

Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia

Yeast diversity associated to Colombian traditional “chichas”

William Andrés López-Arboleda¹, Mauricio Ramírez-Castrillón¹,

Luz Adriana Mambuscay-Mena¹, Esteban Osorio-Cadavid^{1,2}

Resumen

En Colombia el conocimiento de la comunidad levaduriforme ha sido limitado, ya que los estudios se han enfocado principalmente en especies de interés clínico. Las fermentaciones espontáneas a partir de diversos sustratos representan hábitats de gran importancia para el estudio de la dinámica de las poblaciones de levaduras nativas, por esta razón, en el presente estudio se aislaron e identificaron las levaduras asociadas a las chichas de maíz, piña y arracacha, que son bebidas fermentadas de manera artesanal en Colombia.

Se realizó el aislamiento de las levaduras más representativas de la chicha durante sus tres fases de fermentación: inicial, tumultuosa y final. Inicialmente, se hizo una caracterización parcial de los aislados, que incluyó pruebas fisiológicas, y medición de su capacidad para producir filamentos y esporas. Sin embargo, debido a que estas técnicas no fueron suficientes para identificar los aislados hasta el nivel taxonómico de género o de especie, se complementó el estudio de cada aislado empleando técnicas moleculares basadas en el análisis de restricción del gen rRNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Cuando el empleo de esta técnica no permitió obtener resultados definitivos y para confirmar las asignaciones realizadas usando PCR-RFLPs, se secuenció el dominio D1/D2 del gen 26S rRNA de los aislados más representativos.

Mediante estas técnicas se lograron identificar las especies más representativas de los tres tipos de chicha: *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia hypolitica*, *Candida parapsilosis*, *Debaromyces hansenii*, *Cryptococcus arboriformis*, *Saccharomyces martiniae*, *Dekkera anomala*, *Aureobasidium pullulans* y *Candida pseudointermedia*. La caracterización preliminar de los aislados obtenidos, basada en pruebas de tolerancia a etanol y halo-tolerancia, permitió identificar levaduras nativas con posible utilización biotecnológica en el sector industrial.

Palabras clave: Levaduras, diversidad, chicha, identificación molecular, biotecnología

1 Grupo de Investigación en Biología Molecular de Microorganismos, Universidad del Valle, A.A. 25360. Cali-Colombia. E-mail: willi8702@gmail.com, mauriciogeteg@gmail.com, luza607@gmail.com

2 Profesor Titular sección de Genética, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali-Colombia. E-mail: esteban.osorio@correounivalle.edu.co

Abstract

In Colombia, knowledge about yeast communities has been limited because most reports have focused on yeast species with clinical relevance. The spontaneous fermentation of different substrates creates important habitats for analyzing wild yeast populations; for this reason, in this study we isolated and identified yeasts associated with the “chichas” of corn, pineapple, and “arracacha,” which are traditional fermented Colombian beverages.

The most representative yeasts were isolated from “chicha” during its three phases of fermentation: initial, tumultuous and final. Initially, we made a partial characterization of isolated yeasts, including macroscopic and microscopic descriptions, physiological tests, and measurement of capacity for producing spores and filaments. However, because these techniques were not sufficient for identification of isolated yeasts to the level of genus and species, the study was complemented by using molecular techniques based on restriction analysis of the ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2. When this technique did not permit us to obtain positive results and confirm the PCR-RFLP results, we used the sequence of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene instead for most representative isolates.

With these techniques, we identified the most representative yeast species of the three classes of “chicha”: *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Debaromyces hansenii*, *Cryptococcus arboriformis*, *Saccharomyces martiniae*, *Debkeera anomala*, *Aureobasidium pullulans* and *Candida pseudointermedia*. The preliminary characterization of isolated yeasts, based on ethanol-tolerance and salt-tolerance tests, permitted recognition of wild yeasts for possible biotechnological uses in industry.

Keywords: Yeasts, diversity, “chicha”, molecular identification, biotechnology

Recibido: marzo 25 de 2010
do: noviembre 5 de 2010

Aproba-

hólico de la chicha varía entre 2 a 12 por ciento (v/v) (Steinkraus, 1995)

Introducción

La chicha es una bebida alcohólica tradicional producida en Colombia y otros países suramericanos como Ecuador, Perú y Bolivia (Rodríguez *et al.*, 2005). Para la obtención de esta bebida se utilizan diferentes sustratos, tales como el maíz (*Zea mays*), piña (*Ananas comosus*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), chontaduro (*Bactris gasipaes*), maní (*Arachis hypogaea*) y trigo (*Triticum sativum*) (Bristol, 1988; Cutler and Cárdenas, 1947; Hayashida, 2008). En términos generales, su preparación consta de la mezcla de la materia prima con agua, “panela” (caña de azúcar) y otros suplementos (clavos, canela, hojas de naranja), que varían de acuerdo al sustrato empleado. El proceso de fermentación puede durar de 15 a 20 días para cereales y 4 a 8 días en frutas y tubérculos, a temperatura ambiente (de 10°C a 32°C). El contenido alco-

A lo largo de la fermentación se presenta una dinámica y sucesión de la comunidad levaduriforme, directamente relacionada con el aumento en la concentración de alcohol y variabilidad de compuestos orgánicos. Al inicio del proceso es posible detectar la mayor diversidad de levaduras, y a medida que el proceso avanza a las fases intermedia y final aparecen levaduras que se caracterizan principalmente por su alcohol-resistencia y alto poder fermentativo como la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La intervención de las diferentes especies de levaduras aportan propiedades organolépticas al producto final (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001).

En Colombia se desconoce casi por completo la diversidad de levaduras asociadas a suelos, aguas, alimentos y aún a los procesos fermentativos. En este sentido, Duarte *et al.* (1994) evaluaron la diversidad de levaduras del género *Cryptococcus* presentes en árboles

de Eucaliptos de Bogotá, siendo clasificadas de acuerdo a características morfológicas y bioquímicas. Vanegas *et al.* (2004) aislaron e identificaron levaduras nativas colombianas de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* a partir de diferentes sustratos, usando el kit API-20C AUX. Solamente Osorio-Cadavid *et al.* (2008) evaluaron la diversidad de levaduras de la bebida fermentada “champús” mediante técnicas moleculares, identificando levaduras tales como *S. cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis*, *P. fermentans*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Torulospira delbruekii*, *Hanseniaspora spp.*, *P. kluyveri var. kluyveri*, y *Galactomyces geotrichum*.

El propósito de esta investigación fue analizar la riqueza de especies de levaduras y hongos levaduriformes asociada a la producción de tres clases de chicha. De esta forma, este trabajo representa el primer reporte sobre la caracterización por métodos moleculares de la composición de levaduras nativas, a nivel de especie, que están implicadas durante la fermentación de la chicha a partir de dife-

rentes sustratos (piña, maíz y arracacha), en Colombia.

Materiales y métodos

Preparación de las chichas

Las chichas de maíz, piña y arracacha fueron preparadas en cinco repeticiones. La tabla 1 muestra el diagrama de flujo de la preparación de las diferentes chichas. La chicha de piña se prepara añadiendo agua y panela a cáscaras de piña, dejando fermentar espontáneamente entre 3 y 6 días. Por otro lado, para la preparación de las chichas de maíz y arracacha se debe realizar la cocción previa del sustrato antes de mezclar con otros ingredientes como la panela, clavos, entre otros, dejándose fermentar en recipientes de vidrio con tapa plástica entre 15 y 20 días para maíz y 5 a 8 días para piña y arracacha.

Tabla 1. Esquema de preparación de la chicha a partir de piña, maíz o arracacha. Cualquier clase de chicha se prepara mezclando ingredientes como la panela (calidad comercial) en el sustrato empleado y dejándose fermentar espontáneamente hasta obtener el producto final.

Sustrato	Piña (90g de cáscara variedad cayena lisa)	Maíz (100g)	Arracacha (150g)
agua	Hasta 1l		
Cocinar	no	2h (en ebullición)	30min (en ebullición)
Licuar	no	si	si
Dejar enfriar	no	25-35°C	
Adición suplementos	60g de panela	2 clavos, 50g de panela	3 Clavos, 90g de panela, 4 astillas de canela, 2 hojas de naranja
Calentar	no	20min	
Dejar enfriar	no	25-35°C	
Fermentar 25-35°C	3-6 días	15-20 días	5-8 días
Producto final	Chicha		

Aislamiento de levaduras

De cada chicha preparada se tomaron tres muestras en cada una de las fases de la fermentación: inicial (cuando todos los ingredientes estaban reunidos), tumultuosa (se presentaba burbujeo apreciable y acumulación de gas) y final (una vez finalizado el burbujeo), cada una con tres repeticiones. A partir de cada muestra, se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) y de cada dilución se tomaron 100 μ l para la siembra por dispersión en medio de cultivo YPDA (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% de glucosa, 2% agar-agar) suplementado con 25mg/l de penicilina y cloramfenicol. Las placas se incubaron a 30°C durante 2 a 3 días. Un número aleatorio de cada tipo de colonia fue aislado para su posterior identificación.

Caracterización fenotípica

Los aislados fueron analizados según criterios morfológicos y fisiológicos de acuerdo a las descripciones realizadas por Boekhout *et al.* (2004). Se evaluó la morfología celular, modo de reproducción vegetativa y caracterización fisiológica. La habilidad para fermentar (2% de fuente de carbono) y asimilar (0.5% de fuente de carbono) glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa y xilosa fue evaluada por la acumulación de dióxido de carbono en tubos durham y turbidez en escala de Wickerham, respectivamente. Finalmente, se evaluó la halo-tolerancia (10, 15% p/v) y tolerancia a etanol (10 y 15% v/v) en medio YPDA (Boekhout *et al.* 2004). Todas las pruebas fisiológicas se realizaron a 30°C.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN de levaduras se realizó utilizando la metodología descrita por Osorio-Cadavid *et al.* (2009). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría a 260nm y se determinó la pureza median-

te la relación espectrofotométrica A260/A280nm.

Identificación molecular de levaduras

La identificación de los aislados fue llevado a cabo por PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 como lo describe Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Para la amplificación, los primers usados fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') (White *et al.* 1990). Los productos de PCR fueron digeridos con 1U de las endonucleasas *Hae* III, *Hinf* I y *Cfo* I (Fermentas, USA) a 37°C por 2h.

Para la amplificación, se tomaron 7 μ l (aproximadamente 1ng/ μ l) de ADN extraído y se resuspendió en 28 μ l de mezcla de PCR: 0.5 μ M ITS1, 0.5 μ M ITS4, 10 μ M dNTPs, 1X NH_4^+ , 1.5mM MgCl_2 , y 1U de Taq Polimerasa. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador automático (M.J. Research, USA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 55°C por 1 min, y extensión a 72°C por 2 min, con una extensión final de 10 min a 72°C. (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Los productos de PCR y fragmentos de restricción fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%, en buffer TBE 1X (Tris-Borato, EDTA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular 50-1000pb (Fermentas, USA), usando el software UVI-gelStartMw v11.0©

Los patrones obtenidos fueron comparados con la base de datos de identificación rápida de levaduras Yeast-id.com del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España. Se tomó como control positivo para análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares la cepa comercial RH218 (ATCC) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Secuenciación del Dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S

La secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen ribosomal 26S fue llevada a cabo para los grupos principales de los aislados, e identificaciones dudosas, de acuerdo a Kurtzman and Robnett (1998). Para la amplificación del dominio D1/D2 se usaron los primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTC AAGACGG-3'). Las reacciones fueron llevados a cabo en un termociclador (Multigene-Labnet, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 55°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 10 min a 72°C. (Osorio-Cadavid *et al.*, 2008).

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por la empresa MACROGEN (USA) bajo las condiciones estandarizadas por ellos. Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas mediante el software Chromas Pro v. 1.42 ® y comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank usando el algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)".

Resultados

A partir de 196 cepas aisladas de levaduras y hongos levaduriformes, fueron obtenidos 22 perfiles de restricción diferentes. La tabla 2 contiene las longitudes de los amplificadores por PCR y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las tres enzimas de restricción. Nueve de los 22 grupos fueron identificados después de comparar los pesos moleculares de los productos de restricción con la base de datos Yeast-id.com (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Guillamón *et al.*, 1998). Las especies asignadas para estos grupos fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *K. martiniae*, *C. maltosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Dekkera anomala*, *C. pseudointermedia*. Para la identificación de los demás grupos y confirma-

ción de los anteriores, fue necesaria la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande 26S rDNA. En total, se analizaron 50 aislados mediante esta técnica y se asignaron a nivel taxonómico de especie con homología entre 98 y 100% usando el algoritmo BLAST de la base de datos GenBank. La identificación de los grupos II, V, VII, X, XIV y XXII fue confirmada comparando las secuencias con el GenBank. Por otro lado, los aislamientos de los otros grupos sólo pudieron ser identificados mediante secuenciación, ya que el método PCR-RFLP no lo permitió hacer. De esta forma, fueron identificadas hasta nivel de especie el 95% de las cepas estudiadas.

La riqueza y abundancia de levaduras encontradas en cada uno de los diferentes tipos de chicha de acuerdo a su fase de fermentación se muestran en la tabla 2. Las especies que presentaron mayor abundancia en las tres chichas fueron *Saccharomyces cerevisiae* (15%), *Pichia guilliermondii* (18%) y *Candida tropicalis* (18%). En la chicha de piña no se encontró ninguna especie que estuviera presente en las tres fases de fermentación, a diferencia de lo encontrado en las chichas de maíz (*C. tropicalis*) y de arracacha (*H. uvarum* y *P. kluyveri*). La especie *P. kluyveri* estuvo presente en la fase inicial de las tres chichas, mientras que *S. cerevisiae* se presentó en las fases tumultuosa y final. Especies como *H. guilliermondii* y *P. guilliermondii* fueron compartidas en la chicha de maíz y piña, y *C. tropicalis* en maíz y arracacha. Las demás especies (tabla 3) fueron aislados únicos para cada tipo de chicha.

En la tabla 4 se muestran las principales características de los grupos obtenidos a partir de las chichas. Entre los aislados, 96 de los 196 crecieron en una concentración de etanol del 15% (v/v), 65 presentaron filamentación, 90 fermentaron glucosa en un lapso de tiempo no mayor a 7 días, 6 toleraron concentraciones del 15% (p/v) de NaCl, y sólo 3 pudieron degradar el almidón. Por otro lado, se realizaron pruebas de asimilación de xilosa y galactosa y de fermentación de galactosa encontrando que 35 aislados fueron positivos para la asimilación

Tabla 2. Tamaños de los productos de PCR y fragmentos de restricción obtenidos para los aislados de levaduras.

Grupo	Especie	Producto de Amplificado	Fragmentos de restricción		
			<i>Hinf</i> I	<i>Hha</i> I (<i>Cfo</i> I)	<i>BsuR</i> I (<i>Hae</i> III)
I	<i>H. uvarum</i>	750	350+200+160	330+110	750
II	<i>S. cerevisiae</i>	850	370+140	360+320	290+200+150
III	<i>P. kluyveri</i>	450	250+210	180+130+90	370
IV	<i>K. exigua</i>	700	340+240+130	370+300	440+220
V	<i>C. tropicalis</i>	520	270	300+260	440
VI	<i>H. guilliermondii</i>	780	360+200+160	340+320+105	780
VII	<i>P. guilliermondii</i>	625		300+260	400+115+90
VIII	<i>P. fermentans</i>	450	320+300	170+100+100+80	340+90
IX	<i>A. pullulans</i>	593	250+200 282+178+135	185+173+96	428+150
X	<i>C. parapsilosis</i>	540	270	300+245	390+120
XI	<i>D. hansenii</i>	650	650	650	410+150+90
XII	<i>Y. lipolytica</i>	450	220	240+200	410
XIII	<i>Cryptococcus arboriformis</i>	600	330+280	300	450
XIV	<i>K. martiniae</i>	790	380+360	320+210+160+100	790
XV	<i>C. maltosa</i>	600	326+300		600
XVI	<i>T. delbrueckii</i>	830	450+410	344+273	834
XVII	<i>R. glutinis</i>	609	376+253	343+236+163	423+246
XVIII	<i>K. marxianus</i>	646	211+173	332+253	211+173
XIX	<i>D. anomala</i>	724	344+204+186	282+184	722
XX	<i>C. pseudointermedia</i>	522		300+144	378
XXI	<i>Candida sp.</i>	527	218+146	218	409
XXII	<i>Issatchenkia sp.</i>	470	262+189 267+130	262+248 250+145	326

Tabla 3. Especies y número de aislados por especie encontrados en las chichas de piña, maíz y arracacha en cada una de sus fases de fermentación (1- inicial, 2- tumultuosa, 3- final), ordenados por abundancia.

Especie	Maíz			Piña			Arracacha			Total
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Fase	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<i>C. tropicalis</i>	12	12	5					6		35
<i>P. guilliermondii</i>	1	17		7	10					35
<i>S. cerevisiae</i>		3	1		2	13		3	7	29
<i>P. kluyveri</i>	4			2	1		1	12	2	22
<i>H. uvarum</i>							6	8	3	17
<i>P. fermentans</i>		12	4							16
<i>H. guilliermondii</i>		5	2	2	1					10
<i>Aureobasidium pullulans</i>				6						6
<i>K. exigua</i>								4		4
<i>Candida sp.</i>					3					3
<i>Issatchenkia sp.</i>						3				3
<i>Rhodotorula glutinis</i>		2								2
<i>Hanseniaspora sp. 3</i>					2					2
<i>C. parapsilosis</i>							1			1
<i>D. hansenii</i>							1			1
<i>Y. lipolytica</i>							1			1
<i>Cryptococcus arboriformis</i>							1			1
<i>K. martiniae</i>								1		1
<i>Dekkera anomala</i>				1						1
<i>C. pseudointermedia</i>				1						1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>					1					1
<i>C. maltosa</i>		1								1
<i>Torulasporea delbrueckii</i>			1							1
<i>Hanseniaspora sp. 1</i>							1			1
<i>Hanseniaspora sp. 2</i>								1		1
Total	17	52	13	19	20	16	12	35	12	196

de estos azúcares, y 3 lograron fermentar galactosa en menos de 7 días.

Discusión

Las bebidas fermentadas tradicionales, preparadas con variedades de sustrato (cereales, frutas y tubérculos) son de gran valor cultural en distintos lugares del mundo. Aunque la microbiota de estos productos es compleja y desconocida, se han reportado levaduras que están involucradas en diferentes tipos de alimentos y bebidas fermentadas artesanales (Zulu *et al.*, 1997; Torner *et al.*, 1992; Gadaga *et al.*, 2001)

En las chichas de piña y arracacha se presentó un patrón de riqueza aparentemente similar a lo reportado en otros estudios (Suarez *et al.*, 2007; Bovo *et al.*, 2009), que se caracteriza por la presencia de gran cantidad de especies

diferentes de levaduras con pocos aislados representativos, y la dominancia casi completa por parte de *S. cerevisiae* al final de la fermentación. Contrario a esto, la chicha de maíz mostró una menor riqueza de especies en la fase inicial de la fermentación debido a la cocción prolongada del sustrato durante la preparación de la bebida. En la fase tumultuosa, la riqueza de especies fue similar a las otras chichas, no obstante, en la fase final no se presentó dominancia de *S. cerevisiae*.

El análisis de los aislados mostró que, en la chicha de maíz, las especies dominantes fueron *C. tropicalis*, *P. guilliermondii* y *P. fermentans*. Para la chicha de piña las especies más representativas fueron *P. guilliermondii* y *S. cerevisiae*. Finalmente, en la chicha de arracacha dominaron las especies *H. uvarum*, *P. kluyveri* y *S. cerevisiae*. La participación de estas especies ha sido

Tabla 4. Algunas características fenotípicas de las levaduras más representativas aisladas de las chichas de piña, maíz y arracacha.

Especie	No. de aislados	Esporulación	Filamentación	Crecimiento Sacarosa	Fermentación sacarosa	Fermentación glucosa	Crecimiento galactosa	Resistencia		Asimilación almidón
								Etanol 15%	NaCl 15%	
<i>H. uvarum</i>	17			1	2	2				
<i>S. cerevisiae</i>	29	27		14	6	29	2	13	1	
<i>P. kluyveri</i>	22	1	4	13		6	1	5		1
<i>K. exigua</i>	4			4	1		2	4	1	2
<i>C. tropicalis</i>	35		35	6	5	29	29	29		
<i>H. guilliermondii</i>	10					7	3	7		
<i>P. guilliermondii</i>	35		20	19			18	18		
<i>P. fermentans</i>	16			4		17		16		
<i>A. pullulans</i>	6		5							
Total	196	28	65	64	14	90	58	96	6	3

reportada en otros estudios de bebidas fermentadas (Osorio-Cadavid *et al.*, 2008; Sefa-Dedeh *et al.*, 1999; Jeyaram *et al.*, 2008).

Candida tropicalis estuvo presente en las tres fases de la fermentación de la chicha de maíz y en la fase tumultuosa de la chicha de arracacha. Sefa-Dedeh *et al.* (1999) encontraron esta especie en “pito”, una bebida fermentada tradicional de Ghana (África), que se realiza a base de cereales como el maíz y el sorgo. Su presencia en este tipo de bebidas puede estar relacionada con su capacidad de degradar carbohidratos complejos (Rodríguez *et al.*, 2006). Por otro lado, *Pichia guilliermondii* fue registrado en la fase inicial y tumultuosa de las chichas de maíz y piña. Esta especie fue aislada por Morrissey *et al.* (2004), durante la fermentación de la cidra, Jeyaram *et al.* (2008) en el “hamei”, un vino de arroz tradicional de la India, Zott *et al.* (2008), evaluando la dinámica y diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* durante las etapas tempranas de la elaboración del vino. Algunas investigaciones relacionadas con la contaminación de vinos, han reportado a *Pichia guilliermondii* como responsable de la pérdida de varias características organolépticas importantes en vinos almacenados (Días *et al.*, 2003). *Pichia fermentans* fue aislada únicamente en las fases tumultuosa y final de la chicha de maíz. Esta especie ha sido encontrada en otros tipos de bebidas fermentadas, como el “champús” donde fue reportada como una de las levaduras fermentativas dominantes (Osorio-Cadavid *et al.*, 2008). Clemente-Jiménez *et al.* (2004) identificaron esta especie durante la fermentación espontánea de 6 variedades de mosto de uvas.

Quizá la especie más reconocida, tanto en bebidas fermentadas espontáneas como inoculadas, es *S. cerevisiae* (Jespersen, 2003), siendo una de las de mayor interés a nivel comercial, ya que produce y tolera altas concentraciones de etanol y sintetiza compuestos volátiles que le brindan el sabor y aroma al producto final. En las bebidas estudiadas, fue registrada en las fases tumultuosa y final con alta dominancia en piña y arracacha. Omemu *et al.* (2007) aislaron estas cepas de “ogy”, una bebida que se produ-

ce de la fermentación del maíz, sorgo o millo en los países del oeste de África. Además, Osorio-Cadavid *et al.* (2008), reportaron esta especie en el “champús”. *H. uvarum* fue registrada solamente para la chicha de arracacha en las tres fases fermentativas. Mingorance-Cazorla *et al.* (2003) la reportan como una levadura poco resistente a altas concentraciones de alcohol, que sugiere, dependiendo de la dinámica de comunidades microbianas, una alta variabilidad de contenido alcohólico en el producto final, además, participa en la producción de ésteres (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). *Pichia kluyveri* fue registrada en las tres chichas y en la literatura ha sido utilizada como una especie co-fermentativa en procesos de producción de bebidas fermentadas, uno de estos involucró la producción de tioles volátiles que añaden aroma y sabor al “Sauvignon Blanc” de Nueva Zelanda. Osorio-Cadavid *et al.* (2008) también mostraron la importancia de esta especie en la producción de compuestos volátiles, detectando la producción de caprilato de butilo en la bebida tradicional colombiana “champús”. Además, Ferreira *et al.* (2008) resaltan la importancia de *Pichia kluyveri* por su alta actividad pectinolítica a lo largo de la fermentación de la pulpa y el mucílago de café.

Las propiedades de las bebidas fermentadas tradicionales son el resultado combinado de la actividad metabólica sinérgica de grupos microbianos o cepas únicas, junto con las características del proceso de producción. En los procesos de fermentación, las levaduras brindan una contribución útil para el mejoramiento del sabor y aceptabilidad del producto (Banigo *et al.*, 1974; Odunfa and Adeyele, 1985). Nuestros resultados mostraron que las especies de levaduras y cepas aisladas de estos tres tipos de chicha colombiana, poseen una gran diversidad metabólica, que representa una fuente importante de nuevos biotipos de levaduras con potencial aplicación en la industria.

Conclusiones

Este estudio brinda información importante sobre la diversidad de la microbiota en bebidas fermentadas artesanales colombianas. Especies como *Y. lipolytica* y *K. exigua* no han sido reportadas en otras bebidas fermentadas. Los datos obtenidos en este estudio pueden ser útiles para la selección de levaduras con características deseables para la industria. Finalmente, es importante la evaluación del potencial biotecnológico de estos aislados, en futuras investigaciones.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle (CI: 7752). Se agradece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC de la Universidad de Valencia (España) por el acceso a la base de datos Yeast-id.com. Finalmente, agradecemos a la profesora Neyla Benitez por la revisión y sugerencias de este manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Banigo, E.O.I., de Man, J.M., Duitschaever, C.L. 1974. Utilization of high-lysine corn for the manufacture of ogi using a new improved processing system. *Cereal Chemistry* 51: 559–572
- Boekhout, T., Robert, V., Smith, M., Stalpers, J., Yarrow, D., Boer, P., Buis, R., Gijswijt, G., Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Guého, E., Guillot, J., Roberts, I. 2004. *Yeasts of the World Version 2.0*. ETI Biodiversity Center, Amsterdam, The Netherlands
- Bovo, B., Andrighetto, C., Carlot, M., Corich, V., Lombardi, A., Giacomini, A. 2009. Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. *International Journal of Food Microbiology* 129: 221–228
- Bristol, M.L. 1988. Edible arracachas of the Sibundoy. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 16: 107-110
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Lasheras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21: 149–155
- Cutler, H.C., Cardenas, M. 1947. Chicha, a native south american beer. *Botanical Museum Leaflets*, Harvard University 18: 33-60
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, T., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2003. Identification of yeast originated from wine related environment and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20: 567-574
- Duarte A., Ordoñez N. y Castañeda E. 1994. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santafé de Bogotá. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 36(2): 125-130
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematics Bacteriology* 49: 329-337
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 67: 2056-2061
- Ferreira-Silva, C., Batista, L.R., Magalhes-Abreu, L., Souza-Dias, E., Freitas-Schwan, R. 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*. 25: 951–957.
- Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N., Narvhus, J.A. 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *International Journal of Food Microbiology* 68: 21–32
- Guillamón, J.M., Cano, J., Barrio, E., Sabaté, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Archaeological Microbiology* 169: 387-392
- Hayashida, F.M. 2008. Ancient beer and modern brewers: Ethnoarchaeological observations of chicha production in two regions of the North Coast of Peru. *Journal of Anthropological Archaeology* 27: 161-174
- Jespersen, L. 2003. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research* 3: 191–200
- Jeyaram, K., Mohendro-Singh, W., Capece, A., Romano, P. 2008. Molecular identification of yeast species as-

- sociated with 'Hamei'- A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology* 124: 115-125.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-71.
- Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez F.J., Rodríguez-Vico, F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 297-304.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 97: 647-655
- Odunfa, S.A., Adeyele, S. 1985. Microbiological changes during the traditional production of Ogi-baba, a West African fermented sorghum gruel. *Journal of Cereal Science* 3: 173-180
- Omemu, A.A., Oyewoleb, O.B., Bakole, M.O. 2007. Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. *Food Microbiology*. 24: 571-576.
- Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., Lopez, W.A., Mambuscay, L.A. 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11: 125-131
- Osorio-Cadavid, E., Chaves-Lopez, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G. 2008. Detection and identification of wild yeasts in champús, a fermented colombian maize beverage. *Food Microbiology* 25: 771-777
- Rodríguez, D., Espitia, M., Caicedo, Y., Cordoba, Y., Barena, Y., Mora, C. 2005. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 34(2): 140-146
- Rodríguez, Z., Boucourt, R., Rodríguez, J., Albelo, N., Nuñez, O., Herrera, F.R. 2006. Isolation and selection of microorganisms with capacity for degrading starch. *Cuban Journal of Agricultural Science* 40: 331-336
- Sefa-Dedeh, S., Sanni, A.I., Tetteh, G., Sakyi-Dawson, E. 1999. Yeasts in the traditional brewing of Pito in Ghana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 593-597
- Steinkraus, K.H. 1995. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Suárez, B., Pando, R., Fernández, N., Querol, A., Rodríguez, R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24: 25-31.
- Torner, M.J., Martínez-Anaya, M.A., Antuna, B., Benedito de Barber, C. 1992. Headspace flavour compounds produced by yeasts and lactobacilli during fermentation of preferments and bread doughs. *International Journal of Food Microbiology* 15: 145-152
- Vanegas, I.A., Yepes, M.S. y Ruiz, O.S. 2004. Producción de Xilitol a partir de levaduras colombianas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6: 31-36
- White, T.J., Burns, T., Lee, S., Tayler, J., 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Academic Press, New York.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. 2008. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 197-203.
- Zulu, R.M., Dillon, V.M., Owens, J.D. 1997. Munkoyo beverage, a traditional Zambian fermented maize gruel using *Rhynchosia* root as amylase source. *International Journal of Food Microbiology* 34: 249-258