una elevada actividad invertasa presente en cepas de esta especie aisladas de mieles. En cuanto al consumo de glucosa, ninguna de las cepas fue efectiva en fermentar este monosacárido, dejando inclusive más glucosa que la del mosto inicial, esto pudo deberse a la degradación de la sacarosa con la consiguiente liberación de glucosa que no pudo ser consumida. Por otra parte, *S. cerevisiae* pudo consumir casi la totalidad de los tres azúcares (Tabla 2).

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son pioneros, observándose una predominancia de la levadura *S. magnoliae* en las mieles patagónicas. Se pudieron encontrar diferencias a nivel intraespecífico en cuanto a su perfil molecular y fisiológico. Su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, su resistencia al sulfito y su tolerancia al etanol, permiten inferir que estas levaduras podrían ser utilizadas en algunas fermentaciones industriales. Finalmente, el marcado poder fructofílico y la alta capacidad de consumir sacarosa de *S. magnoliae*, resultan características de particular interés para la elaboración de bebidas ricas en estos azúcares como la sidra.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos: PICT Start-up 2019-0034; PICT 2020-03104; PICT 2018-3686 Agencia I+D+i y PI04-143 UNCo. VK agradece a CONICET por su Beca Doctoral.

#### 5. Referencias

- ANMAT (2023) Código Alimentario Argentino. *Capítulo X Alimentos Azucarados*.
- Calderón D., Piromalli P., Apablaza O., Virgillito O. (2017). Guía para la elaboración de Hidromiel y Licor de miel del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Desai, M.V, Dubey, K.V, Vakil, B.V, y Ranade,V.V. (2012). Isolation, Identification and Screening of the Yeast Flora from Indian Cashew Apple for Sugar and Ethanol Tolerance. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* (Vol. 1).
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler, A., Flores, J., & Romano, P. (2005). Comparison between Yeasts from Grape and Agave Musts for Traits of Technological interest. *World J Microbiol Biotechnol*, 21, 1141–1147.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. (2011) The yeasts, a taxonomic study. Quinta edición. Ed. Amsterdam: Elsevier.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., Fernandez-Espinar, M.T., (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 75–85
- Origone, A.C., González Flores, M., Rodríguez, M.A., Querol, A. y Lopes, C.A. (2020) Inheritance of winemaking stress factors tolerance in *Saccharomyces uvarum*/*S. eubayanus* × *S. cerevisiae* artificial hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* 320: 108500.
- Piana, G.; Ricciadelli D' Albore; Isola, A. (1989). La Miel. Madrid, Mundi Prensa.
- Roxo G, Brillhante M, Moura M, de Sequeira MM, Silva L, Costa JC, Vasconcelos R, Talhinhos P, Romeiras MM. (2023) Genome size variation within *Crithmum maritimum*: Clues on the colonization of insular environments. *Ecol Evol.* 19;13(4).
- Soares de Medeiros, A. S. (2014). Fermentation of fruit juices by the osmotolerant yeast *Candida magnoliae* Tesis de Master. Universidade Nova de Lisboa.
- Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Nicoli, J. R., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 53(1), 339–343.
- Yu, J.-H., Lee, D.-H., Oh, Y.-J., Han, K.-C., Ryu, Y.-W., & Seo, J.-H. (2006). Selective Utilization of Fructose to Glucose by *Candida magnoliae*, an Erythritol Producer. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 870, Issue 132).