

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS TAXA DE
LEVADURAS PRESENTES EN EL FRUTO DE TAXO (*Passiflora
mollissima*), CON CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA
ALCOHÓLICA.**

AUTORAS:

KATHERINE ELIZABETH HEREDIA PEÑAFIEL

ESTEFANÍA CHIAYAN KWOK TACAN

DIRECTORA:

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPIN

Quito, Marzo del 2015

DECLATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, Marzo del 2015

(f) _____

Katherine Elizabeth Heredia Peñafiel

CI: 1724591845

(f) _____

Estefanía Chiayan Kwok Tacan

CI: 1002692984

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestros padres quienes nos apoyaron todo el tiempo.

A nuestros maestros quienes nunca desistieron al enseñarnos, aun sin importar que muchas veces no ponía atención en clase, a ellos que continuaron depositando su esperanza en nosotros.

A todos los que nos apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes les debemos por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por darnos todo lo necesario para lograr nuestras metas.

A la Universidad Politécnica Salesiana.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI por el apoyo brindado en la realización del trabajo investigativo.

A la Msc. Laura Huachi por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis.

A nuestros padres por todo su apoyo incondicional y por habernos dado la oportunidad de estudiar.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Industria vinícola.....	5
1.1.1. Biotecnología en la industria vinícola	5
1.1.2. Elaboración del vino.....	8
1.1.3. Países productores de vino	8
1.1.4. Clasificación de los vinos.....	10
1.1.4.1.Según la forma de elaboración.....	10
1.1.4.2.Según la edad	10
1.1.4.3.Según el grado de dulce	10
1.2. Familia Passifloracea.....	11
1.2.1. Taxo (<i>Passiflora mollissima</i>)	11
1.2.1.1.Origen.....	11
1.2.1.2.Clasificación taxonómica	11
1.2.1.3.Descripción botánica	12
1.2.1.4.Composición química.....	13
1.2.1.5.Propiedades y usos	13
1.2.1.6.Zonas de cultivo	14
1.2.1.7.Requerimientos del cultivo	14
1.3. Levaduras	15
1.3.1. Generalidades de las levaduras	15
1.3.1.1.Clasificación.....	15
1.3.1.2.Morfología	15
1.3.1.3.Fisiología.....	16

1.3.1.4.Reproducción	17
1.3.2. Requerimientos esenciales	18
1.3.3. Requerimientos Nutricionales	19
1.3.4. Identificación.....	20
1.3.4.1.Criterios Morfológicos	20
1.3.4.2.Criterios Bioquímicos enzimáticos	26
1.3.4.2.1.Identificación basada en la asimilación de nutrientes	27
1.3.4.3.Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas	28
1.3.4.4.Criterios genéticos.....	28
1.3.5. Cinética de Crecimiento	28
1.3.6. Curva de crecimiento	29
1.4. Levaduras involucradas en la vinificación	31
1.4.1. <i>Saccharomyces</i>	32
1.4.2. Papel de las levaduras sobre el vino.....	34
1.4.2.1.Papel de las levaduras sobre los polifenoles	34
1.4.2.2.Papel de las levaduras sobre los aroma	34
1.5. Fermentación.....	35
1.5.1. Tipos de fermentación	35
1.5.1.1.Fermentación alcohólica	35
1.6. Las enzimas	37
CAPÍTULO 2.....	39
METODOLOGÍA	39
2.1. Fase de campo	39
2.1.1. Ubicación	39
2.1.2. Preparación y dispensación de medios para muestreo de frutos	40
2.1.3. Muestreo de frutos.....	41

2.2.	Fase de laboratorio	41
2.2.1.	Preparación y dispensación de medios	41
2.2.1.1.	Medio YPD agar para el aislamiento de levaduras	41
2.2.1.2.	Medio lisina.....	42
2.2.1.3.	Medio YPD con concentraciones de etanol al 6%, 8% y 10%	42
2.2.1.4.	Medio SDA (Sabouroad Dextrose Agar)	43
2.2.1.5.	Medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con diferentes pH	43
2.2.2.	Aislamiento de levaduras	44
2.2.3.	Codificación de levaduras aisladas.....	45
2.2.4.	Selección de levaduras con resistencia alcohólica	45
2.2.5.	Selección de levaduras con características fermentativa.....	46
2.2.6.	Identificación de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica	46
2.2.6.1.	Identificación macroscópica	46
2.2.6.2.	Identificación microscópica	47
2.2.6.3.	Identificación Bioquímica.....	48
2.2.7.	Curva de crecimiento	50
CAPÍTULO 3.....		52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		52
3.1.	Aislamiento y selección de levaduras	52
3.2.	Selección de levaduras con resistencia alcohólica	56
3.3.	Selección de levaduras con características fermentativas	59
3.4.	Identificación de las levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica	61
3.4.1.	Identificación macroscópica de las levaduras que presentan capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.	61
3.4.2.	Identificación microscópica de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2	65

3.4.3. Identificación bioquímica de las levaduras que presentan capacidad fermentativa y resistencia alcohólica	68
3.5. Evaluación de la cinética de crecimiento con los parámetros de pH y temperatura, de las cepas identificadas como <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	82
GLOSARIO	88
LISTA DE REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del taxo	11
Tabla 2. Composición química del taxo.....	13
Tabla 3. Composición química de una célula de levadura.....	17
Tabla 4. Aislamiento de levaduras del cantón Cayambe, Pichincha.....	52
Tabla 5. Aislamiento de levaduras de la parroquia Calderón, Pichincha.....	53
Tabla 6. Levaduras con resistencia alcohólica. Cayambe.....	56
Tabla 7. Levaduras con resistencia alcohólica. Calderón	57
Tabla 8. Levaduras con características fermentativas. Cayambe.....	59
Tabla 9. Levaduras con características fermentativas. Calderón	60
Tabla 10. Identificación macroscópica de la cepa 10 OTX-2.....	62
Tabla 11. Identificación macroscópica de la cepa 11 OTX-2.	62
Tabla 12. Identificación microscópica de la cepa 10 OTX-2.....	66
Tabla 13. Identificación microscópica de la cepa 11 OTX-2.....	67
Tabla 14. Identificación Bioquímica de las levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica	69
Tabla 15. Resultados de la identificación bioquímica de levaduras con el software ERIC®	70
Tabla 16. Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes pH., de la cepa 10 OTX-2	73
Tabla 17. Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes pH., de la cepa 11 OTX-2	73
Tabla 18. Valores máximos de crecimiento alcanzados por las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2 en relación al pH.....	75
Tabla 19. Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes temperaturas de la cepa 10 OTX-2.....	76
Tabla 20. Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes temperaturas de la cepa 11 OTX-2.....	76
Tabla 21. Valores máximos de crecimiento (nm) alcanzados por las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, en relación a la temperatura.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración del vino tinto.....	9
Figura 2. Fruto de taxo o curuba (<i>Passiflora mollissima</i>).....	12
Figura 3. Célula de una levadura.....	16
Figura 4. Reproducción sexual y asexual de las levaduras	18
Figura 5. Identificación macroscópica de <i>Rhodotorula rubra</i> en SDA (Sabouroad Dextrose Agar).....	21
Figura 6. Producción de tubo germinal por <i>Candida albicans</i>	23
Figura 7. Aspecto microscópico de <i>Trichosporon beigeli</i> (x1.000)	23
Figura 8. Aspecto microscópico de <i>Geotrichum candidum</i> (x1.000)	24
Figura 9. Aspecto microscópico de la formación de pseudomicelio y clamidosporas por <i>Candida albicans</i> (x400).	24
Figura 10. Aspecto microscópico <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 11. Proceso de elaboración del etanol.....	36
Figura 12. Producción de etanol y ácido acético.....	37
Figura 13. Lugar de muestreo de los frutos de taxo en la parroquia Juan Montalvo (Cantón Cayambe).....	39
Figura 14. Lugar de muestreo de los frutos de taxo en la parroquia Calderón	40
Figura 15. Vista macroscópica de la cepa 10 OTX-2	62
Figura 16. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces sp.</i>	62
Figura 17. Vista macroscópica de la cepa 11 OTX-2	63
Figura 18. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces sp.</i>	63
Figura 19. Vista microscópica de la cepa 11 OTX-2.....	67
Figura 20. Vista microscópica de <i>Saccharomyces sp.</i>	67
Figura 21. Prueba Bioquímica de la cepa 10 OTX-2.....	69
Figura 22. Pruebas estándar positivas para cada pocillos	69
Figura 23. Prueba Bioquímica de la cepa 11 OTX-2.....	69
Figura 24. Pruebas estándar positivas para cada pocillos	69
Figura 25. Resultados del crecimiento de la levadura 10 OTX-2 en relación al pH..	74
Figura 26. Resultados del crecimiento de la levadura 11 OTX-2 en relación a la temperatura	74
Figura 27. Resultados del crecimiento de las levaduras 10 OTX-2 y 11 OTX-2, en relación al pH.....	75

Figura 28. Resultados del crecimiento de la levadura 10 OTX-2, en relación a la temperatura.	77
Figura 29. Resultados del crecimiento de la cepa 11 OTX-2, en relación a la temperatura	77
Figura 30. Resultados del crecimiento de la cepa 11 OTX-2, en relación a la temperatura.	78

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Preparación y dispensación de medios de cultivo.	90
Anexo 2. Resistencia alcohólica de cepas aisladas de frutos del cantón Cayambe ...	91
Anexo 3. Resistencia alcohólica de cepas aisladas de frutos de la parroquia Calderón.	92
Anexo 4. Identificación macroscópica de cepas aisladas de frutos del cantón Cayambe.	93

RESUMEN

En la fermentación alcohólica, intervienen varios microorganismos como *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Saccharomyces*, siendo éste último el más importante en la producción de vino, debido a que produce mayor porcentaje de etanol en condiciones de crecimiento anaerobio; es por esta razón que la presente investigación, está basada en el aislamiento e identificación de especies de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, presentes en el fruto de Taxo (*Passiflora mollissima*) provenientes de las parroquias Juan Montalvo (Cayambe) y Calderón de la provincia de Pichincha-Ecuador.

Se obtuvo un total de 49 cepas de levaduras con características macroscópicas diferentes como el color, tamaño, forma, aspecto y contorno; de las cuales, se determinó su resistencia alcohólica, para lo cual se utilizó el medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con diferentes concentraciones de etanol, dando como resultado que, el 53.06% resistió a 6°GL, el 29.41% a 8°GL y no se evidenció crecimiento a 10°GL. A su vez las cepas resistentes a 6°GL y 8°GL, fueron identificadas microscópicamente, mediante el reactivo azul de lactofenol, el cual permite observar estructuras como micelios y esporas. Estas cepas fueron sembradas en el medio diferencial lisina con el fin de seleccionar las cepas que pertenecen al género *Saccharomyces*, obteniendo dos cepas de éste género. Se realizó pruebas bioquímicas RapID yeast plus para corroborar los resultados.

Se evaluó la cinética de crecimiento de las dos cepas obtenidas mediante espectrofotometría, estableciendo parámetros como pH y temperaturas, utilizando el medio YPD broth. Los resultados muestran que las temperaturas y pH óptimos de crecimiento son 25°C y 5.8 respectivamente.

Palabra Claves: *Saccharomyces cerevisiae*, resistencia alcohólica, características fermentativas, espectrofotometría.

ABSTRACT

In alcoholic fermentation involves several microorganisms such as *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* and *Saccharomyces*, the latter being the most important in the production of wine, because it produces higher ethanol in anaerobic growth conditions; for this reason that the present investigation is based on the isolation and identification of yeast species with fermentative characteristics and alcoholic strength present in the fruit of Taxo (*Passiflora mollissima*) from parishes Juan Montalvo (Cayambe) and Calderon.

A total of 49 strains of yeasts with different macroscopic features such as color, size, shape, appearance and contour was obtained; of which, the alcoholic strength was determined in agar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) with varying concentrations of ethanol, resulting that the 53.06% resisted 6°GL, the 29.41% to 8°GL and no growth was observed at 10°GL. The resistant strains to 6° GL and 8°GL, were identified microscopically by lactophenol blue reagent, which allows observing structures like spores and mycelia. These strains were seeded in the lysine differential medium to select strains belonging to the genus *Saccharomyces*, obtaining two strains of this genus. Biochemical tests were performed RapID yeast plus to corroborate the results.

Growth kinetics of the two strains obtained was evaluated spectrophotometrically, by setting parameters such as pH and temperature using YPD broth. The results show that the optimum temperature and pH for growth is 25 ° C and 5.8 respectively.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic strength, fermentation characteristics, spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

El género *Passiflora*, es el más grande de la familia *Passifloraceae* comprende cerca de 500 especies, ninguna se caracteriza por poseer un alto contenido de compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes; excepto *Passiflora mollissima* (taxo), que es una fruta rica en polifenoles responsables de atrapar las más importantes especies reactivas de oxígeno como hidroxilo, peroxilo y superóxido (Angulo, 2003, p.3).

El taxo, es una fruta tropical de la región andina, crece sobre los 2.000 y 3.000 m.s.n.m., con temperaturas entre 8°C a 16°C y una humedad relativa de 65% a 75%. Este fruto es cultivado principalmente en Chile, Venezuela, Perú y en el Ecuador se encuentran en los valles bajos del callejón Interandino que comprenden las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo y Azuay (Landa, 2012, p.27).

De acuerdo con Barreno (2013), la composición del taxo, por cada 100 g de fruta comestible está formada por agua 92%, calorías 25g, proteínas 0.60g, grasas 0.10g, carbohidratos 6.30g, fibra 0.30g, calcio 4mg, fósforo 20mg, hierro 0.40mg y vitaminas como ácido ascórbico 70mg, vitamina A y B especialmente B1 (niacina 2.5 mg) y B2 (rivo flavina 0.03mg). Además, los extractos acuosos de taxo son ricos en polifenoles, especialmente en taninos, flavonoides y ácidos fenólicos (p.8).

Según Rojano & Zapata (2012), los compuestos polifenólicos son capaces de atrapar radicales libres causantes del estrés oxidativo por su capacidad antioxidante, y con ello reducir la probabilidad de padecer enfermedades crónicas. De igual manera, estos compuestos influyen en las características organolépticas del vino (p.1).

Memenza (2009), menciona que la uva (*Vitis vinifera*), crece en climas tropicales y sub-tropicales con temperaturas que varían entre los 7° y 24°C y una humedad relativa de 70% a 80%. Su composición por cada 100g de fruta comestible está formada por azúcares, principalmente glucosa y fructosa; vitaminas como ácido fólico, vitamina A y B especialmente B1 (niacina 0.02 mg) y B2 (rivo flavina 0.3mg) y minerales (potasio, magnesio y calcio). También contiene sustancias como antocianos, flavonoides y taninos responsables del color, aroma y textura del vino (p.23).

A pesar de que estas dos frutas no presentan las mismas condiciones de crecimiento en cuanto a temperatura y humedad relativa, el taxo produce las mismas sustancias que

la uva, las cuales, confieren las características organolépticas del vino. Además Fanzly (2003), menciona que ciertos compuestos como las vitaminas del grupo B, presentes tanto en la uva como en el taxo son fuentes de alimento para las levaduras con capacidad fermentativa, ya que consumen entre el 75% y 90% de dichas vitaminas y de esta manera juegan un papel incuestionable en los procesos fermentativos (p.13).

De acuerdo a Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee (2002), el microorganismo responsables de la fermentación alcohólica en la producción del vino es *Saccharomyces cerevisiae*, el cual desarrolla metabolismo aeróbico y anaeróbico, pero solo produce etanol en condiciones de crecimiento anaerobio. Sin embargo, este microorganismo no es el único responsable de la acción fermentativa, ya que, a medida que avanza el proceso de fermentación intervienen una sucesión de cepas diferentes como *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rodotorula*, las cuales, después de 2 o 3 días reducen su número, dando paso a otras especies más tolerantes al etanol como *Candida stellata*, *Candida colliculosa* y *Kloeckera apiculata*, las cuales al estar en altas concentraciones contribuyen de forma significativa a la fermentación e influyen en la composición organoléptica del vino (p.15).

Se escoge el fruto del taxo por lo antes mencionado, del cual se aislarán levaduras que presenten características fermentativas. Para comprobar la presencia de las especies mencionadas se utilizarán pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación. Además el taxo es un fruto de interés económico para el Ecuador.

De acuerdo a Barreno (2013), algunos procesos de elaboración de alimentos se fundamentan en la fermentación, mediante la adición de microorganismos (levaduras), la cual es una técnica muy empleada en la industria vinícola y cervecera (p.10).

La producción de vino en Ecuador es baja, de acuerdo con Villacrés, Martínez, & Pozo (2006), debido a que las industrias nacionales no cuentan con iniciadores (inóculos), por lo que se ven obligadas a importar dichos starters para la elaboración del vino (p.1) Como resultado de esto, la investigación está enfocada a proporcionar información sobre las levaduras con capacidad fermentativa presentes en taxo (*Passiflora*

mollissima), que pueden ser utilizadas para la producción de inóculos y así fomentar el uso de ésta fruta endémica y la producción nacional de vino. Esto conlleva a la apertura de más industrias vinícolas y por ende a la creación de nuevas fuentes de empleo, por lo que contribuye con el plan del buen vivir.

Objetivos:

Objetivo General:

Caracterizar levaduras presentes en el fruto de Taxo (*Passiflora mollissima*), con características fermentativas y resistencia alcohólica, muestreadas en dos localidades distintas.

Objetivos específicos:

Aislar levaduras nativas presentes en el fruto maduro de Taxo (*Passiflora mollissima*) muestreados en la Parroquias de Calderón y Juan Montalvo.

Seleccionar levaduras que presenten características fermentativas y resistencia alcohólica mediante parámetros físicos-químicos.

Identificar morfológica y bioquímicamente a nivel de género, las taxa de levaduras seleccionadas con mejores características fermentativas.

Evaluar la cinética de crecimiento de la levadura de interés mediante espectrofotometría.

Hipótesis

Hipótesis Alternativa: Se pueden aislar levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica de los frutos de taxo (*Passiflora mollissima*), ubicados en la Parroquias de Calderón y Juan Montalvo de la provincia de Pichincha.

Hipótesis Nula: No se pueden aislar levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica del fruto del taxo (*Passiflora mollissima*), ubicados en la Parroquias de Calderón y Juan Montalvo.

Variables e indicadores

Variables independientes

- Fruto de taxo.
- Composición del medio de cultivo.
- Condiciones: Temperatura, pH.
- Método de siembra.
- Tiempo de incubación.
- Método de evaluación.

Variables dependientes

- Crecimiento de Levaduras fermentativas.
- Producción de iniciadores nacionales (inóculos).

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Industria vinícola

1.1.1. Biotecnología en la industria vinícola

En la industria vinícola, la innovación en fermentación ha estado tradicionalmente determinada por la tecnología incorporada en equipos, y recientemente se observa la adopción de enzimas y levaduras en el proceso de fermentación.

La biotecnología abre nuevas oportunidades en la innovación en fermentación, a partir de la identificación, selección y modificación de las levaduras y bacterias que aportan en los procesos de producción a gran escala y en el mantenimiento de la calidad de los vinos (Lavarello, Gutman, & Filipett, 2011,p.178)

En la producción industrial de vinos a gran escala, es necesario el sostenimiento de calidades homogéneas en vinos, la reducción de tiempos de fermentación y el control de desarrollos microbianos no deseados. Para lo cual las innovaciones en levaduras, bacterias y enzimas posibilitan controlar la acción de procesos de fermentación espontánea, mejorar la calidad sostenida en el tiempo y responder a las crecientes exigencias a las que encuentran sometidas este tipo de industrias (Lavarello, Gutman, & Filipett, 2011,p.179).

En las últimas décadas, coincidiendo con el avance de la Biotecnología, se han desarrollado nuevas técnicas de vinificación, que incluyen:

a) Selección de levaduras fermentativas

Según Ponce (2001), la levadura responsable de la mayor parte de la transformación del azúcar del mosto en etanol es la *Saccharomyces cerevisiae* durante la primera fermentación (alcohólica). Sin embargo existen otras especies de levaduras que están presentes, además de hongos filamentosos y bacterias en mayor cantidad que *S. cerevisiae*. Las cambiantes condiciones ambientales provocan una gran variabilidad de la calidad y cantidad de la microbiota levaduriforme presente en la uva (p.1).

La selección de un cultivo iniciador de levadura añadido al mosto, puede normalizar la microbiota inicial y de esta forma dar lugar a una fermentación

homogénea. En 1930, se empezó a utilizar cultivos líquidos de levadura vínica, y a mediados de los años 50 se extendió el uso de levaduras vínicas secas activas. Desde entonces, en varias zonas de Europa, Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica y Australia se llevan a cabo fermentaciones utilizando estas levaduras como iniciadores de la fermentación.

Las levaduras seleccionadas deben poseer características como producir fermentaciones vigorosas, reproducibles, predecibles y con baja concentración de azúcar residual; poseer una buena tolerancia al etanol, a la temperatura y al anhídrido sulfuroso; producir un buen perfil aromático exento de aromas no deseados y, sobre todo en la elaboración de vinos espumosos, que flocule y sedimente espontáneamente para que sea fácil de eliminar una vez acabada su función (Ponce, 2001).

De acuerdo a Manzanares & Orejas (2004), el uso de levaduras seleccionadas, capaces de conducir la fermentación alcohólica e imponerse al resto de levaduras presentes, abre la posibilidad de aplicar técnicas de ingeniería genética a las levaduras vínicas para obtener nuevas cepas capaces de producir enzimas de interés en enología, a lo largo de la fermentación (p.7).

b) Selección de bacterias lácticas

Durante la elaboración del vino, se realiza una segunda fermentación (maloláctica) a partir de bacterias lácticas, las cuales permiten su desacidificación mediante la transformación de ácido málico en ácido láctico. Durante la fase final de la fermentación maloláctica, las rutas metabólicas de las bacterias son más numerosas, lo que contribuye al perfil organoléptico del vino (Lavarello *et al.*, 2011, p.179).

De acuerdo a Pardo (2003), de todas las actividades metabólicas que las bacterias lácticas pueden llevar a cabo en el vino, la única deseada es la fermentación maloláctica, que es beneficiosa para disminuir la excesiva acidez de los vinos (p.1). El resto de las actividades conducen generalmente a alteraciones del vino tales como excesiva producción de ácido láctico y o acético por fermentación de los azúcares, producción de manitol a partir de la fructosa por las bacterias

lácticas heterofermentativas, formación de polisacáridos en el vino que le dan aspecto oleoso o viscoso, olor a mantequilla ocasionada por un exceso de diacetilo producido a partir del ácido cítrico o del piruvato y formación de aminos biógenas.

c) Modificación genética de levaduras vínicas

El uso de levaduras seleccionadas que se inoculan en los mostos para iniciar y conducir la fermentación alcohólica, junto con el mayor conocimiento molecular de algunas rutas bioquímicas de interés biotecnológico, ha permitido hacer ingeniería genética de las levaduras vínicas, para conseguir que las levaduras tengan una mayor capacidad fermentativa y que permitan obtener vino de mayor calidad (Ponce, 2001, p.3).

La introducción de uno o varios genes exógenos en la levadura implica la producción de una o varias nuevas características de interés industrial. Su posterior inoculación e imposición asegura la expresión de dichas características a lo largo del proceso fermentativo y, por tanto, su efecto en el producto final.

Se han obtenido diversas levaduras vínicas transgénicas, como por ejemplo en vinos que presentan problemas de baja acidez se han construido levaduras que contienen un gen, aislado de *Lactobacillus casei*, necesario para la producción de ácido láctico. Así ésta levadura transgénica es capaz de llevar a cabo la fermentación láctica y la alcohólica. Para el caso contrario, en vinos con excesiva acidez, se han obtenido levaduras que contienen dos genes provenientes de *Lactococcus lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*; las cuales son capaces de llevar a cabo la fermentación maloláctica, es decir, la conversión del ácido málico en ácido láctico, la cual se traduce en una disminución de la acidez y una mayor estabilidad microbiológica del vino (Ponce, 2001, p.4).

d) Empleo de enzimas

Las enzimas juegan un papel fundamental en el proceso de obtención de vino, es por tanto fundamental entender la naturaleza y el comportamiento de las distintas enzimas que intervienen durante la vinificación, para poder potenciar la actuación de las enzimas beneficiosas e inhibir aquellas cuya actuación pueda ir en detrimento de la calidad del vino.

La mayoría de las enzimas que provienen de la uva y de su microbiota, así como del resto de microorganismos presentes durante la vinificación, se conocen como enzimas endógenas, que por lo general son poco abundantes y poco efectivas en las condiciones de vinificación. Por lo cual en la actualidad se ha ampliado la utilización de enzimas, llamadas exógenas, adicionadas en forma de preparados enzimáticos, principalmente de origen fúngico, que tratan de suplir las carencias y reforzar la acción de las primeras (Manzanares & Orejas, 2004, p.2)

Se han utilizado enzimas como pectinasas, glucanasas, xilanasas y proteasas, para obtener un incremento del rendimiento en mosto y a la vez mejorar la clarificación y procesado del vino, ya que éstas sirven tanto para degradar los polisacáridos estructurales de las paredes celulares de las uvas que dificultan el procesado del mosto y del vino, y mejorar la extracción de compuestos fenólicos y de precursores aromáticos; y las glicosidasas para incrementar la fracción aromática (Manzanares & Orejas, 2004, p.3).

1.1.2. Elaboración del vino

En la elaboración del vino se realizan los siguientes procedimientos que se detallan en la Figura 1. Aunque estos, pueden ser modificados o adaptados por cada enólogo, según la materia prima, el tipo de vino o los usos culturales de la zona.

1.1.3. Países productores de vino

El sector vinícola se caracteriza por la existencia de un grupo de países dominantes que concentran gran parte de la industria mundial del vino, entre los cuales se encuentran España, Chile, Francia e Italia; estos países lideran la superficie cultivada de viñedos, la producción de uva, así como la elaboración de vinos. Pero desde hace unas décadas, países como Estados Unidos, China, Australia y Argentina poco a poco se han ido consolidando en el sector vinícola (Fernández, 2013, p.173).

Elaboración del vino tinto

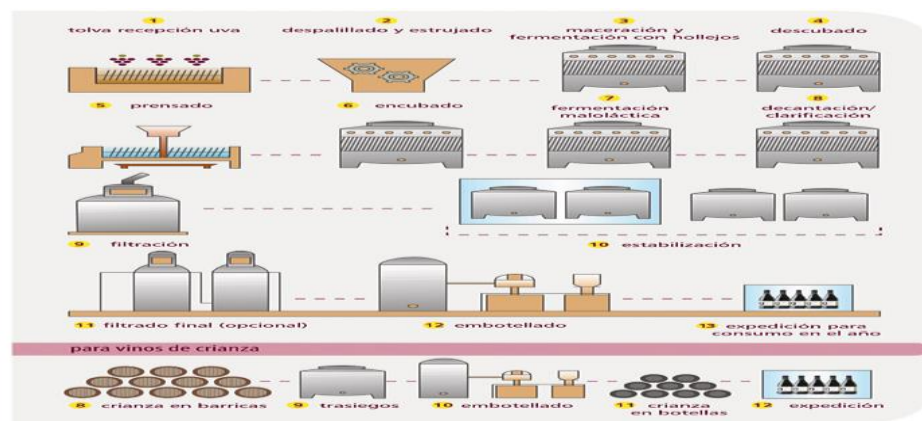


Figura 1. Proceso de elaboración del vino tinto

Fuente: (García, 2013, p.1)

Según Moreno (2007), en Ecuador la producción de vino es mínima, esto se debe a que las industrias nacionales no cuentan con starters propios, por lo que se ven obligadas a importar dichos starters para la elaboración del vino. Sin embargo en el 2004 dos viñedos ecuatorianos empezaron a producir sus propios vinos, el Estancia Chaupi Wine y el Vino Dávalos, cambiando por completo el paradigma de la producción de vinos en el Ecuador; y esto se debió a una amplia investigación de todos los factores que influyen en la calidad del vino como son la composición de la frutas que se utilicen como materia prima y los procesos de fermentación, los cuales están regulados por levaduras (p.4).

Según Franco (2013), la calidad analítica del vino se la puede definir con parámetros como el grado alcohólico, las fracciones ácida, aromática y polifenólica y que dependen básicamente del medio físico en el que está implantado el viñedo, de la maduración de las uvas, de la rotura de las bayas y la maceración en el caso particular de los vinos tintos (p.1). La calidad sensorial se define por el aroma, la estructura, el color y el equilibrio del vino, que están relacionados con el medio físico, con la edad, maduración y temperatura del viñedo; así como de los procesos enológicos comentados anteriormente.

1.1.4. Clasificación de los vinos

De acuerdo a Idígoras (2011), existen diferentes clasificaciones de vinos tomando en cuenta criterios como la forma de elaboración, la edad y la cantidad de azúcar (p.6-7).

1.1.4.1. Según la forma de elaboración

- a) **Vinos tranquilos:** generalmente son vinos secos, su contenido alcohólico fluctúa entre 9^o y 14.5^oGL. Dentro de estos vinos se encuentran el vino blanco obtenido a partir de uvas blancas; el vino tinto a partir de uvas tintas a las que no se les ha separado los hollejos y los vinos rosados a partir de uvas tintas a las que se les ha separado parcialmente los hollejos (Idígoras, 2011, p.5).
- b) **Vinos especiales:** suelen ser dulces o semidulces, frecuentemente con un elevado contenido alcohólico que en muchos casos es adicionado. Dentro de ésta clasificación se encuentran los vinos generosos, dulces naturales, espumosos naturales, gasificados y derivados vínicos como vinos aromatizados, vermouths y aperitivos vínicos (Idígoras, 2011, p.6).

1.1.4.2. Según la edad

- a) **Vinos Jóvenes:** se caracterizan por no tener ningún tipo de crianza en madera o esta crianza es mínima. Son vinos que conservan las características varietales de las uvas de las que proceden (Idígoras, 2011, p.6).
- b) **Vinos de Crianza:** son vinos que han pasado un mínimo de crianza entre madera y botella. Además de poseer las características varietales, desarrollan otras características organolépticas debidas a este periodo de envejecimiento (Idígoras, 2011, p.6).

1.1.4.3. Según el grado de dulce

De acuerdo a Idígoras (2011), los vinos se clasifican según la cantidad de azúcar no fermentada que contengan (p.7).

- a) **Vinos secos:** menos de 5 g/L
- b) **Vinos semisecos:** 5-15 g/L.
- c) **Vinos abocados:** 15-30 g/L.
- d) **Vinos semidulces:** 30-50 g/L.

- e) **Vinos dulces:** más de 50 g/L

1.2. Familia Passifloracea

De acuerdo con Deginani (1999), la *Passifloraceae*, es una familia conformada de 18 géneros y 630 especies aproximadamente, distribuidas en zonas tropicales y subtropicales. Uno de los géneros más importantes de ésta familia es la *Passiflora* que comprende cerca de 500 especies, entre las cuales se encuentra la *Passiflora mollissima* (p.1).

1.2.1. Taxo (*Passiflora mollissima*)

1.2.1.1. Origen

Según Ponce (2009), “el taxo conocido también como curuba o tumbo, es una fruta originaria del norte de Suramérica, que se distribuye sobre las zonas frías de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia” (p.9).

Los datos sobre su origen no son muy precisos, pero se presume que es originario de Colombia de acuerdo a algunos vestigios encontrados en los Andes Colombianos, y desde este lugar se propagó la planta de taxo hacia las demás regiones andinas a causa de los antiguos indígenas.

1.2.1.2. Clasificación taxonómica

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del taxo

Orden:	<i>Parietales</i>
Familia:	<i>Passifloraceae</i>
Género:	<i>Passiflora</i>
Subgénero:	<i>Tacsonia</i>
Especie:	<i>Mollissima</i>

Nota: Clasificación taxonómica del taxo (*Passiflora mollissima*)

Fuente: (Reina, 1995)

1.2.1.3. Descripción botánica

El taxo es una planta leñosa y trepadora de varios metros de altura, provista de zarcillos. El tallo es cilíndrico y pubescente, de color amarillo verdoso hasta café oscuro. Su raíz es muy superficial poco profunda y fibrosa. Las hojas son estipuladas, tri, tetra o penta lobuladas; elípticas u oblongo elípticas, sus bordes, son aserrados, dentados u ondulados entre 7 y 10 cm de largo y 3 a 6 cm de ancho. Su tallo es cilíndrico y pubescente, de color amarillo verdoso hasta café oscuro cuando está maduro (Landa, 2006, p.20).

Las flores, son de color rosado fuerte, muy vistosas y con aroma. Están compuestas por cinco pétalos, cinco sépalos, cinco estambres, tres estigmas de color rojizo en la base y más claro hacia arriba, el ovario es súpero, las anteras son dorsifijas, oblongas y de color amarillo (Landa, 2006, p.21)

El fruto, es una baya de forma elíptica de 7 a 10 cm de largo, de color verde claro cuando se está desarrollando, y completamente amarillo al madurar. La pulpa es firme, carnosa, jugosa y con pequeñas semillas punteadas de color negro (Landa, 2006, p.22).

Fruto de taxo o curuba



**Figura 2. Fruto de taxo o curuba (*Passiflora mollissima*)
Fuente: Infojardin, 2015**

1.2.1.4. Composición química

La composición química del taxo, por cada 100g de fruta comestible se observa en la Tabla 2. De acuerdo a Flanzky (2003), el fruto de taxo al contener glucosa y fructuosa, una gran cantidad de minerales (calcio y fósforo) y vitaminas (Tiamina B1 y Niacina B3), son una fuente importante para la obtención de levaduras, puesto estas utilizan estos requerimientos nutricionales para su crecimiento (p.76).

Según Rojano & Zapata (2012), el taxo contiene compuestos polifenólicos como taninos, flavonoides y ácidos fenólicos que influyen en la calidad organoléptica del vino, por lo cual sería muy importante utilizarlo en la producción de vinos de calidad (p.1).

Tabla 2.

Composición química del taxo

Componentes	Cantidad
Agua	92%
Calorías	25g
Carbohidratos	6.30g
Fibra	0.30g
Grasa total	0.10g
Proteína	0.60g
Calcio	4mg
Fósforo	20mg
Hierro	0.40mg
Vitamina A	1700 UI
Vitamina B3 (Niacina)	2.5mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	0.03mg
Vitamina C (Ácido ascórbico)	70mg

Nota: Composición química y nutricional del taxo (*Passiflora mollissima*)

Fuente: (Barreno, 2013)

1.2.1.5. Propiedades y usos

Gómez (2012), menciona que, el taxo o curuba es utilizado para curar problemas de estrés, angustia o nervios ya que la piel del taxo contiene ciertas sustancias con propiedades sedantes. También es rica en pectina, sustancia que ayuda a aliviar ciertos trastornos del intestino. Es muy buena contra las

úlceras de boca, úlceras estomacales y problemas de estómago en general. En general se utiliza como antiespasmódico, hipotensor, diurético y febrífugo (p.1).

Entre los usos de la curuba se encuentran los helados, postres, mermeladas, jaleas, vinos, rellenos para pastel y además puedes consumir los frutos de la curuba frescos o en jugo.

1.2.1.6. Zonas de cultivo

De acuerdo a Landa (2012), el taxo se cultiva en Ecuador, Perú, Bolivia, Colombia y Venezuela. En Ecuador es muy frecuente encontrar plantas de taxo entre los matorrales del bosque frío y templado, aunque existen áreas cultivadas en las provincias de Azuay, Chimborazo, Imbabura, Pichincha y Tungurahua, ocupando un total de 55 hectáreas, 25 de las cuales son cultivadas en la provincia de Tungurahua principalmente en el valle de Patate, Píllaro y Pelileo (p.87).

En Tungurahua el rendimiento de este cultivo es de 76590 frutos por hectárea al año, alrededor de 320 a 400 frutos/planta/año con una densidad de 667 plantas por hectárea (INIAP, 1996, p.56).

1.2.1.7. Requerimientos del cultivo

a) Clima

Landa (2012), manifiesta que, el requerimiento del cultivo del Taxo es típico del clima frío, prevalece entre los 1800 y 3000 m.s.n.m. con temperaturas que van desde los 12 a 20°C (p.23).

b) Suelo

El INIAP (1996), manifiestan que, el taxo es una planta que no es muy exigente en cuanto a la calidad del suelo, tolerando así diversos tipos, pero se desarrolla mejor en suelos francos y francos- arenosos profundos, fértiles y bien drenados; con un pH óptimo de 5.5 a 7.0 (p.24).

c) **Ciclo del cultivo**

El taxo es un cultivo de una longevidad que sobrepasa los diez años, por lo tanto al ser un cultivo de larga duración es de vital importancia mantener las plantas en buen estado para garantizar altos rendimientos durante los años de cultivo. Generalmente la primera cosecha del taxo se realiza en los meses de Diciembre, Enero y Febrero; y luego en los meses de Julio, Agosto y Septiembre, pero hay que resaltar que la planta de Taxo produce frutos continuamente durante todo el año y la cosecha se la realiza cuando el fruto está adquiriendo una coloración verde amarillenta es decir, cuando está empezando a madurar (Landa, 2012, p.25).

1.3. Levaduras

1.3.1. Generalidades de las levaduras

Según Cáceres & Reyna (2002), las levaduras son microorganismos unicelulares, eucariotas, pertenecientes al reino fungi, los cuales dependen de fuentes de carbono para producir sus elementos estructurales, (heterótrofos) y por lo tanto no son capaces de realizar la fotosíntesis ni la quimiosíntesis. La mayoría viven sobre la materia orgánica muerta (saprófitos) y otros son parásitos de vegetales y animales (p.13).

1.3.1.1. Clasificación

De acuerdo con Uribe, (2007), las levaduras pertenecen a dos grupos de hongos, los ascomicetos y basidiomicetos. Las levaduras ascomicetas forman ascas libres, con 1 a 8 ascosporas, y en las especies hifales las ascas están desnudas. En cambio las levaduras basidiomicetas se caracterizan porque especies como *Filobasidium*, presentan hifas con fíbulas, otras especies como *Sporobolomyces* produce esporas exógenas en la punta de una protuberancia de la célula, y otras forma un pigmento carotenoide rojo como la *Rhodotorula* (p.34).

1.3.1.2. Morfología

Las levaduras son hongos que forman colonias pastosas sobre los medios de cultivo, estas colonias suelen ser esféricas, ovoides, elipsoides o alargadas. Sus dimensiones oscilan de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud

estas varían según especie, nutrición, edad y otros factores. Presentan unidades estructurales llamadas hifas, sus dimensiones oscilan de 3 a 12 μm (Buitrago & Escobar, 2009, p. 32).

De acuerdo con Uribe (2007), el conjunto de estas hifas forman un micelio, el cual consta de dos partes, la vegetativa que se encarga de la nutrición y la reproductiva que contiene esporas. Las levaduras también presentan pseudo hifas, estas se diferencian de las hifas verdaderas, debido a que son una prolongación de la blastoconidia (p. 35).

1.3.1.3. Fisiología

a) Componentes principales de una célula de levadura

Entre los componentes principales de una célula de levadura están; la pared celular, la membrana y el núcleo.

La pared de las levaduras está compuesta en su mayoría por glucanos, se caracteriza por ser una barrera permeable, la cual regula la entrada y salida de agua y solutos a la célula. Por otro lado, la membrana celular está compuesta por lípidos y una pequeña cantidad de carbohidratos, su función principal es separa al citoplasma del exterior de la célula (Salcedo, 2008, p. 22).

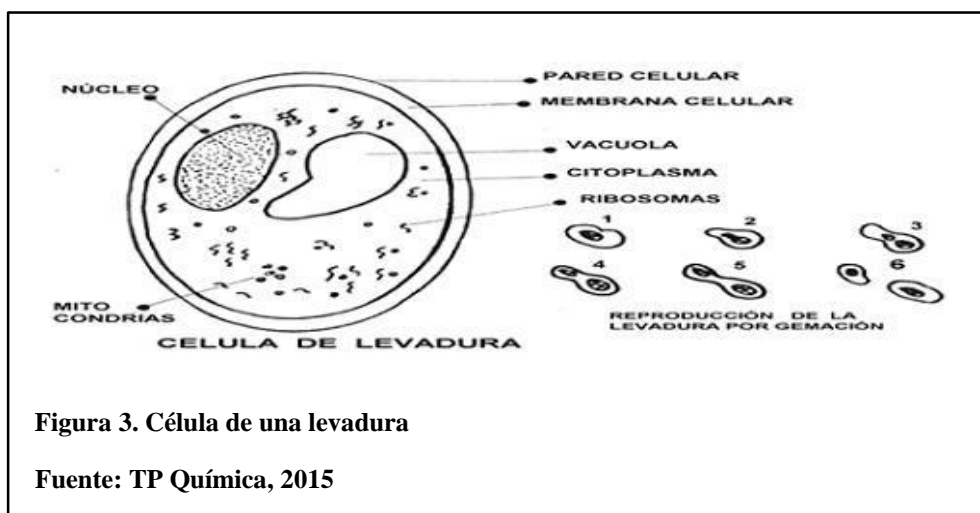


Figura 3. Célula de una levadura

Fuente: TP Química, 2015

b) Composición química de una célula de levadura

Una célula de levadura contiene un 75% de agua y un 25% de macromoléculas, éstas se detallan en la tabla 3.

Tabla 3.

Composición química de una célula de levadura

Compuesto	Cantidad en (%)
Carbohidratos	18-44
Proteínas	36-60
Ácido Nucleico	4-8
Lípidos	4-7
Inorgánicos Totales	6-10
Fósforo	1-3
Potasio	1-3
Sulfato	0.4
Vitaminas	Trazas

Nota: (Salcedo, 2008, p. 23).

1.3.1.4. Reproducción

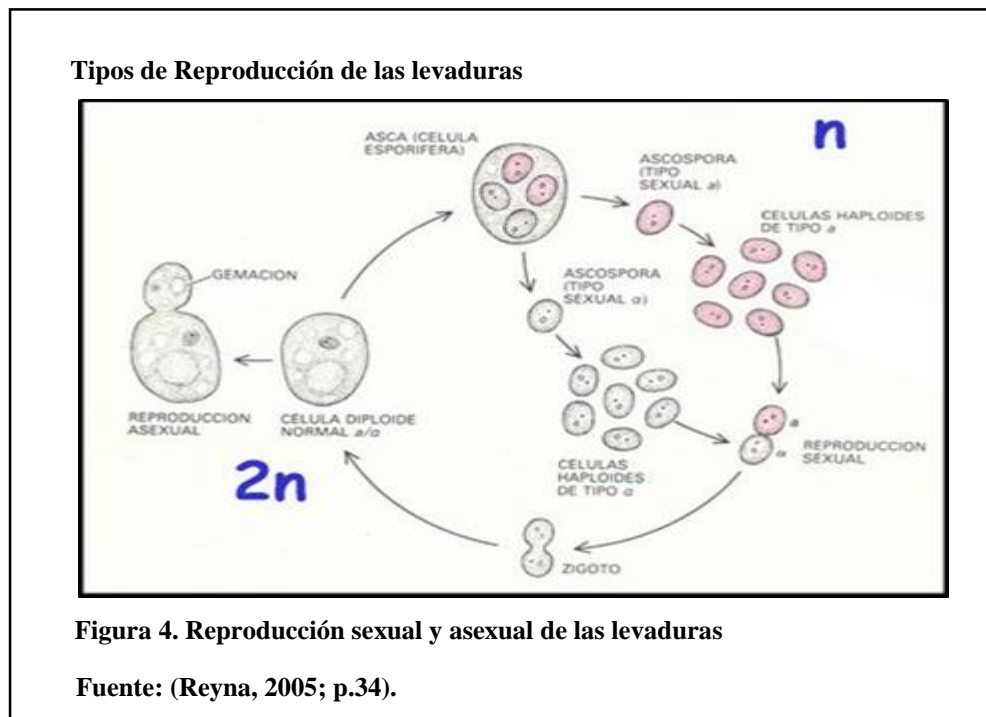
De acuerdo con Cáceres & Reyna (2002), “las levaduras son células eucariotas pertenecientes al reino fungi, los mismos que presentan dos tipos de reproducción; la asexual por gemación y fisión binaria, y la sexual por esporulación” (p. 34). Como se detalla en la figura 3.

a) Asexual

De acuerdo con Salcedo (2008), las levaduras se reproducen por gemación, y fisión binaria. La gemación comienza cuando una célula madre desarrolla una pequeña ampolla, aumentando de volumen hasta convertirse en una célula hija. Una célula puede producir hasta 25 células hijas. En cambio la fisión binaria, es un proceso semejante al de las bacterias, donde la célula aumenta de tamaño, el núcleo se alarga y se divide hasta tener dos células hijas semejantes (p.25).

b) Sexual

De acuerdo con Cáceres & Reyna (2002), la reproducción sexual se realiza mediante la esporulación, el cual se da mediante un ciclo. Este ciclo comienza cuando una célula diploide normal (una célula con dos conjuntos de cromosomas) da lugar a dos ascas o células esporogéneas, que contienen cuatro ascosporas haploides (células con una sola dotación cromosómica y de genes). Las ascosporas son de dos tipos sexuales: a y alpha. Cada tipo puede desarrollar células haploides por gemación. La unión de una célula haploide “a” con otra “alpha” da lugar a una célula normal diploide a/alpha. Las células haploides del mismo sexo pueden también unirse ocasionalmente, formando células diploides anormales (a/a o alpha/alpha) que sólo pueden reproducirse asexualmente por gemación (p. 34). Como se observa en la figura 4.



1.3.2. Requerimientos esenciales

Las levaduras necesitan de requerimientos específicos, de acuerdo con Uribe (2007), estos afectan de manera directa a los procesos de fermentación (p.33-34), y son los siguientes.

a) Temperatura

Para el crecimiento óptimo de las levaduras es necesaria una temperatura de 28°C, debido a que estos microorganismos son termofílicos y su destrucción

empieza sobre los 28°C. Sin embargo esto varía según su especie y hábitat, ya que existen levaduras que pueden crecer a temperaturas máximas de 40°C a 55°C durante el día y temperaturas mínimas de 5°C a 10°C en la noche. Estas levaduras por lo general se encuentran en las superficies de hojas expuestas a dichas temperaturas (Uribe, 2007, p.33).

b) Oxígeno

Las levaduras son microorganismos aerobios, su requerimiento de oxígeno es esencial para la producción de biomasa y CO₂ a partir de carbohidratos presentes en su medio de crecimiento. Para la supervivencia, estos microorganismos requieren 0.0015mg de oxígeno por gramo de biomasa. Cuando el oxígeno disminuye el proceso metabólico de las levaduras cambia produciendo en menor cantidad biomasa, para producir más etanol. Es por ello que la cantidad de oxígeno así como los nutrientes en el medio es esencial para realizar los procesos de hidrólisis en la fermentación (Uribe, 2007, p.33).

c) pH

Puede variar entre 4.5 a 6.5 (óptimo), aunque existen especies que resisten pH más ácidos de 2.0 y 3.0 más alcalinos hasta 8.0. El autor menciona que los ácidos orgánicos influyen en la sensibilidad de la levadura, y su capacidad para metabolizarlos depende mucho del pH, ya que deben ser metabolizados hasta llegar a su eliminación (Uribe, 2007, p.34).

1.3.3. Requerimientos Nutricionales

De acuerdo con Uribe (2007), las levaduras necesitan fuentes de carbono orgánico (18-44%), nitrógeno (4-8%), potasio (1-3%), fósforo (1-3%), zinc (0.4%) y vitaminas en trazas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, riboflavina), todos ellos esenciales para su crecimiento (p.35-36).

a) Carbono

Siendo el elemento mayoritario de la célula de levadura su requerimiento es esencial, sus fuentes son la glucosa, fructosa y manosa, la utilización de dichas fuentes puede variar según la especie y el medio en el que se desarrolle este microorganismo (Uribe, 2007, p.35).

b) Nitrógeno

Las levaduras en su mayoría son capaces de asimilar el nitrógeno en forma de ión amonio, estos pueden ser adicionados al medio por el cloruro amónico, el nitrato amónico, fosfato amónico y el sulfato amónico, todos estos esenciales para la síntesis de aminoácidos y enzimas (Uribe, 2007, p.35).

c) Fósforo

El fósforo es otro elemento necesario, sin embargo este es consumido por las levaduras en forma de fosfato, el cual juega un papel importante en la producción de etanol a partir de azúcares (Uribe, 2007, p.36).

d) Potasio

Uno de los elementos más importante, debido a que actúa como catión regulador ya que estimula la respiración y la fermentación (Uribe, 2007, p.36).

e) Magnesio

Necesario para la activación de enzimas presentes en lo proceso de fermentación y regulador de las ATPasas (Uribe, 2007, p.36).

f) Calcio

Para el crecimiento de las levaduras no es esencial, sin embargo, este actúa en forma protectora, ya que se incorpora en las paredes celulares de la célula en la fase de crecimiento, favoreciendo el mantenimiento e integridad de la célula (Uribe, 2007, p.36).

1.3.4. Identificación

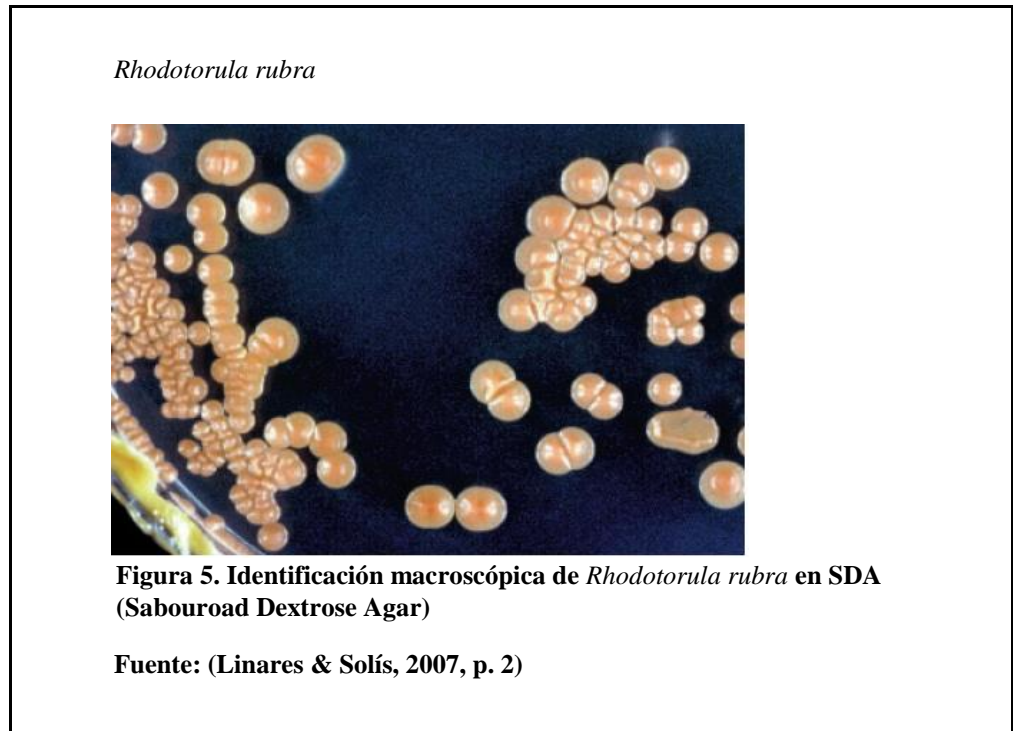
Según Linares & Solís (2007), la identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos (p. 3-11).

1.3.4.1. Criterios Morfológicos

Estos criterios de identificación se basan en la morfología de la colonia a identificar, pueden ser macroscópicos y microscópicos.

a) Criterios macroscópicos

Los criterios macroscópicos se basan en el color, olor, consistencia, elevación, forma y formación de micelio, de las levaduras al crecer en un medio de cultivo (Linares & Solís 2007, p.1).



Existen diversos medios de cultivo para levaduras, tales como agar sangre, agar chocolate, agar Cled (Cysteine lactose electrolyte deficient), agar YPD (Yeast peptone dextrose) etc. Sin embargo, el agar SDA (glucosado de Sabouraud), con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de las colonias de levaduras, un ejemplo de ello es el crecimiento del género *Saccharomyces*, el cual tras las 36 horas de incubación, presenta colonias de color blanco grisáceo, de textura pastosa y con bordes enteros.

b) Criterios microscópicos

Existen varias metodologías para la identificación microscópica de levaduras, sin embargo las más utilizadas se detallan a continuación (Linares & Solís 2007, p.1-3).

- **Prueba del tubo germinal o precoz**

El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre, como se observa en la figura 5.

Solo la especie *Candida albicans*, es capaz de presentar esta característica, no obstante otras especies como *C. tropicalis*, presentan pseudos hifas que pueden ser confundidas con los tubos germinales, pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo tanto esta prueba es específica para diferenciar entre las especies de *Candida* (Linares & Solís 2007, p.1).

- **Formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas.**

Según Linares & Solís (2007), estas características morfológicas son de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras. Cuando se presentan estructuras con aspecto de hifas, hay que determinar si esta es verdadera (se fragmentan en artroconidias) o falsa (formadas a partir de blastoconidia) (p.2).

Existen medios de cultivo especiales que revelan la presencia de pseudohifas (blastoconidias), característico del género *Candida* y verdaderas hifas (artroconidias), presentes en especies como; *Geotrichum*, *Galactomyces*, *Trichosporon* y *Blastoschizomyces*. Estas dos últimas producen tanto artroconidias como blastoconidias, (nace de las artroconidias, formando un estructura denominada “oreja de conejo”), como se observa en la figura 6 (Linares & Solís 2007, p.3).

Candida albicans

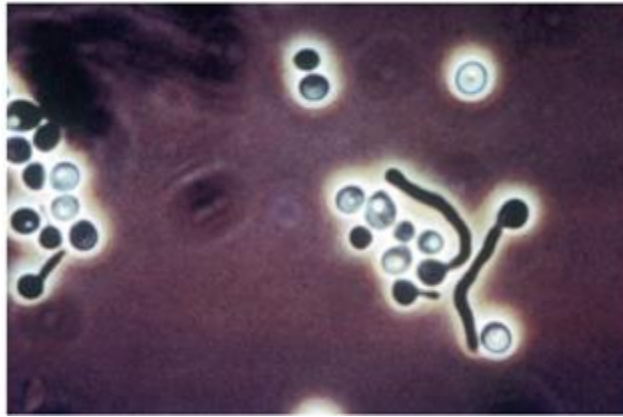


Figura 6. Producción de tubo germinal por *Candida albicans*

Fuente: (Linares & Solís, 2007, p. 4).

Trichosporon beigeli

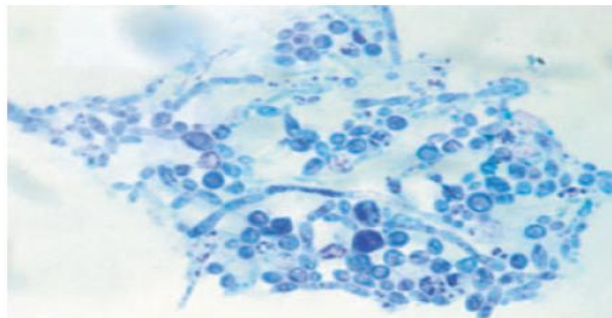


Figura 7. Aspecto microscópico de *Trichosporon beigeli* (x1.000)

Fuente: (Linares & Solís, 2007, p. 5)

Las especies *Galactomyces geotrichum* y *Blastoschizomyces capitatus* también producen blastoconidias a partir del ángulo de la artroconidia, pero, en este caso, forman una estructura denominada “palo de hockey” como se observa en la figura 7 (Linares & Solís, 2007, p. 4).

Geotrichum candidum

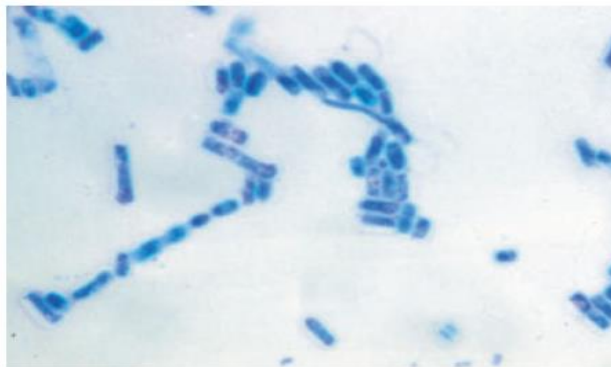


Figura 8. Aspecto microscópico de *Geotrichum candidum* (x1.000)

Fuente: (Linares & Solís, 2007, p. 5)

Por otra parte la formación de clamidiosporas es característica de *C. albicans*, donde se evidencia estructuras redondas u ovales, de 6 – 12 μm de diámetro y pared gruesa con aspecto de esporas laterales o terminales como se observa en la figura 8 (Linares & Solís, 2007, p. 5).

Candida albicans



Figura 9. Aspecto microscópico de la formación de pseudomicelio y clamidiosporas por *Candida albicans* (x400).

Fuente: (Linares & Solís, 2007, p. 5)

- **Medio de cultivos (Linares & Solís, 2007, p. 5-6).**

Agar harina de maíz: Medio comercial, al cual se debe agregar tween 80 (polisorbato) a una concentración final de 0.02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias.

TOC: Medio selectivo para la determinación del tubo germinal y clamidosporase agar. Se evidencia estas estructuras a las 2h de incubación, a 35°C y en atmósfera de O₂, si no se observa crecimiento se puede volver a incubar durante 24-48 h para visualizar el desarrollo de clamidosporas.

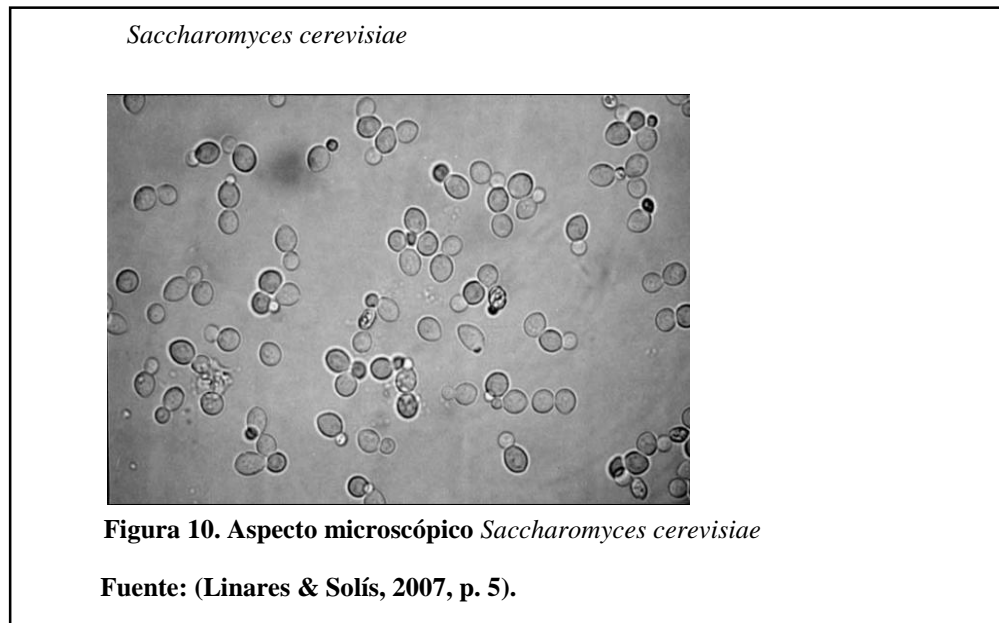
Leche diluida: Los investigadores Pacheco y Feo en 1976, estudiaron por separado los componentes del medio lactrimel (leche + harina de trigo + miel) en la formación de clamidosporas y comprobaron que la leche entera (pasteurizada y homogeneizada) favorecía la producción de estas, lo que llevo a la producción de un nuevo medio de detección: el medio de leche diluida (leche natural 170 ml, agua destilada 1.000 ml, cloranfenicol 0.25 g).

Lisina: Walters y Thiselton en 1953, examinaron 180 especies de levaduras en un medio que contiene lisina sintética líquida como la única fuente de nitrógeno. Encontraron que no hay cepas *cerevisiae* o *carlsbergensis* normales utilizando medio lisina, mientras que muchas otras levaduras, incluyendo levaduras silvestres crecieron en este medio.

YPD Broth y Agar (Yeast Extract-Peptone-Dextrose): Los métodos generales de la genética de la levadura especifican que un buen medio de crecimiento para cultivar *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras es el YPD broth y agar. Las levaduras crecen bien en un medio mínimo que contiene sólo dextrosa y sales, pero la adición de proteínas y extracto de células de levadura hidrolizados, permite un crecimiento más rápido de manera que durante el crecimiento exponencial o fase logarítmica las células se dividen cada 90 minutos. YPD broth y agar contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. Suministros de extracto de levadura y vitaminas como complejo B estimulan el crecimiento de levaduras.

Tinciones: El estudio e identificación de los microorganismos levaduriformes, se lo puede realizar mediante tinciones, ya que las levaduras suelen comportarse como Gram positiva. Estas tinciones permiten identificar

blastosporas, hifas y ascosporas. Uno de los métodos más utilizados es usar lactofenol, ya que actúa como líquido de soporte, agente fijador y tiñe el micelio las esporas de color azul; para una mejor observación.



1.3.4.2. Criterios Bioquímicos enzimáticos (Linares & Solís, 2007, p. 7-8).

Los criterios bioquímico enzimáticos ayudan a la identificación de las levaduras a nivel de género y en ocasiones de especies, entre los cuales se tiene.

- a) **Medios cromogénicos:** Medios diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24 a 48 h. Se basa en la detección de actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de sus ventajas es diferenciar fácilmente los cultivos mixtos.
- **CHROMagar Candida:** Permite diferenciar entre especies, *C. albicans* (color verde), *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (centro rosado y borde blanco), y *C. glabrata* (violeta, morado) en función de los colores que desarrollan en este medio.

- **COLOREX Candida:** En este medio, *C. albicans* desarrolla colonias verdes, *C. tropicalis* azules-grisáceas y *C. krusei* colonias rosas rizadas.
- **Cromogen Albicans:** Específico para *C. albicans*, se muestran colonias de color azul verdoso.

b) Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans*:

Existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas (β -galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans*.

1.3.4.2.1. Identificación basada en la asimilación de nutrientes (Linares & Solís, 2007 p. 7-8).

Se basa en la aplicación de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Se puede realizar en medio sólidos o líquidos, estos últimos más fáciles de preparar.

Medios de cultivo base: Medios sin nitrógeno y medios sin carbono.

- **Auxacolor:** Es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH. La galería incorpora, además, una prueba de resistencia a la actidiona y otra para la detección de la actividad fenol-oxidasa de *Cryptococcus neoformans*.
- **API 20C AUX:** La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes.

1.3.4.3. Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas (Linares & Solís, 2007, p. 9-10).

- **El RapID Yeast Plus System (Remel):** Es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies de levaduras.
- **Fongiscreen 4H (Bio-Rad):** Es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras, permitiendo identificar en 4h *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*. La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo revelador.

1.3.4.4. Criterios genéticos

a) Criterios Genéticos

En la actualidad se ha desarrollado métodos genéticos muy avanzados para la identificación de especies de levaduras, siendo estos más específicos para conocer el género y la especie del microorganismo a identificar.

De acuerdo con Oberán (2004), existen algunos métodos moleculares para la identificación de levaduras basados en el estudio de las moléculas de ADN Y RNA (p, 35).

- Análisis de microsátélites.
- Polimorfismo del ADN mitocondrial.
- Polimorfismo de longitud de los cromosomas.
- Uso de los RNA bajo el peso molecular.

1.3.5. Cinética de Crecimiento

De acuerdo con Ramírez y Molina (2005), El crecimiento microbiano fue estudiado y modelado por Monod para un sistema discontinuo. La ecuación de

Monod, relaciona la velocidad máxima de crecimiento con la concentración del sustrato limitante, la que se expresa en la ecuación 1(p.7):

Ecuación de la cinética de crecimiento

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$$

Ecuación 1: Ecuación de Monod

Fuente: Ramírez y Molina (2005).

Dónde:

- μ : velocidad específica de crecimiento, (h-1)
- μ_{max} : velocidad específica máxima de crecimiento, (h-1)
- S: concentración de sustrato limitante, (g/L)
- Ks: constante de saturación, (g/L).

El valor μ_{max} se obtiene a partir de la pendiente máxima de la curva de crecimiento del microorganismo y la constante de saturación Ks (g/L), es aproximadamente igual a la concentración de azúcares totales en el medio de cultivo para la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo.

1.3.6. Curva de crecimiento

De acuerdo con Prescott (2009), el crecimiento poblacional es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando se cultiva microorganismo en un medio líquido suele hacerse en un cultivo discontinuo o sistema cerrado. Por lo tanto, las concentraciones de nutrientes disminuyen progresivamente mientras que las concentraciones de residuos aumentan (p.123-125). Las curvas de crecimiento constan de cuatro fases:

a) Fase de latencia

Es aquella que al introducir un microorganismo en un medio de cultivo fresco, generalmente no se produce un aumento inmediato del número de células. Aunque no hay división celular inmediatamente ni existen un incremento de masa, la célula está sintetizando nuevos componentes (Prescott, 2009, p.123),

Esta fase previa al comienzo de la división celular puede ser debida a varias causas:

- Células envejecidas que carecen de una provisión suficiente de ATP, cofactores esenciales y ribosoma.
- El medio de cultivo es diferente de aquel en el que el microorganismo estaba creciendo, por ésta razón necesita de nuevas enzimas para asimilar sus nutrientes.
- Microorganismos dañados que requieren de cierto tiempo para recuperarse.

La duración de la fase de latencia varía dependiendo del estado de los microorganismos y de la naturaleza del medio.

b) Fase exponencial

Durante esta fase los microorganismos crecen y se dividen a velocidad máxima posible, dependiendo del potencial genético, la naturaleza del medio y las condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento es constante, es decir, los microorganismo se dividen y su número se duplica a intervalos regulares, siendo uniforme en cuanto a sus propiedades químicas y fisiológicas.

El crecimiento exponencial es equilibrado, es decir todos los componentes celulares están siendo fabricados a tasas constantes, si los niveles de nutrientes u otras condiciones ambientales cambian se produce un crecimiento desequilibrado.

La forma de la curva parece reflejar la velocidad de captación de nutrientes por las proteínas transportadoras microbianas, a unos niveles suficientemente altos de nutrientes, los sistemas de transporte están saturados, y la velocidad de crecimiento no aumenta aunque se sigue incrementando la concentración de nutrientes (Prescott, 2009, p.123).

c) Fase estacionaria

De acuerdo con (Prescott, 2009).En un sistema cerrado llega un momento en el que el crecimiento de la población se detiene y la curva de crecimiento se hace horizontal (p.124). Los cultivos bacterianos puede alcanzar esta fase cuando la población asciende a unos 10^9 células por ml, sin embargo otros

microorganismos suelen tener concentraciones máximas de unas 10^6 células por ml. Los factores que inducen a la fase estacionaria pueden ser:

- La limitación de nutrientes, puesto que si la concentración de un nutriente esencial disminuye, el crecimiento de la población disminuirá.
- En organismos aerobios un limitante puede ser la disponibilidad de oxígeno; debido a que sus niveles se reducen rápidamente que solo las células que se encuentran en la superficie tendrán una concentración de oxígeno adecuada para el crecimiento.
- Acumulación de productos residuales tóxicos, este factor limita el crecimiento de muchos microorganismos anaerobios, durante la fermentación de azúcares los estreptococos pueden producir grandes cantidades de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, con lo que la acidificación del medio da lugar a una inhibición del crecimiento.
- El crecimiento puede detenerse cuando se alcanza una densidad poblacional crítica.

d) Senescencia y muerte

Existen dos hipótesis con respecto a ésta fase, la primera menciona que la disminución exponencial de densidad en la fase de muerte, no significa que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad de reproducirse, sino que los microorganismos son temporalmente incapaces de crecer al menos en las condiciones de laboratorio empleadas.

La segunda alternativa menciona que las células están genéticamente programadas para sobrevivir a la muerte celular, una pequeña fracción de la población microbiana está genéticamente programada para suicidarse. Según ésta hipótesis las células no cultivables están muertas y no simplemente inactivas y los nutrientes que estas células dejan escapar hacen posible el crecimiento de aquellas células de la población que no han iniciado el suicidio (Prescott, 2009, p.125).

1.4. Levaduras involucradas en la vinificación

Según Regodón (2007), actualmente se reconoce la existencia de unas 500 especies de levaduras, de las cuales solamente de 15 a 20 especies de 8 géneros, tienen interés en la enología, estos géneros son: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*,

Brettanomyces, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Saccharomyces*, siendo este último el más importante. A continuación se detalla cada género y su importancia en la enología (p. 15-19).

- a) *Candida*: Por lo general las especies de este género tienen capacidad fermentativa baja, además crecen en la superficie del vino produciendo ácido acético, acetato de etilo entre otros productos que afectan la calidad del vino. Dichas especies son: *C. vini*, *C. pulcherrimia* y *C. stellata*.
- b) *Pichia*. Algunas de las especies de este género crecen sobre el vino confiriéndole el sabor amargo. Sin embargo al tener una resistencia baja al etanol 10% (v/v), suelen desaparecer. Entre las especies más representativas se encuentra: *P. vini*, *P membranaefaciens* y *P. Farinosa*.
- c) *Hansenula*. La especie representativa en la enología es *H. anómala*, la misma que confiere el olor característico del vino, dicha especie se encuentra de forma natural en la uva. No obstante su baja resistencia a etanol la hace estar presente solo en la primera fase de fermentación.
- d) *Brettanomyces*. Son levaduras parecidas microscópicamente a *Saccharomyces cerevisiae*, su diferencia varía en el tamaño. La especie más representativa de este género es *B. intermedius* por lo general la capacidad fermentativa de esta especie es lenta llegando a producir hasta un 11-12% (v/v) de etanol. Produce turbidez y gran cantidad de acidez volátil en los vinos.
- e) *Kloeckera*. Son muy abundantes en la primera etapa de fermentación de los mostos, sensibles al SO₂ entre sus especie más representativa es *K. apiculata*. La misma que puede producir toxinas que retardan el crecimiento de la *S. cerevisiae*.

1.4.1. *Saccharomyces*

La levadura más importante y por excelencia fermentativa es la *Saccharomyces cerevisiae*, la cual de acuerdo con Regodón (2002), es la responsables de la

fermentación de los mostos, con una resistencia alcohólica de 18% (v/v), esta crece mediante un metabolismo oxidativo sobre la superficie del vino, dando lugar a la producción de compuestos tales como el acetaldehído, importante en la elaboración de vinos finos de Jerez.

a) Clasificación (Cáceres & Reyna, 2002, p. 43)

La levadura *S. cerevisiae*, tiene la siguiente clasificación.

Reino: Fungi

División: Eucomycota

Clase: Hemiascomycetes

Familia Saccharomycetaceae

Especie: *cerevisiae*

b) Requerimientos nutricionales

Al igual que la mayoría de levaduras la *S. cerevisiae*, necesita de macro y micro nutrientes esenciales para su desarrollo. De acuerdo a Cáceres & Reyna (2002), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* requiere de 200 µg de Zn, 75 µg de Fe y 12-15 µg de Cu por litro de medio. Y los macronutrientes son los que se detallan a continuación (p. 45).

- Carbono: proviene de los azúcares, útil para la fermentación de maltosa, sacarosa, galactosa.
- Nitrógeno: Constituye el 10% de la materia seca, se asimila en forma de amonio, y es útil como precursor de aminoácidos.
- Fósforo: En forma de fosfato, el dihidrógeno de potásico de fosfato suministra la cantidad necesaria para su crecimiento.
- Azufre: El sulfato de amonio y el tiosulfato son esenciales para suplir los requerimientos de azufre.

c) Inhibidores de crecimiento

De acuerdo con Cáceres & Reyna (2002), los inhibidores de crecimiento son elementos como la plata, arsénico, bario, litio, níquel, osmio, plomo, selenio y telurio (p. 46).

d) Factores de crecimiento (Cáceres & Reyna 2002, p.47)

Los factores de crecimiento son de gran importancia entre los cuales se tienen.

- Vitaminas: Biotina, pantotenato, tiamina, piridoxina, ácido p-aminobenzoico, niacina, ácido fólico, riboflavina.
- Inositol: Esencial para la división celular.
- pH: Interno 5.8 y 6.3, externo 3.0 y 7.0
- Temperatura: Entre 0°C y 40°C, con un valor óptimo entre los 28°C y 35°C.
- Actividad de agua: Debe ser mayor a 0.6

1.4.2. Papel de las levaduras sobre el vino

1.4.2.1. Papel de las levaduras sobre los polifenoles

Las levaduras emiten un efecto esponja sobre los polifenoles del vino; el cual es la diferencia en la capacidad de absorción de la pared celular de la levadura sobre algunos compuestos polifenólicos.

De acuerdo con Laurent & Palacios (2010), “este efecto influye en el índice de color, índice de polifenoles totales y el contenido de antocianos presentes en el vino, debido a la diferencia de hidrofobicidad de la pared entre cepas de levadura” (p.5).

1.4.2.2. Papel de las levaduras sobre los aroma

Los aromas de los vinos están influenciados directamente por tres factores, el tipo de levadura utilizada, la concentración de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto y la temperatura de fermentación.

Al ser las levaduras un factor que influye en el aroma del vino es importante conocer la causa de dicho efecto, el cual se da porque las levaduras pueden producir cetoácidos a través de la transaminación de aminoácidos y azúcares, estos cetoácidos pasan por descarboxilación y reducción transformándose en alcoholes superiores, gracias a la actividad enzimática de las esterasas las

levaduras pueden convertir estos alcoholes en ésteres de ácidos grasos que influyen sobre el perfil aromático de los vinos (Dulau & Palacios , 2010, p.7).

1.5. Fermentación

Según Carretero (2010), la fermentación es un proceso fundamental para la elaboración de bebidas alcohólicas, la misma que sucede de manera espontánea debido a la acción de las levaduras sobre cualquier tipo de líquido azucarado. Estos microorganismos tienen la capacidad de destruir la glucosa y otros azúcares en ausencia de aire, convirtiéndolos en dióxido de carbono y etanol (p. 34).

Las fermentaciones pueden ser: naturales, cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos necesarios o pueden ser artificiales, cuando el hombre favorece estas las condiciones.

El proceso de fermentación es importante en la industria para convertir granos a bebidas alcohólicas (el mosto en vino y la cebada en cerveza). Además, convierte carbohidratos en CO₂, esto es para hacer pan.

1.5.1. Tipos de fermentación

De acuerdo con Acosta (2008), existen varios tipos de fermentación, tales como, la fermentación alcohólica, fermentación maloláctica y la fermentación mixta (p.34). A continuación se detalla la fermentación alcohólica que es la más importante en la producción de etanol.

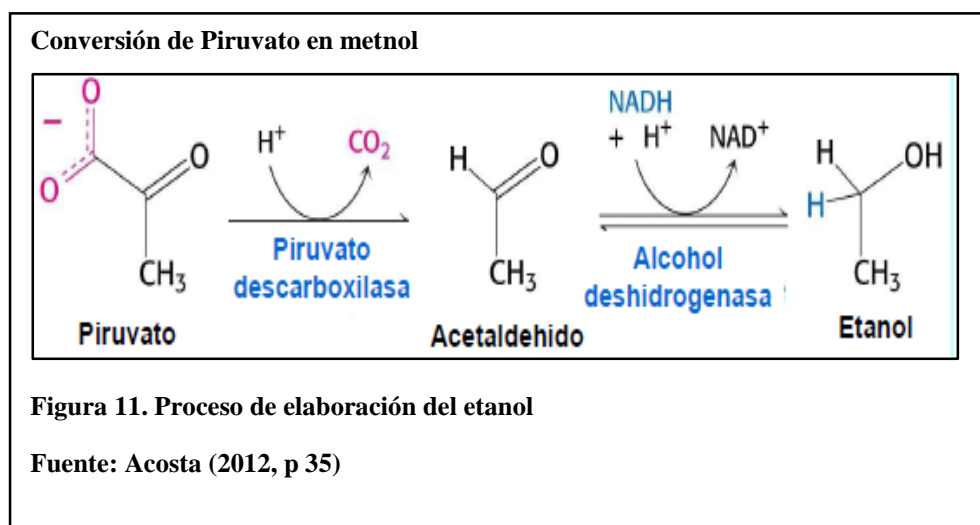
1.5.1.1. Fermentación alcohólica

De acuerdo con Nielsen (2003), la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por microorganismos entre ellos las levaduras, donde el sustrato celular; mono y di sacáridos en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono.

La fermentación alcohólica de acuerdo con Nielsen (2003), tiene etapas fundamentales, las cuales se muestran en las Figuras 11 y 12 que se detallan a continuación (p.44).

- Formación de hexosas fosfato.
- Formación de triosas fosfato.
- Oxidación del gliceraldehído-3.
- Formación del piruvato.
- Descarboxilación del piruvato
- Reducción del acetaldehído

De acuerdo con Nielsen (2003), en la fermentación alcohólica que ocurre en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol) (p.43). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidrógeno (H^+) y electrones del NADH. Tras esta operación el NADH sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el GADHP se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol.



Metabolismo mixto fermentativo.

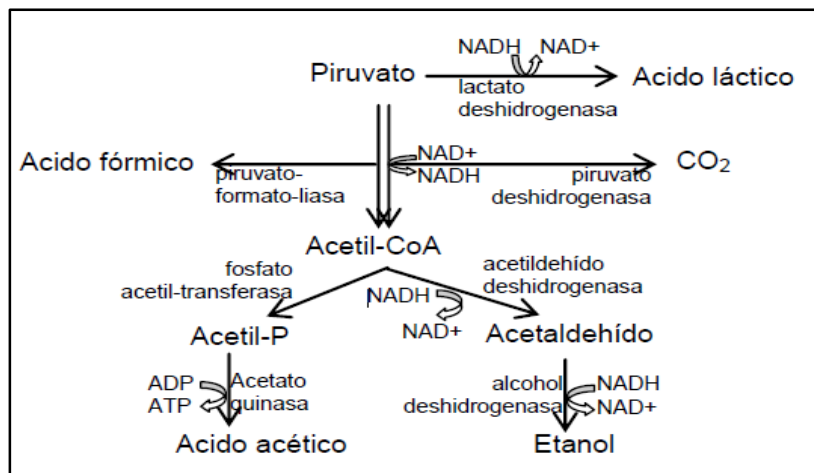


Figura 12. Producción de etanol y ácido acético

Nota: (Acosta 2012, p.34)

Acosta (2012), menciona que, la producción de etanol y su concentración aumenta según avanza el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol (p.27).

1.6. Las enzimas

De acuerdo con Acosta (2012), las enzimas intervienen en los procesos fermentativos catalizando las reacciones bioquímicas. En la Fermentación Alcohólica (FA) interviene un número importante de enzimas, se las clasificó en cuatro grupos (p. 34).

- Fosforilantes, enzimas capaces de transferir un grupo fosfato de un donador de alta energía a un aceptor. Ej: Hexoquinasa y piruvato quinasa.
- Oxidorreductoras, enzima que cataliza la transferencia de electrones desde una molécula donante (agente reductor) a otra aceptor (agente oxidante). Ej: oxidasas, y deshidrogenasas.

- Carboxilasas, que catalizan reacciones de descarboxilación, con liberación de CO_2 , y de carboxilación. Ej: Piruvato carboxilasa.
- El cuarto grupo, integrado por las enzimas que catalizan otras reacciones tales como mutación, isomerización, enolización, etc.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Fase de campo

2.1.1. Ubicación

El muestreo de los frutos de taxo se realizó en el cantón Cayambe y parroquia Calderón de la provincia de Pichincha. Ecuador.

El cantón Cayambe presenta una altitud de 2830m.s.n.m, una temperatura promedio de 12°C y una humedad relativa cercana al 80%. En este cantón las muestras fueron tomadas en la parroquia Juan Montalvo.



La parroquia de Calderón presenta una altitud de 2.696 m.s.n.m, una temperatura de 12°C y una humedad relativa cercana al 94%. En esta parroquia las muestras fueron tomadas en un cultivo ubicado en la dirección Quitus y Capitán Giovanni calles cuyas cordenadas son 0°05'42.33”S y 78°26'19.28”O.

Ubicación de la parroquia de Calderón

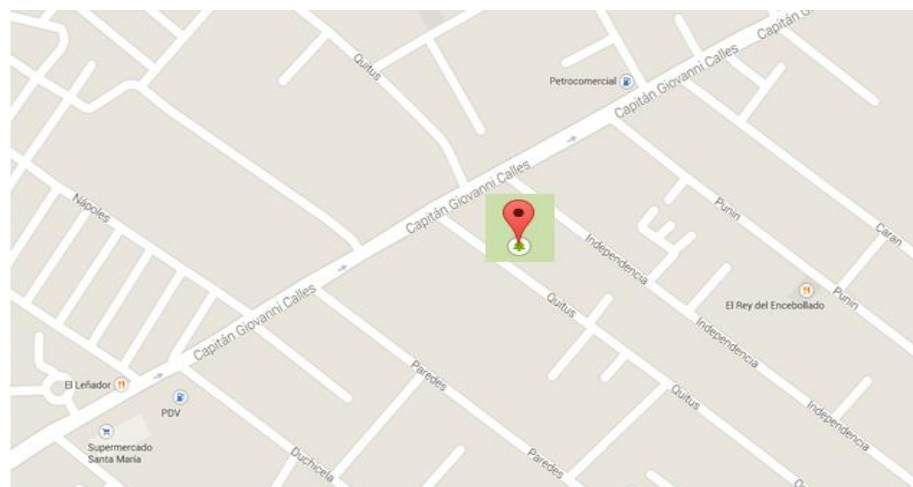


Figura 14. Lugar de muestreo de los frutos de taxo en la parroquia Calderón

Fuente: Google maps 2015

2.1.2. Preparación y dispensación de medios para muestreo de frutos

Materiales y reactivos

Fundas ziploc, medio de cultivo YPD Broth (Yeast Extract Peptone Dextrose), alcohol 70%, sablón.

Equipos

Autoclave, cámara de flujo laminar vertical, microondas.

Procedimiento

- a) Preparar el medio YPD Broth (Yeast Extract Peptone Dextrose), para lo cual, se debe añadir 50g del medio en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta que haya una disolución total y autoclavar a 110°C y 760mmHg durante 45 minutos.
- b) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón, para proceder a dispensar el medio en las fundas ziploc.
- c) Colocar 15ml del medio YPD Broth (Yeast Extract Peptone Dextrose) en cada funda ziploc, previo a la recolección de los frutos.

2.1.3. Muestreo de frutos

Materiales y reactivos

Fundas ziploc, frascos de vidrio, guantes de latex, tijeras de podar.

Procedimiento

Para la recolección de frutos se utilizó el muestreo probabilístico aleatorio simple, el cual se basan en el principio de equiprobabilidad, es decir, aquellos en los que todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser elegidos para formar parte de una muestra. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- a) Colocar un fruto seleccionado al azar en cada funda ziploc y 20 frutos en cada frasco de vidrio.
- b) Colocar las muestras en un cooler durante 72 horas, hasta evidenciar el crecimiento de microorganismos.

2.2. Fase de laboratorio

2.2.1. Preparación y dispensación de medios (ver Anexo 1)

Materiales y Reactivos

Cajas Petri, mecheros de alcohol, parafilm, agitadores magnéticos, frascos bohecos, alcohol 70% y 96%, sablón, cloranfenicol, lactato de potasio, ácido láctico, medios de cultivo YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose), SDA (Sabouroad Dextrose Agar) y lisina.

Equipos

Autoclave, Cámara de flujo laminar vertical, microondas, refrigeradora, balanza analítica, plancha térmica.

Procedimiento

2.2.1.1. Medio YPD agar para el aislamiento de levaduras

- a) Añadir 65g del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta que haya una disolución total y autoclavar a 110°C y 760mmHg durante 45 minutos.

- b) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón, para proceder a dispensar el medio en las cajas Petri.
- c) Encender los mecheros de alcohol o Bunsen para obtener esterilidad.
- d) Colocar 15ml del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) en cada caja Petri, previo a la siembra.

2.2.1.2. Medio lisina

- a) Añadir 6.6g del medio lisina más 1ml de lactato de potasio (50%) en 100ml de agua destilada, agitar hasta que haya una disolución total y calentar hasta el punto de ebullición. Se debe dejar enfriar a 50°C y regular el pH a 4.8±0.2 con ácido láctico al 10%.
- b) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón, para proceder a dispensar el medio en las cajas Petri.
- c) Colocar 10ml del medio lisina en cada caja Petri, previo a la siembra.

2.2.1.3. Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) con concentraciones de etanol al 6%, 8% y 10%

A continuación se detalla el procedimiento para la preparación del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con una concentración del 6%.

- a) Calcular la cantidad de agua y alcohol para la preparación de 1L de medio mediante la fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$.

$$V_2 = \frac{6\% \cdot 1000\text{ml}}{96\%} = 62.5\text{ml alcohol}$$

$$1000\text{ml} - 62.5 = 937.5\text{ml agua}$$

- b) Añadir 65g del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) en 937.5ml de agua destilada, agitar hasta una disolución total y autoclavar a 110°C y 760mmHg durante 45 minutos.
- c) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.

- d) Colocar 62.5ml de alcohol al 96% en el medio preparado. Este procedimiento se lo realiza dentro de la cámara de flujo para evitar una posible contaminación.
- e) Colocar 15ml del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose), con concentraciones de etanol al 6% en cada caja Petri, previo a la siembra.

Para la preparación del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con concentraciones del 8% y 10% de etanol. Se debe realizar de la misma forma descrita anteriormente, pero variando el porcentaje de concentración en los cálculos.

2.2.1.4. Medio SDA (Sabouroad Dextrose Agar)

- a) Añadir 65g del medio SDA (Sabouroad Dextrose Agar) en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta que haya una disolución total y autoclavar a 110°C y 760mmHg durante 45 minutos.
- b) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón, para proceder a dispensar el medio en las cajas Petri.
- c) Encender los mecheros de alcohol o Bunsen para obtener esterilidad.
- d) Colocar 15ml del medio SDA (Sabouroad Dextrose Agar) en cada caja Petri, previo a la siembra.

2.2.1.5. Medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con diferentes pH

- a) Añadir 90g del medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) en 1.800ml de agua destilada, calentar y agitar hasta que haya una disolución total y autoclavar a 110°C y 760mmHg durante 45 minutos.
- b) Dispensar 100ml del medio en cada uno de los matraces Erlenmeyer
- c) Colocar ácido clorhídrico al 10% (HCl) en los matraces Erlenmeyer hasta regular el pH a 5.08, 5.8 y 6.2.
- d) Colocar bicarbonato de sodio al 10% (NaHCO₃) en el matraz Erlenmeyer hasta regular el pH a 7.0

2.2.2. Aislamiento de levaduras

Materiales, reactivos y equipos

Cajas Petri con medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose), asas de microbiología, mecheros de alcohol, micropipetas, puntas estériles, parafilm, coolers, alcohol 70% y 90%, cámara de flujo laminar vertical

Procedimiento

Para el aislamiento de levaduras se utilizaron las técnicas; la técnica de agotamiento por estría y de difusión en placa.

Siembra por la técnica de agotamiento por estrías

- a) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.
- b) Esterilizar el asa en el mechero o en el esterilizador de asa.
- c) Tomar con el asa estéril la muestra contenida en la fundas y realizar un rayado en la caja Petri que contienen YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose).
- d) Expandir el inóculo por toda la caja.
- e) Cerrar la caja Petri cerca del mechero y sellar con parafilm en todo su contorno.
- f) Colocar las cajas selladas en un cooler a temperatura ambiente.
- g) Controlar el crecimiento de las colonias a las 24, 48 y 72 horas.

Siembra por difusión en placa

- a) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.
- b) Abrir el frasco de vidrio en presencia del mechero.
- c) Tomar 1ml de inóculo del frasco de fermentación con la micropipeta y colocar en el centro de la caja Petri con YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose)
- d) Extender el inóculo sobre la superficie del medio en forma circular utilizando un asa de Winograski estéril.
- e) Cerrar la caja Petri cerca del mechero y sellar con parafilm en todo su contorno.
- f) Colocar las cajas selladas en un cooler a temperatura ambiente.
- g) Controlar el crecimiento de las colonias a las 24, 48 y 72 horas.

2.2.3. Codificación de levaduras aisladas

A las colonias aisladas se les asignó una codificación consecutiva, de acuerdo al lugar donde fueron muestreados los frutos.

Las cepas aisladas de los frutos muestreados en las parroquias de Cayambe y Calderón tienen la siguiente codificación.

- a) El número de la funda de donde se aisló la cepa.
- b) La letra del lugar donde se recolectó los frutos.
- c) Las siglas TX, abreviatura del nombre del fruto.
- d) El número de la colonia de donde se aisló el cultivo puro.

Ejemplo: 10 OTX-2 (Cepa de Cayambe- Oyacachi)

11 CTX-1 (Cepa de Calderón)

2.2.4. Selección de levaduras con resistencia alcohólica

Materiales, reactivos y equipos

Cajas Petri con medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con concentraciones de etanol al 6%, 8% y 10%, asas de microbiología, mecheros de alcohol, parafilm, coolers, alcohol 70%, sablón, cámara de flujo laminar vertical.

Procedimiento

Para la selección de levaduras resistentes al alcohol, se sembraron las levaduras en medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con concentraciones de etanol al 6%, 8% y 10%. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- a) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.
- b) Esterilizar el asa y tomar una pequeña colonia de cada cultivo y realizar un rayado en las cajas Petri que contienen YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose) con concentraciones de etanol al 6%, 8% y 10%.
- c) Cerrar la caja Petri cerca del mechero y sellar con parafilm en todo su contorno.
- d) Colocar las cajas selladas en un cooler a temperatura ambiente.
- e) Controlar el crecimiento de las colonias durante 24, 48 y 72 horas.

2.2.5. Selección de levaduras con características fermentativa

Materiales, reactivos y equipos

Cajas Petri, asas de microbiología, mecheros de alcohol, parafilm, agitadores magnéticos, frascos bohecos, coolers, alcohol 96%, sablón, medio de cultivo lisina, lactato de potasio, ácido láctico, cámara de flujo laminar vertical.

Procedimiento

Se seleccionaron aquellas cepas que presentaron resistencia a 6°GL y 8°GL, de etanol, las cuales se sembraron en medio lisina. El procedimiento fue el siguiente:

- a) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.
- b) Esterilizar el asa en el mechero o en el esterilizador de asa.
- c) Tomar con el asa estéril una muestra de las cajas sembradas en el medio YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose).
- d) Sembrar mediante la técnica de agotamiento por estría, en las cajas Petri que contienen el medio lisina.
- e) Cerrar las cajas Petri cerca del mechero y sellar con parafilm en todo su contorno.
- f) Colocar las cajas selladas en un cooler a temperatura ambiente.
- g) Controlar el crecimiento de las colonias durante 24, 48 y 72 horas.
- h) Seleccionar las cajas en las cuales no se evidencie crecimiento.

2.2.6. Identificación de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica

2.2.6.1. Identificación macroscópica

Materiales, reactivos y equipos

Cajas Petri con cultivo puro, mecheros bunsen, parafilm, alcohol 70%, lámpara con lupa.

Procedimiento

Para realizar la identificación macroscópica de levaduras se seleccionaron aquellas levaduras que presentaron características fermentativas y resistencia alcohólica, es decir aquellas que no crecieron en el medio lisina y si en medios con concentraciones de alcohol. Las levaduras a observar se resembraron

previamente en medio SDA (Sabouroad Dextrose Agar). El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- a) Analizar las características de las colonias presentes en placas Petri con una lupa cuenta colonias, luego de 48 horas de crecimiento a temperatura ambiente.
- b) Observar características morfológicas como color (crema, marrón, anaranjado o tomate y amarillo), olor (fermentación), tamaño (1 a 9 μm de ancho y de 2 a más de 20 μm de longitud), forma (redonda, ovalada, alargada), aspecto (rugoso y liso) y características de contorno (Regular o irregular).
- c) Comparar las características macroscópicas con la bibliografía consultada, para determinar el género de las levaduras.

2.2.6.2. Identificación microscópica

Materiales, reactivos y equipos

Mechero de Bunsen, asas de microbiología, porta y cubre objetos, pizetas, azul de lactofenol, aceite de inmersión, microscopio con cámara.

Procedimiento

- a) Limpiar los portaobjetos con alcohol y agua.
- b) Colocar una gota de agua destilada sobre el portaobjetos.
- c) Tomar una pequeña muestra de la cepa de levadura con el asa estéril y diluir en el portaobjetos con agua destilada.
- d) Fijar la muestra al calor, flameándola en el mechero. Procurar no quemar la muestra.
- e) Colocar una gota de azul de lactofenol sobre la muestra.
- f) Fijar la muestra al calor, procurando no quemar la muestra.
- g) Observar al microscopio con el lente de 4x, cuando se enfoque bien imagen en el lente de 4x, observar en los d 10x y 40x.
- h) Colocar una gota de aceite de inmersión y observar en el microscopio a 100x.
- i) Tomar fotografías de las levaduras observadas y comparar con la bibliografía consultada.

2.2.6.3. Identificación Bioquímica

Materiales, reactivos y equipos

Asas de microbiología, micropipeta, mechero de alcohol, puntas estériles, pruebas RAPID (Remel), cámara de flujo laminar, incubadoras.

Procedimiento

Preparación del inóculo

- a) Sembrar en el medio SDA (Sabouraud dextrosa agar), mediante la técnica de agotamiento por estría.
- b) Incubar las cajas sembradas a 30°C durante 48 horas.
- c) Tomar con el asa estéril una muestra de cultivo y suspender en el líquido de inoculación RapID (2ml) para conseguir una turbidez visual con la ayuda de la tarjeta de inoculación RapID.
- d) Seleccionar colonias bien aisladas y añadir incrementalmente al fluido de inoculación RapID, para evitar la formación de coágulos.
- e) Añadir el microorganismo hasta que la turbidez de la suspensión oculte completamente las líneas negras de la tarjeta de inoculación. Cuando las líneas negras de la tarjeta de inoculación no están visibles, se ha completado la preparación del inóculo.
- f) Mezclar las suspensiones con vórtex si es preciso. Las suspensiones se deben usar 15 minutos siguientes a su preparación.
- g) Inocular otra placa de agar para comprobar la pureza y cualquier otro estudio adicional que pueda ser necesario, usando un asa llena de la suspensión de prueba del tubo del líquido de inoculación. Incubar la placa durante un periodo de 24 - 72h a una temperatura de 30°C.

Inoculación de los paneles RapID

- a) Abrir una tapa del panel sobre el acceso de inoculación, tirando de la pestaña marcada “Peel to inoculte” hacia arriba y hacia la izquierda.
- b) Transferir con una pipeta suavemente el contenido de todo el tubo del líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel.

- c) Volver a sellar el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición original.
- d) Inclinar el panel hacia el lado contrario de los pocillos de reacción, aproximadamente a un ángulo de 45°, después de añadir a suspensión a prueba.
- e) Mover suavemente el panel de lado a lado para distribuir homogéneamente el inóculo a lo largo de las depresiones posteriores.
- f) Inclinar el panel lentamente hacia adelante, hacia los pocillos de reacción. De esta manera todo el inóculo de la parte del panel será evacuado.
- g) Procurar no inclinar demasiado, ya que puede quedar aire atrapado en la unión de los pocillos y limitar el movimiento de los líquidos.
- h) Devolver el panel a su posición nivelada. SI es necesario dar unos golpes suaves con el panel contra la mesa para eliminar el aire atrapado entre los pocillos.
- i) Examinar los pocillos de prueba. No deben presentar burbujas y deben estar uniformes y llenos. Se aceptan pequeñas irregularidades en el llenado de los pocillos de prueba. No afectarán a su comportamiento. Si el panel está claramente mal lleno, se debe inocular el nuevo panel y desecharse el erróneo.
- j) Completar la inoculación de cada panel que reciba el líquido de inoculación antes de inocular nuevos paneles.

Incubación de los paneles RapID

Incubar los paneles de inoculados a una temperatura de 30°C en una incubadora sin CO₂, durante 4 horas. Para facilitar la manipulación, los paneles se pueden incubar en las bandejas de incubación de cartón.

Puntuación de los paneles RapID

Los paneles RapID contienen 18 pocillos de reacción que proporcionan 18 puntuaciones de prueba. Las pruebas que requieren un reactivo (pocillos del 7 al 14 y del 16 al 18) aparecen asignados mediante un recuadro que los rodea.

- a) Sujetar firmemente el panel RapID sobre la mesa y retirar la tapa que cubre los pocillos de reacción. Para ello tirar de la pestaña inferior derecha hacia arriba y hacia la izquierda.
- b) Añadir una gota de reactivo RapID Yeast plus A, a los pocillos 7 (NAGA) al 14 (PCHO).
- c) Añadir una gota de reactivo RapID Yeast Plus B, a los pocillos del 16 (PRO) al 18 (LGY), esperar al menos 30 segundos pero no más de 1 minuto para que se desarrolle el color.
- d) Mezclar mediante una varilla aplicadora antes de la lectura, los pocillos que muestran capas de color.
- e) Leer los pocillos de prueba de izquierda a derecha usando la guía de interpretación. Anotar las puntuaciones en los recuadros correspondientes del formulario de resultados.
- f) Consultar el microcódigo obtenido en el formulario de resultados del Compendio de Código RapID Yeast Plus o ERIC® (Compendio electrónico RapID) para la identificación.

2.2.7. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó tomando en cuenta dos parámetros que son pH y temperatura. El crecimiento se evaluó con pH de 5.08, 5.8, 6.2 y 7; y temperaturas de 15, 25, 35 y 40°C.

Materiales y reactivos

Tubos con tapa rosca, gradilla, micropipeta, matraz erlenmeyer, puntas estériles, tubos eppendorf, celdas para espectrofotómetro.

Equipos

Balanza analítica, espectrofotómetro, microscopio óptico

Procedimiento

Previo a la curva de crecimiento se realiza la siembra del inóculo para lo cual se realiza el siguiente procedimiento.

- a) Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón.

- b)** Tomar con un asa estéril una muestra de la levadura de interés (*Saccharomyces*) e inocular en cada uno de los matraces.
- c)** Incubar los matraces con diferentes pH a temperatura ambiente.
- d)** Incubar los demás matraces de acuerdo a las temperaturas asignadas, durante una semana.

Toma de muestras

- a)** Limpiar y desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sablón, para proceder a dispensar el medio en los tubos.
- b)** Colocar 2ml de muestra de cada uno de los matraces en diferentes tubos con tapa rosca, previo a la lectura en el espectrofotómetro.

Lectura de las muestras

- a)** Calibrar el espectrofotómetro, para ello colocar la absorbancia de 620 nm, colocar en la celda el blanco (Yeast Extract Peptone Dextrose Broth) y dar lectura.
- b)** Realizar la lectura de las muestras incubadas a diferentes temperaturas y pH.
- c)** Realizar la lectura cada 4 o 5 horas durante una semana.
- d)** Anotar los resultados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento y selección de levaduras

Tabla 4.

Aislamiento de levaduras del cantón Cayambe, Pichincha.

Técnica de agotamiento por estrías		
Código	Crecimiento	
	24h	48h
1 OTX-1	+	+
2 OTX-1	+	+
2 OTX-2	+	+
3 OTX-1	-	+
4 OTX-1	-	+
4 OTX-2	-	+
5 OTX-1	+	+
5 OTX-2	+	+
6 OTX-1	-	+
6 OTX-2	+	+
6 OTX-3	+	+
7 OTX-1	+	+
7 OTX-2	+	+
7 OTX-3	+	+
8 OTX-1	+	+
9 OTX-1	-	+
10 OTX-1	-	+
10 OTX-2	+	+
10 OTX-3	+	+
11 OTX-1	+	+
11 OTX-2	+	+
12 OTX-1	+	+
12 OTX-2	+	+
13 OTX-1-1	+	+
13 OTX-1-2	+	+
14 OTX-1-1	+	+
14 OTX-1-2	-	+
14 OTX-2	+	+
15 OTX-1	-	+
15 OTX-2	-	+
Técnica de difusión por placa		
1F OTX-1	-	+
1F OTX-2	+	+
1F OTX-3	+	+
1F OTX-4	+	+
1F OTX-5	-	+
1F OTX-6	+	+
2F OTX-1	+	+
2F OTX-2	-	+
2F OTX-3	-	+
2F OTX-4	+	+
% de crecimiento	67.5%	100%
+ Crecimiento microbiano - Ausencia de Crecimiento microbiano		

Nota: Aislamiento de levaduras a partir del taxo muestreados en Cayambe.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 5.

Aislamiento de levaduras de la parroquia Calderón, Pichincha.

Técnica de agotamiento por estrías		
Código	Crecimiento	
	24h	48h
1 CTX-1	+	+
1 CTX-2	+	+
2 CTX-1	+	+
2 CTX-2	+	+
3 CTX-1	+	+
3 CTX-2	+	+
3 CTX-3	+	+
4 CTX-1	+	+
5 CTX-1	+	+
6 CTX-1	+	+
6 CTX-2	+	+
6 CTX-3	+	+
7 CTX-1	-	+
7 CTX-2	+	+
7 CTX-3	+	+
8 CTX-1	+	+
8 CTX-2	+	+
8 CTX-3	+	+
9 CTX-1	+	+
9 CTX-2	-	+
10 CTX-1-1	+	+
10 CTX-2	+	+
11 CTX-1	-	+
11 CTX-2	-	+
12 CTX-1	+	+
12 CTX-2	+	+
12 CTX-3	+	+
13 CTX-1	+	+
14 CTX-1-1	+	+
14 CTX-1-2	-	+
15 CTX-1	+	+
15 CTX-2	+	+
Técnica de difusión por placa		
1F CTX-1	-	+
1F CTX-2	+	+
1F CTX-3	+	+
2F CTX-1	-	+
2F CTX-2	+	+
2F CTX-3	+	+
2F CTX-4	+	+
2F CTX-5	-	+
% de crecimiento	80%	100%
+ Crecimiento microbiano		
- Ausencia de Crecimiento microbiano		

Nota: Aislamiento de levaduras a partir del taxo muestreados en Calderón.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía

En las tabla 4 y 5, se presentan los resultados del aislamiento de levaduras a partir de los frutos de taxo (*Passiflora mollissima*) recolectados tanto en la parroquia de Cayambe y Calderón. Se puede observar que de 40 cepas aisladas en Cayambe el 67.5% presentaron crecimiento a las 24 horas por ambas técnicas. Mientras que de 40 cepas aisladas en Calderón el 80% crecieron a las 24 horas. El mejor crecimiento de las levaduras aisladas de ambas localidades se presentó a las 48 horas puesto que se completó el crecimiento de todas las cepas. Esto posiblemente se deba a las diferentes temperaturas a las que fueron sometidas las levaduras en el laboratorio, ya que ésta puede oscilar entre 16-25°C.

Los resultados obtenidos concuerdan con Feoli, Gómez, & Muñoz (1997), quienes indican que, el crecimiento de las levaduras a temperatura ambiente se da a partir de las 24 y 48 horas, en medio YPD agar con antibióticos. Resultados similares fueron obtenidos por Briones *et al.* (2010), quienes en su investigación aislaron levaduras en medio YPD agar y su crecimiento se presentó a partir de las 24 y 48 horas tras la incubación de las placas a 28°C.

Regodón (2007), menciona que las temperaturas idóneas para el crecimiento de cepas vínicas está comprendida entre los 20-25°C, ya que temperaturas inferiores a 15°C retrasan el crecimiento de las mismas y temperaturas superiores a 35°C provocan destrucción de las levaduras. Adicionalmente temperaturas entre 10-20°C favorecen el crecimiento de levaduras débilmente fermentativas como *Kloeckera apiculata* y *Candida stellata* u otras indeseables como *Brettanomyces* sp. Pero según Uribe (2007), la temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras está entre 5-37°C, y el valor óptimo se sitúa hasta los 28°C. En la presente investigación se manejó temperaturas entre 16-25°C, lo que contribuye a que los resultados obtenidos están dentro de los parámetros citados por los autores dándole un grado de confiabilidad al estudio.

Se obtuvieron mayor número de cultivos puros con la técnica de agotamiento por estría, puesto que a partir de éste método se puede obtener un número reducido de microorganismos distribuidos individualmente sobre la superficie de la placa, lo que concuerda con Godoy (2013), quien en un estudio utilizó el método de

aislamiento en placa por estrías, con el objetivo de obtener cultivos puros, corroborando que el método de agotamiento por estría es más eficaz para obtener cultivos puros en comparación con la técnica de difusión en placa.

Como resultado de una identificación macroscópica posterior al aislamiento, se obtuvo 49 cepas puras con diferente morfología, como el color, tamaño, forma, aspecto y características de contorno (ver anexo 4).

3.2. Selección de levaduras con resistencia alcohólica

Tabla 6.

Levaduras con resistencia alcohólica. Cayambe

	Código	Crecimiento		
		6%	8%	10%
1	1 OTX-1	-	-	-
2	2 OTX-1	-	-	-
3	2 OTX-2-1	+	-	-
4	3 OTX-1	-	-	-
5	3 OTX-2	-	-	-
6	4 OTX-1	+	-	-
7	4 OTX-2-2	-	-	-
8	4 OTX-3-1	+	-	-
9	5 OTX-1	-	-	-
10	5 OTX-2	+	-	-
11	6 OTX-1	-	-	-
12	6 OTX-2	-	-	-
13	7 OTX-1	-	-	-
14	7 OTX-2	+	-	-
15	8 OTX-1	-	-	-
16	8 OTX-2	-	-	-
17	9 OTX-1	-	-	-
18	10 OTX-2	+	+	-
19	11 OTX-1	+	+	-
20	11 OTX-2	+	+	-
21	11 OTX-3	-	-	-
22	12 OTX-1-1	+	-	-
23	12 OTX-2	+	-	-
24	14 OTX-1-1	+	+	-
25	14 OTX-1-2	+	+	-
26	15 OTX-1	-	-	-
% de crecimiento		46.1%	19.23%	0%
+ Crecimiento microbiano				
- Ausencia de Crecimiento microbiano				

Nota: Selección de las levaduras con resistencia alcohólica. Cayambe

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 7.**Levaduras con resistencia alcohólica. Calderón**

	Código	Crecimiento		
		6%	8%	10%
1	1 CTX-1	+	-	-
2	1 CTX-2	-	-	-
3	2 CTX-2	+	-	-
4	3 CTX-3	+	-	-
5	4 CTX-1	-	-	-
6	5 CTX-1	-	-	-
7	6 CTX-3	-	-	-
8	7 CTX-1	-	-	-
9	7 CTX-2	+	+	-
10	7 CTX-3	+	+	-
11	8 CTX-2	+	+	-
12	8 CTX-3	-	-	-
13	9 CTX-1	+	-	-
14	9 CTX-2	+	-	-
15	10 CTX-2	+	+	-
16	10 CTX-3	+	-	-
17	11 CTX-1	+	+	-
18	11 CTX-2	+	-	-
19	12 CTX-1	-	-	-
20	12 CTX-2	-	-	-
21	13 CTX-3	+	-	-
22	15 CTX-1	+	-	-
23	15 CTX-3-1	-	-	-
% de crecimiento		60.86%	21.74%	0%
+ Crecimiento microbiano				
- Ausencia de Crecimiento microbiano				

Nota: Selección de las levaduras con resistencia alcohólica. Calderón.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Se realizó la resistencia alcohólica de 49 cepas que presentaron características morfológicas diferentes, de acuerdo a su identificación macroscópica.

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de etanol (6%, 8%, 10%) en el medio de cultivo YPD agar (Yeast Extract Peptone Dextrose), se encontró que éstas afectaron el crecimiento de las levaduras, siendo su desarrollo menor comparado con el crecimiento obtenido en el medio convencional SDA (Sabouroad Dextrose Agar).

En la tabla 6, se puede observar que el 46.1% de las cepas resistieron a 6°GL y solo el 19.23% a 8°GL, de un total de 26 cepas aisladas de la parroquia de Cayambe (Ver Anexo 2). La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de la resistencia alcohólica de cepas aisladas de la parroquia de Calderón, en donde se obtuvo que 60.86% de levaduras resistieron a 6°GL y solo el 21.74% a 8°GL de un total de 23 cepas (ver Anexo 3).

Estos resultados concuerdan con Garzón & Hernández (2009) quienes señalan que las levaduras presentan cierta resistencia a concentraciones de alcohol, debido a que el etanol inhibe el transporte de algunos aminoácidos y afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas.

De acuerdo a Villar (1992), cuando el etanol alcanza una concentración del 5%, tiene lugar una pérdida del 50% de la actividad metabólica. Por lo cual a una mayor concentración de etanol se ve afectado el crecimiento de las levaduras; ya que el etanol incide sobre múltiples dianas celulares por lo cual se ven afectados varios procesos fisiológicos (pag.3).

Algunas cepas que crecieron a concentraciones del 8% posiblemente pertenecen al género *Saccharomyces*, ya que, según Villar (1992), *Saccharomyces cerevisiae* suele ser resistente a altas concentraciones de etanol al poseer un gran número de proteínas implicadas en la tolerancia a etanol (pag.9). De igual forma Ortiz (2013), menciona que ciertas levaduras del género *Kloeckera* y *Candida* tienen una elevada sensibilidad al etanol (5 a 6%) por lo cual su crecimiento declina rápidamente y mueren al verse afectada la integridad de su membrana citoplasmática y pérdida de la actividad de ciertas enzimas de la glucólisis de las levaduras, mientras que levaduras como *Saccharomyces* son más resistentes al etanol.

Los resultados obtenidos corroboran con lo mencionado por los autores, puesto que al aumentar la concentración de etanol en el medio, el crecimiento de las levaduras fue disminuyendo hasta inhibirse por completo.

3.3. Selección de levaduras con características fermentativas

Tabla 8.

Levaduras con características fermentativas. Cayambe

	Código	Crecimiento		
		24h	48h	72h
1	2 OTX2-1	-	-	+
2	4 OTX-1	-	+	+
3	4 OTX3-1	-	+	+
4	5 OTX-2	+	+	+
5	6 OTX-1	+	+	+
6	7 OTX-2	+	+	+
7	8 OTX-1	+	+	+
8	8 OTX-2	+	+	+
9	10 OTX-2	-	-	-
10	11 OTX-2	-	-	-
11	12 OTX-1-1	+	+	+
12	12 OTX-2	+	+	+
13	14 OTX-1-1	+	+	+
14	14 OTX-1-2	-	-	+
% de crecimiento		73.08%	80.7%	92.31%
+ Crecimiento microbiano - Ausencia de Crecimiento microbiano				

Nota: Selección de las levaduras con características fermentativas. Cayambe

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 9.**Levaduras con características fermentativas. Calderón**

	Código	Crecimiento		
		24h	48h	72h
1	1 CTX-1	-	-	+
2	2 CTX-2	-	+	+
3	3 CTX-3	+	+	+
4	5 CTX-1	+	+	+
5	7 CTX-2	-	+	+
6	7 CTX-3	+	+	+
7	8 CTX-2	+	+	+
8	9 CTX-1	+	+	+
9	9 CTX-2	-	+	+
10	10 CTX-2	+	+	+
11	10 CTX-3	+	+	+
12	11 CTX-1	+	+	+
13	11 CTX-2	+	+	+
14	13 CTX-3	+	+	+
15	15 CTX-1	+	+	+
% de crecimiento		71.42%	85.71%	100%
+ Crecimiento microbiano				
- Ausencia de Crecimiento microbiano				

Nota: Selección de las levaduras con características fermentativas. Caderón.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

En las tablas 8 y 9 se pueden observar los resultados obtenidos de la selección de levaduras con características fermentativa, que fueron aisladas de los frutos de taxo (*Passiflora mollissima*) recolectados tanto en la parroquia de Cayambe y Calderón. Se observa que solo 2 cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2 no crecieron en medio lisina, por lo cual se presume que son levaduras del género *Saccharomyces*. Las cepas restantes crecieron durante las 24 y 48 horas de incubación, debido a que se tratan de cepas que no pertenecen al género *Saccharomyces*.

Estos resultados concuerdan con Godoy (2013), quien menciona que, el medio lisina es un medio diferencial que permite la discriminación entre especies de *Saccharomyces* y especies que no pertenecen a éste género, debido a que el medio contiene lisina como única fuente de nitrógeno y *S. cerevisiae*, no es capaz de metabolizar la lisina, por lo cual, no crece en el medio (p.24). Al igual que en un estudio realizado por Ortiz (2013), las levaduras fueron sembradas en medio lisina

e incubadas a 25°C, con el fin de diferenciar a las cepas del género *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces*. Los resultados obtenidos, concuerdan con lo mencionado por los autores, puesto que, se obtuvo dos cepas que no crecieron en el medio lisina por lo que se puede asegurar que pertenecen al género *Saccharomyces*.



3.4. Identificación de las levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica

3.4.1. Identificación macroscópica de las levaduras que presentan capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.

La descripción macroscópica de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, se describen en las tablas 10 y 11 respectivamente. Las mismas que se detalla a continuación.

Tabla 10.

Identificación macroscópica de la cepa 10 OTX-2

Código/foto	Imagen/ Autor
<p data-bbox="309 371 958 400">Figura 15. Vista macroscópica de la cepa 10 OTX-2</p>  <p data-bbox="309 863 831 892">Nota: (Elaborado por Heredia y Kwok; 2014)</p>	<p data-bbox="1173 371 1827 400">Figura 16. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces sp.</i></p> <p data-bbox="1173 405 1469 434">Nota: (Cyril J, 2009; p.8).</p>  <p data-bbox="1592 810 1877 833">© www.acapixus.dk</p>
<p data-bbox="309 919 645 948">Descripción Macroscópica</p>	<p data-bbox="1173 919 1509 948">Descripción Macroscópica</p>
<p data-bbox="309 983 936 1011">Color: Crema con un centro de color amarillento</p> <p data-bbox="309 1031 555 1059">Tamaño: Pequeña</p> <p data-bbox="309 1078 546 1107">Forma: Esférica</p> <p data-bbox="309 1126 591 1155">Aspecto: Liso y plana</p> <p data-bbox="309 1174 882 1203">Características del contorno: Bordes regulares</p>	<p data-bbox="1173 983 1962 1171">Son planas, lisas, suaves, húmedas, brillante o mate, y de color crema blanca o amarillo. La imposibilidad de utilizar el nitrato y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son características típicas de <i>Saccharomyces</i>. (Cyril J, 2009; p.8)</p>



Nota: Resultado de la identificación macroscópica de la cepa 10 OTX-2.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 11.

Tabla 11.

Identificación macroscópica de la cepa 11 OTX-2

Código/foto	Imagen/ Autor
<p data-bbox="309 411 492 443">Cepa 11 OTX-2</p>  <p data-bbox="309 829 896 890">Figura 17. Vista macroscópica de la cepa 11 OTX-2 Elaborado por (Heredia y Kwok; 2014).</p>	<p data-bbox="1137 383 1344 414"><i>Saccharomyces sp.</i></p>  <p data-bbox="1137 829 1713 890">Figura 18. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces sp.</i> Nota: (Cyril J, 2009; p.8)</p>
<p data-bbox="309 909 616 941">Descripción Macroscópica</p> <p data-bbox="309 954 918 986">Color: Mate con centro de color medio amarillento.</p> <p data-bbox="309 1002 548 1034">Tamaño: Mediana</p> <p data-bbox="309 1050 526 1082">Forma: Esférica</p> <p data-bbox="309 1098 571 1129">Aspecto: Liso y plana</p> <p data-bbox="309 1145 828 1177">Características del contorno: Bordes regulares</p>	<p data-bbox="1137 909 1444 941">Descripción Macroscópica</p> <p data-bbox="1137 954 1960 1125">La forma de las <i>Saccharomyces cerevisiae</i> puede ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o suavemente alargada. En cuanto a su apariencia es muy diversa, ya que, pueden ser de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones brillantes u opacas. (García, Quintero, & López, 2004; p. 267).</p>

Nota: Resultado de la identificación macroscópica de la cepa 11 OTX-2.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

La identificación macroscópica de las levaduras que presentaron resistencia alcohólica y capacidad fermentativa mostró como resultado las características que se detallan en la tabla 10 y 11. Por lo que, se presume que las cepas 10 OTX-2 y la 11 OTX-2, pertenecen al género *Saccharomyces*, ya que presentan características morfológicas similares a las descritas por los autores García, Quintero, & López (2004), quienes describen a las colonias de dicho género como: esférica, elipsoidal, cilíndrica o suavemente alagada de apariencia muy diversa, entre lisas a rugosas y de color crema a ligeramente café, en ocasiones brillantes u opacas (p. 267).

La identificación macroscópica, nos permite diferenciar entre las características morfológicas de las colonias aisladas, lo cual es necesario obtener cepas puras. Por esta razón, es importante tener en cuenta los factores que influyen en el crecimiento de las levaduras. De acuerdo con Cáceres & Reina (2002), el crecimiento de levaduras está influenciado por varios factores, tales como ; el medio de cultivo, la temperatura de incubación, entre otros.

El medio de cultivo es importante cuando se trata de la identificación macroscópica; según Narrea & Malpartida (2006), el más utilizado para la descripción macroscópica es el YPD agar debido a que su composición es rica en glucosa, fuente principal de alimento para las levaduras (p.145). Sin embargo, según Linares & Solís (2011), el medio más apropiado para la identificación macroscópica es el medio SDA, ya que su bajo pH (5.6 ± 0.2), favorece el crecimiento de levaduras e inhibe el crecimiento de algunas bacterias. En caso de requerirse un incremento en la inhibición del crecimiento de bacterias, se recomienda añadir agentes antimicrobianos, como la gentamicina que inhibe el crecimiento de los microorganismos gram negativos o el cloramfenicol que tiene un amplio espectro de acción. Así se corroboran los resultados de la presente investigación, ya que al usar el medio SDA, se observó de mejor manera las características macroscópicas de las cepas obtenidas.

De acuerdo con Cáceres & Reyna (2002), para que exista un crecimiento diferenciado uno de los factores que influyen es la temperatura, la cuál oscila entre los 15°C a

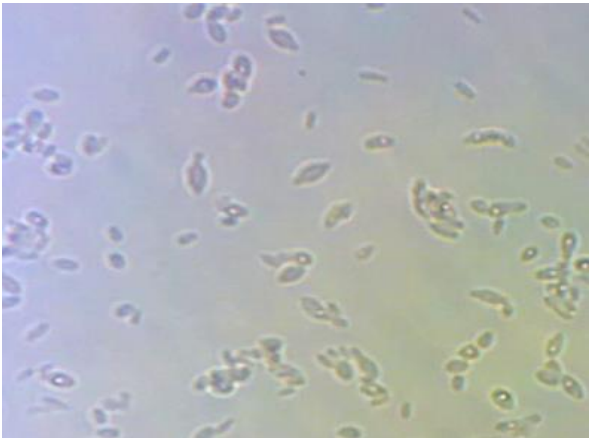
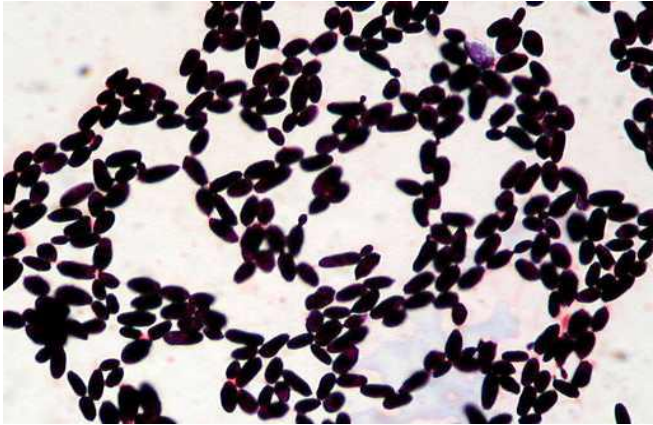
25°C. Los resultados obtenidos en la presente investigación son corroborado por los autores, ya que la temperatura de crecimiento es la misma según la bibliografía.

3.4.2. Identificación microscópica de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2

La descripción microscópica de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, se describen en las tablas 12 y 13 respectivamente. Las mismas que se detalla a continuación.

Tabla 12.

Identificación microscópica de la cepa 10 OTX-2

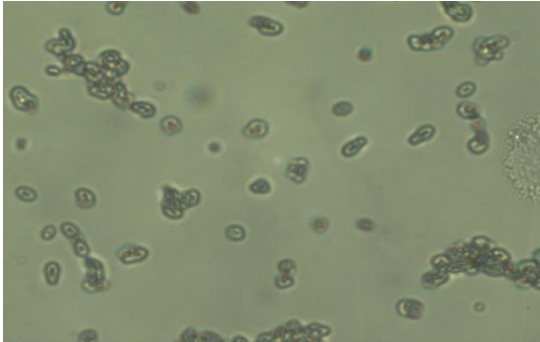
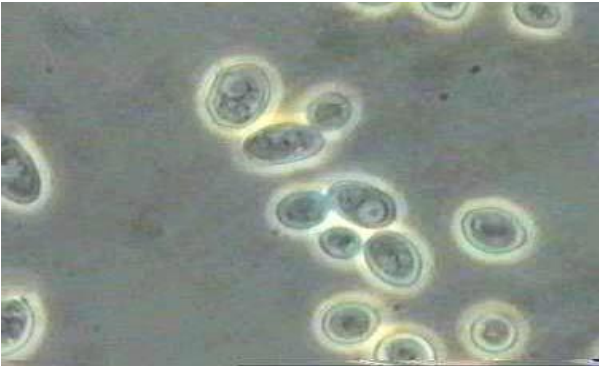
Código/foto	Imagen/ Autor
<p data-bbox="344 379 546 408">Cepa 10 OTX-2</p>  <p data-bbox="344 884 927 912">Figura 17. Vista microscópica de la cepa 10 OTX-2</p> <p data-bbox="344 932 797 960">Elaborado por: (Heredia y Kwok; 2014)</p>	<p data-bbox="1128 379 1308 408"><i>Saccharomyces</i></p>  <p data-bbox="1128 884 1675 912">Figura 18. Vista microscópica de <i>Saccharomyces</i></p> <p data-bbox="1128 932 1438 960">Fuente: (Cyril J, 2009; p.9)</p>
<p data-bbox="309 983 636 1011">Descripción Microscópica</p> <p data-bbox="309 1031 1079 1114">Célula redonda, con un núcleo diferenciado en el centro, de tamaño 72.72 μm de ancho y 48.37μm de longitud.</p>	<p data-bbox="1102 983 1429 1011">Descripción Microscópica</p> <p data-bbox="1102 1031 1908 1216">De acuerdo con Carrascosa, (s.a.), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es un organismo unicelular, de forma más o menos redondeada, su célula presenta un núcleo diferenciado y su tamaño oscila entre 2 a más de 200 μm; siendo por lo tanto un organismo eucariota (p.2).</p>

Nota: Resultado de la identificación microscópica de la cepa 10 OTX-2.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 13.

Identificación microscópica de la cepa 11 OTX-2

Código/foto	Imagen/ Autor
<p>Cepa 11 OTX-2</p>  <p>Figura 19. Vista microscópica de la cepa 11 OTX-2 Elaborado por : (Heredia y Kwok, 2014).</p>	<p><i>Saccharomyces sp.</i></p>  <p>Figura 20. Vista microscópica de <i>Saccharomyces sp.</i> Fuente: (Cyril J, 2009, p.10)</p>
<p>Descripción Microscópica</p>	<p>Descripción Microscópica</p>
<p>Célula redonda, con un núcleo diferenciado en el centro, de tamaño 109.52 μm de ancho y 96.51 μm de longitud.</p>	<p>De acuerdo con Carrascosa, (s.a.), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es un organismo unicelular, de forma más o menos redondeada, su célula presenta un núcleo diferenciado y su tamaño oscila entre 2 a más de 200 μm (Figura 20); siendo por lo tanto un organismo eucariota (p.2).</p>

Nota: Resultado de la identificación microscópica de la cepa 10 OTX-2.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Los resultados obtenidos en la identificación macroscópica, muestran que las cepas 10 OTX-2 y la 11 OTX-2, pertenecen al género *Saccharomyces*. Por lo que se presume su autenticidad, sin embargo de acuerdo con Dulau & Palacios (2010), para conocer a que género pertenece una levadura se deben realizar otras pruebas tales como las microscópicas.

En las tablas 12 y 13 se observa los resultados obtenidos en la identificación microscópica de las levaduras que presentaron características macroscópicas similares a *Saccharomyces*. Estas cepas presentaron características tales como; célula redonda, núcleo diferenciado en el centro y tamaño 109.52 μm de ancho y 96.51 μm de longitud. Estos resultados son corroborados por Carrascosa (s.a), quien describe que la característica principal de la *Saccharomyces* es un núcleo diferenciado así como su tamaño, el cual oscila de 2 a más de 200 μm .


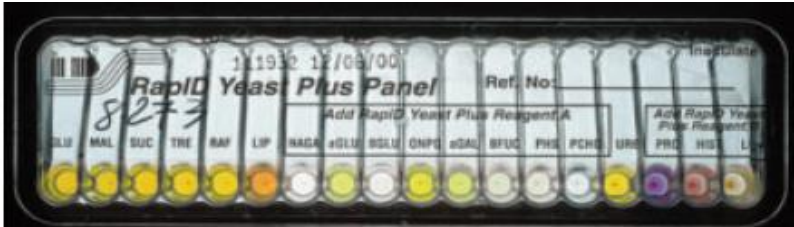

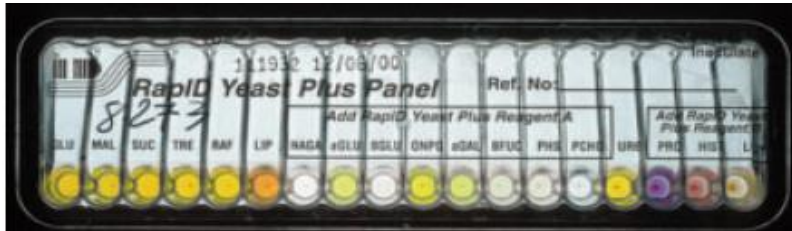
La identificación microscópica, está influenciado por diversos factores, entre el cual está el método con el cual se identifica. De acuerdo con Linares & Solis (2011), para identificar levaduras, existen varios métodos como la tinción, ya que las levaduras suelen comportarse con Gram positivas, sin embargo este método solo señala si es levadura o no (p.4). Por esta razón, el autor señala que el método más eficiente es teñir a las levaduras con lactofenol, ya que actúa como líquido de soporte, agente fijador, tiñe el micelo y las esporas de color azul; para una mejor observación. En las tablas de resultados 16 y 17 se puede observar al indentificación microscópica con lactofenol.

3.4.3. Identificación bioquímica de las levaduras que presentan capacidad fermentativa y resistencia alcohólica

Como resultado de la identificación bioquímica de las cepas 10 OTX-2 y la 11 OTX-2, se confirmó que las mismas pertenece al género *Saccharomyces* con una probabilidad del 80.36% y del 97.41% respectivamente. Así pues la identificación bioquímica corrobora los resultados obtenidos de la identificación morfológica.

Tabla 14.

Identificación Bioquímica de las levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica

Código/foto	Imagen/ Autor
<p>Cepa 10 OTX-2</p>  <p>Figura 21. Prueba Bioquímica de la cepa 10 OTX-2 Elaborado por: (Heredia y Kwok, 2014).</p>	<p>Resultados de la pruebas Remmel</p>  <p>Figura 22. Pruebas estándar positivas para cada pocillos Fuente: (Linares & Solís, 2011, p.15).</p>
<p>Como resultado de la identificación bioquímica usando pruebas RapID Yeast Plus Panel, se muestra la colorimetría de acuerdo a las reacciones de cada pocillo. Al comparar con los colores pruebas se tienen los siguientes códigos: 102102 (10 OTX-2) y 102100 (11 OTX-2).</p>	<p>Resultados mostrados por las pruebas RapID Yeast Plus Colorimetría.</p>
<p>Cepa 11 OTX-2</p>  <p>Figura 23. Prueba Bioquímica de la cepa 11 OTX-2 Elaborado por: (Heredia y Kwok, 2014).</p>	<p>Resultados de la pruebas Remmel</p>  <p>Figura 24. Pruebas estándar positivas para cada pocillos Fuente: (Linares & Solís, 2011, p.15).</p>

Nota: Resultado de la identificación bioquímica de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 15.

Resultados de la identificación bioquímica de levaduras con el software ERIC®.

Reactivo	Códigos de las cepas a identificar					
	10 OTX-2	11 OTX-2	8 CTX-2	15 OTX-2	14 OTX-2	11 CTX-1
Glucosa	+	+	-	+	+	+
Maltosa	+	+	-	+	-	-
Sacarosa	+	+	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	-	-	-	-
Rafinosa	-	+	-	-	-	-
Éster de ácido Graso	-	-	-	+	-	-
p-nitrofenil-N-acetil-β, D-galactosamida	-	-	-	-	-	+
p-nitrofenil-α, D-glucósido	-	-	+	-	-	-
p-nitrofenil-β, D-glucósido	+	+	+	-	+	-
α-nitrofenil-β, D-galactósido	-	-	-	-	-	+
p-nitrofenil, α, D-galactósido	-	-	+	-	-	-
p-nitrofenil-β, D-frucósido	-	-	+	-	-	-
p-nitrofenil fosfato	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil fosforilcolina	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	+
Prolina-β-naftilamida	-	-	+	-	-	+
Histidina β-naftilamida	-	+	-	+	-	+
Leucil-glicina β-naftilamida	-	-	-	+	-	+
IDENTIFICACIÓN SOFTWARE ERIC®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Hasenula uvarum</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>

Nota: Identificación bioquímica con el software de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX.2

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

La tabla 15 muestra como resultado que la cepa 11 OTX-2 reacciona de manera positiva para los pocillos de glucosa, maltosa, sucrosa, trehalosa y rafinosa debido a, que al reaccionar la levadura con el pocillo genera una tonalidad de transparente a amarillo (Ver Figura 22), por otra parte la levadura 10 OTX-2 no reacciona de manera positiva en los pocillos de trehalosa y rafinosa ya que muestra un color morado (Ver Figura 21), por lo que se presume que la cepa 11 OTX-2 tiene mayor posibilidad de pertenecer al género *Saccharomyces*, por su excelente asimilación azúcares. Los resultados son corroborados por Balows, Hauster, & Herrmann (2011), quienes afirman que la asimilación de azúcares dada por un microorganismo genera ácidos, lo que hace que el pH del pocillo descienda e induzca el cambio de color entre transparente y amarillo.

La tabla 15 se puede observar el resultado negativo para el pocillo que contiene urea de las cepas 10 OTX-2 Y 11 OTX-2, por lo que se presume que las mismas pertenecen al género *Saccharomyces*. Estos resultados son corroborados por Cáceres & Reyna (2002), quienes detallan que una de las características distintivas del género *Saccharomyces* es el requerimiento de nitrógeno en forma de amonio para la producción de aminoácidos y la formación de proteínas, cualquier otra forma de nitrógeno no será asimilado por la levadura. Así pues, el pocillo que contiene urea reaccionan de manera negativa, si se trata de levaduras que pertenecen a dicho género, ya que no existe la hidrólisis de este compuesto por ende, formación de productos alcalinos se ve inhibida, haciendo que el pH., no cambie y se produzca un color diferente al indicado como positivo en la prueba.

De acuerdo con Linares & Solis (2011), la prueba bioquímica más eficiente para identificar organismos levaduliformes es la prueba RapID Yeast Plus System, debido a que, contienen panel 18 pocillos; cada uno un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos.

Permite identificar hasta 43 especies de levaduras (p. 16). Al compararlo con las API, este método es más eficiente ya que. las pruebas bioquímica API se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente, lo que nos da una baja en los resultados esperado (p.14).

Según Beckett (2000), detalla que las características de comportamiento del sistema RapID Yeast Plus se han establecido mediante pruebas de laboratorio de 500 cultivos tipo, clínicos y de referencia en Remel, los cuales fueron identificados correctamente 476 (95.2%) de los microorganismos estudiados. Además se comparó un total de 378 aislamientos con el sistema RapID Yeast Plus y con API 20C13, los cuales coincidieron 361 (95.5%) de los aislamientos estudiados.

El sistema RapID Yeast Plus ha sido evaluado por un organismo independiente utilizando 185 aislamientos clínicos de levaduras. Un total de 181 (97.8%) fueron identificados correctamente por el sistema RapID Yeast Plus sin necesidad de pruebas adicionales y 4 aislamientos (2.2%) fueron identificados correctamente después de pruebas adicionales. No se detectó ningún error de identificación (Beckett, 2000, p.6).

3.5. Evaluación de la cinética de crecimiento con los parámetros de pH y temperatura, de las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 16.

Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes pH., de la cepa 10 OTX-2

pH	5.08	5.8	6.2	7.0
Tiempo	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
1	0	0	0	0
2	0.0056	0.0173	0.0355	0.0032
3	0.0144	0.0569	0.0605	0.0114
4	0.0311	0.3359	0.2196	0.0301
5	0.0789	0.5881	0.5268	0.0638
6	0.1169	0.9794	0.8678	0.0936
7	0.2011	1.3803	1.1001	0.1772
8	0.3339	1.6854	1.3001	0.2123
9	0.4071	1.8012	1.5781	0.2678

Nota: Crecimiento de la cepa 10 OTX-2 a diferentes pH

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 17.

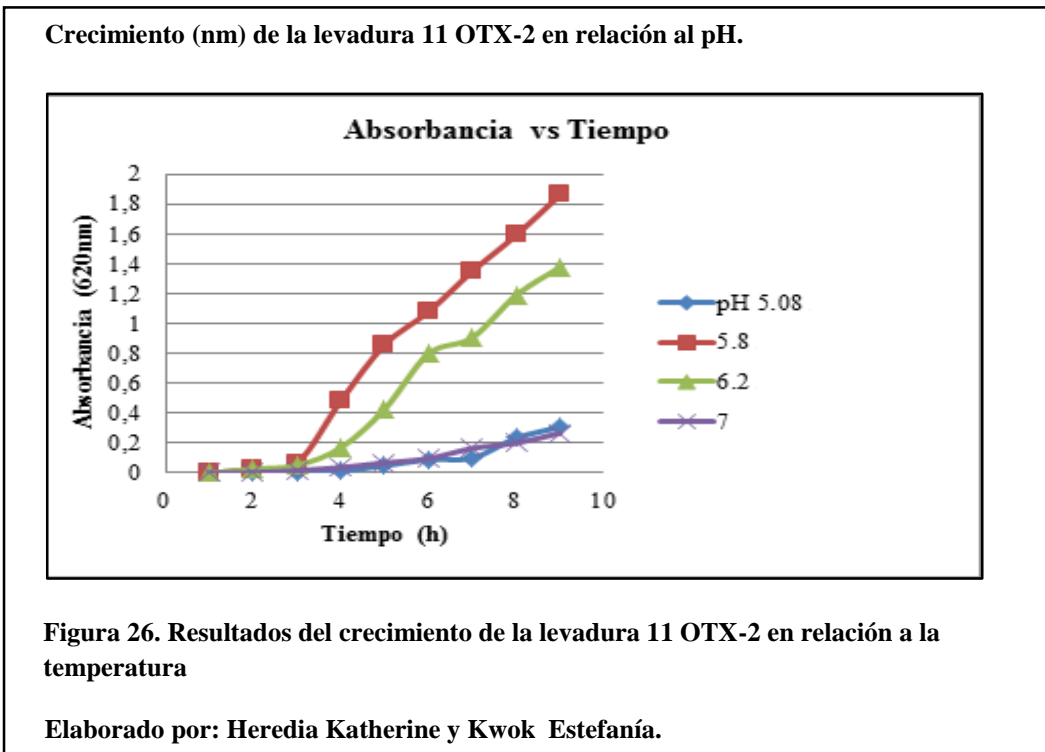
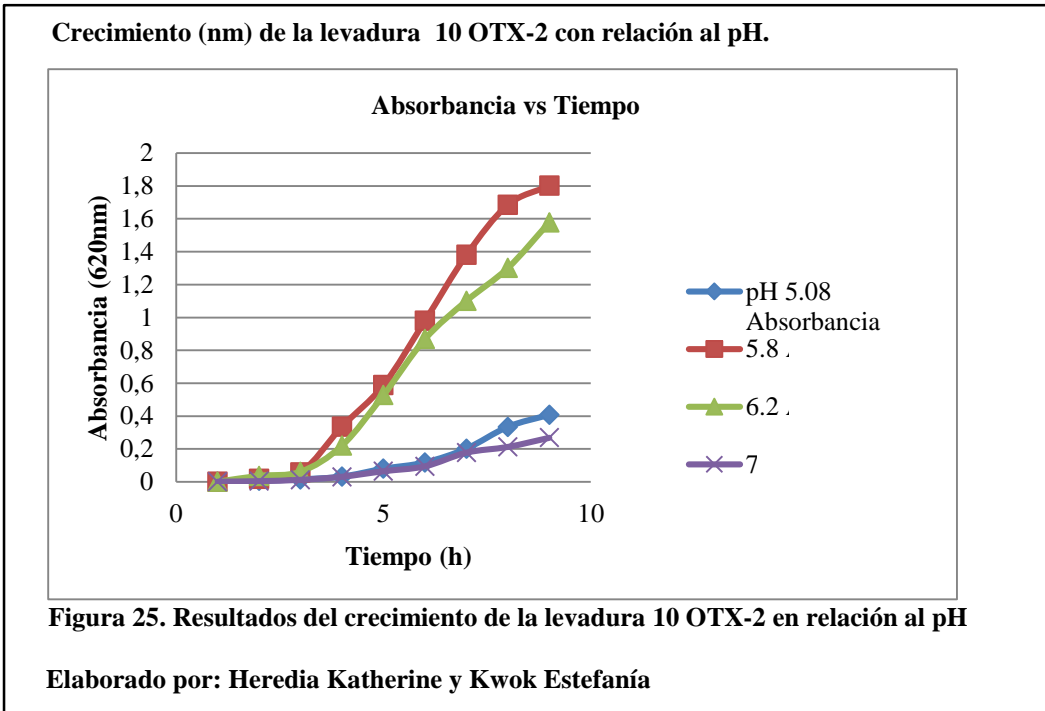
Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes pH., de la cepa 11 OTX-2

pH	5.08	5.8	6.2	7.0
Tiempo	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
1	0	0	0	0
2	0.0046	0.0273	0.0275	0.0031
3	0.0094	0.0678	0.0519	0.0165
4	0.0141	0.4829	0.1696	0.0376
5	0.0489	0.8581	0.4278	0.0691
6	0.0899	1.0794	0.7978	0.0972
7	0.1005	1.3503	0.9061	0.1652
8	0.2339	1.5914	1.1901	0.2003
9	0.3071	1.8612	1.3781	0.2678

Nota: Crecimiento de la cepa 11 OTX-2 a diferentes pH

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Al evaluar la cinética de crecimiento de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, se obtuvo como resultado que el pH óptimo de crecimiento de las mismas es de 5.8 para ambas a comparación de otros pH., debido a que se presentan mayor turbidez conforme transcurre el tiempo; cómo se observan en las figura 25 y 26.



En la Figura 25 y 26, muestra el crecimiento microbiano de las cepas 10 OTX-2 y 11OTX-2, a diferentes pH., donde se puede observar que existe mayor crecimiento a un pH., de 5.8 ya que alcanza una absorbancia de 1.8012 (nm), y 1.8612, a las 96 horas (tiempo 9), después de este intervalo de tiempo la absorbancia se mantiene, es decir entra a la fase estacionaria. Los resultados corroboran con Cáceres & Reyna (2002), los cuales describen que los pH óptimos para el crecimiento de *Saccharomyces*, está entre los 5.8 y 6.3, y que después de cierto intervalo de tiempo, este crecimiento se mantiene, lo que algunos autores le denominan fase estacionaria.

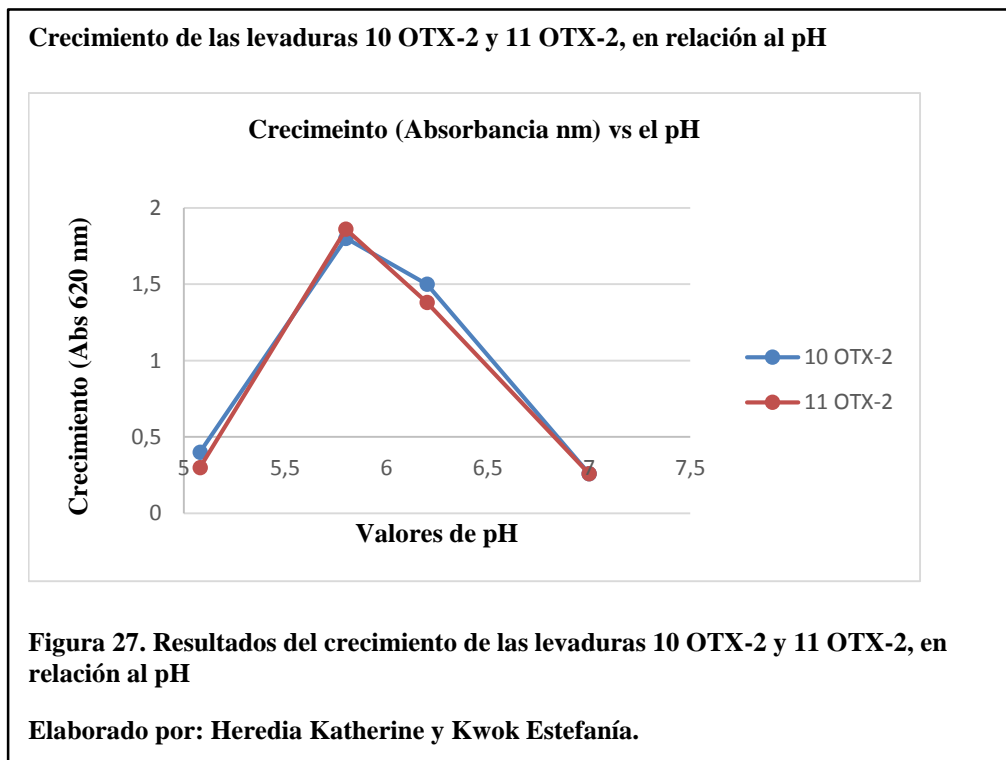
Tabla 18.

Valores máximos de crecimiento alcanzados por las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2 en relación al pH.

Cepa	pH			
	5.08	5.8	6.2	7
10 OTX-2	0.4	1.8	1.5	0.26
11 OTX-2	0.3	1.86	1.38	0.26

Nota: Crecimiento de la cepas 10 OTX-2 y 11 OTX.2 a máximos y mínimos pH

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.



Como se puede observar en la figura 27, ambas cepas presentan el mismo comportamiento en función del pH. Es decir presentan un mayor crecimiento a pH 5.8. Mientras que a pH bajos de este valor su crecimiento se ve inhibido o retardado.

Significa que estas dos cepas son muy sensibles a cambios pequeños de pH, debido a que a pH 5.08 y a pH 6.2 y 7.0, baja drásticamente su crecimiento.

Tabla 19.

Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes temperaturas de la cepa 10 OTX-2.

Temperatura	15°C	25°C	35°C	40°C
Tiempo	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
1	0	0	0	0
2	0.0481	0.0608	0.0336	0.0242
3	0.0966	0.1006	0.0490	0.0367
4	0.1599	0.3803	0.0807	0.0571
5	0.4280	0.6014	0.0859	0.0682
6	0.7441	0.9003	0.0928	0.0932
7	0.9943	1.1201	0.1835	0.1718
8	1.1993	1.3231	0.3714	0.2978
9	1.2501	1.4619	0.5546	0.3678

Nota: Crecimiento de la cepa 10 OTX-2 a diferentes temperaturas.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Tabla 20.

Resultados de la cinética de crecimiento a diferentes temperaturas de la cepa 11 OTX-2

Temperatura	15°C	25°C	35°C	40°C
Tiempo	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
1	0	0	0	0
2	0.0382	0.0708	0.0236	0.0242
3	0.0666	0.1106	0.0339	0.0367
4	0.0939	0.4803	0.0707	0.0571
5	0.3281	0.7014	0.0959	0.0682
6	0.8041	1.1003	0.1128	0.0932
7	1.2943	1.5201	0.1835	0.1718
8	1.4993	1.8231	0.3714	0.2978
9	1.5501	2.0619	0.5546	0.3678

Nota: Crecimiento de la cepa 11 OTX-2 a diferentes temperaturas.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

En las figuras 28 y 29, muestra el crecimiento microbiano de las cepas 10 OTX-2 y 11OTX-2, a diferentes temperaturas, donde se puede observar que existe mayor crecimiento a una temperatura de 25°C, ya que alcanza una absorbancia de 1.4619., y 2,0619 (nm.), a las 96 horas (tiempo 9), después de este intervalo de tiempo la absorbancia se mantiene, es decir entra a la fase estacionaria. Los resultados son corroborados por Cáceres & Reyna (2002), los cuales describen que la temperatura óptima para el crecimiento de *Saccharomyces*, es 25°C, y que después de cierto intervalo de tiempo, este crecimiento se mantiene.

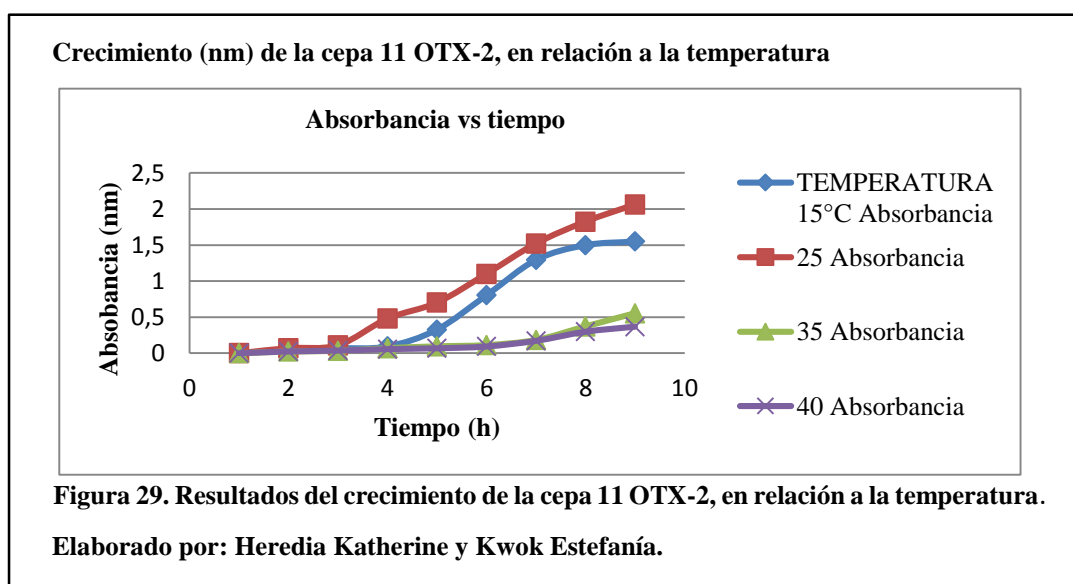
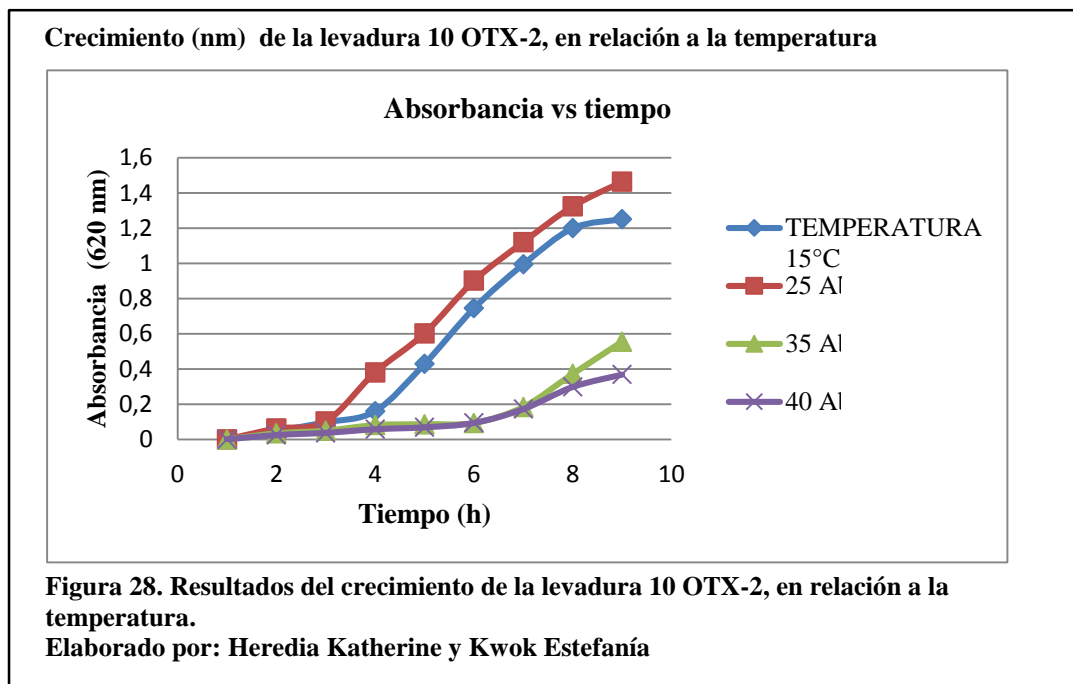


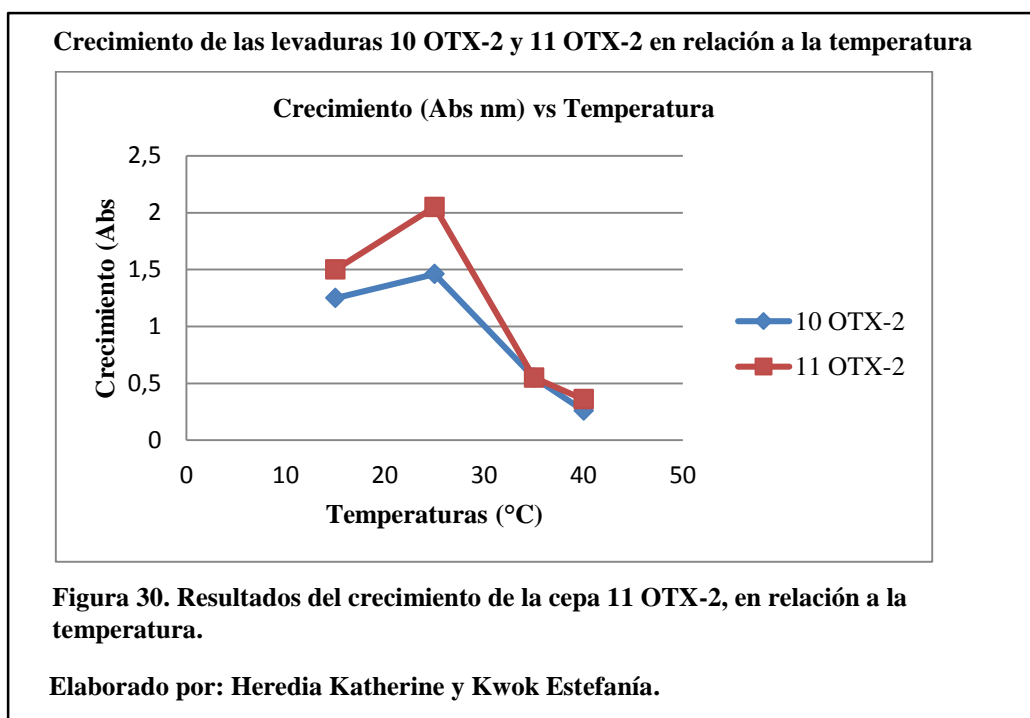
Tabla 21.

Valores máximos de crecimiento (nm) alcanzados por las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, en relación a la temperatura.

Cepa	Temperatura			
	15	25	35	40
10 OTX-2	1,25	1,46	0,55	0,36
11 OTX-2	1,5	2,06	0,55	0,36

Nota: Crecimiento de las cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2 a temperaturas máximas y mínimas.

Fuente: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.



Ambas cepas presentan mejor crecimiento a 25°C, en un descenso con el incremento de la temperatura hasta los 38°C. No obstante, la cepa 11 OTX-2 alcanzó el mayor crecimiento a todas las temperaturas y siendo el valor más elevado el obtenido a 25°C con una absorbancia de 2.05 nm.

Cuando las bacterias están en fase logarítmica de crecimiento o de declinación la representación de la absorbancia frente al tiempo forma una línea casi recta. Si las lecturas de la absorbancia son compatibles con el recuento en la placa del mismo cultivo esta correlación se puede utilizar en estimaciones futuras del número de bacterias obtenidas directamente por turbidimetría.

De acuerdo con Ocoña (2007), para que puedan visualizarse las primeras trazas de turbidez debe haber más de un millón de células por mililitro y se precisan de 10 a 100 millones por mililitro para que la suspensión se vuelva lo bastante turbia como para ser medida en un espectrofotómetro. Por lo tanto la turbidimetría no es un método útil para medir la contaminación de líquidos por un número relativamente pequeño de bacterias (p.2).

CONCLUSIONES

- A partir de los frutos de taxo (*Passiflora mollissima*) muestreados en las parroquias de Calderón y Juan Montalvo (Cayambe), fue posible aislar un total de 23 y 26 cepas puras respectivamente, con características morfológicas diferentes mediante la técnica de aislamiento por estrías.
- En cuanto a la obtención de cultivos puros de levaduras, el método de aislamiento más eficiente de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación es la técnica por estrías a comparación de la técnica por difusión en placa.
- El taxo (*Passiflora mollissima*), constituye un buen hospedero de microorganismos tales como levaduras de los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Kloekera*. No obstante, el género *Saccharomyces*, el principal responsable de la fermentación alcohólica crece en menor proporción, por lo que se concluye que no es factible obtener iniciadores de esta fruta.
- Al realizar las pruebas de resistencia alcohólica, se obtuvo que solo el 29.41% de un total de 49 cepas son resistentes a concentraciones de etanol del 8% (v/v), de las cuales solo dos cepas 10 OTX-2 y 11 OTX-2, pertenecen al género *Saccharomyces*. Por lo cual se concluye que el taxo no posee alta diversidad de levaduras de este género.
- En la selección de las levaduras con características fermentativas el medio lisina permite diferenciar entre especie del género *Saccharomyces* y otros como *Candida* y *Rhodotorula*, por su contenido de nitrógeno en su forma no asimilable para las levaduras del género *Saccharomyces*, lo que impide su desarrollo.
- Al comparar los medios de crecimiento YPD agar y SDA, se concluye que el medio óptimo para la identificación macroscópica en cuanto a características como la elevación, la forma, el contorno y aspecto, es el medio SDA. Ya que, permite una mejor visualización de las cepas, debido a que posee un pH óptimo (6.0) para un desarrollo completo de las cepas.

- Al evaluar diferentes factores en la cinética de crecimiento, se estableció que la temperatura y pH óptimo de crecimiento son de 25°C y 5.8 respectivamente, ya que las levaduras presentaron un buen crecimiento en las condiciones establecidas.
- La espectrofotometría es un método rápido para medir el crecimiento microbiano, sin embargo este permite distinguir entre células viables (vivas) y células no viables (muertas), por lo que es menos confiable, para la determinación de la viabilidad de las levaduras.

RECOMENDACIONES

- En la identificación bioquímica se recomienda utilizar cultivos jóvenes y puros de levaduras, con el fin de obtener resultados confiables en cuanto a la identificación de la especie.
- En busca de más investigaciones a nivel microbiológico y enológico se recomienda utilizar las levaduras aisladas a partir del fruto de taxo en la producción de vino a nivel de laboratorio, con el fin de probar su efectividad para posteriores procesos industriales.
- Al evaluar la cinética del crecimiento microbiano mediante espectrofotometría es recomendable utilizar el blanco y la absorbancia apropiados para cada microorganismo.
- Utilizar el método por conteo de levadura mediante la cámara de Neubauer con el fin de determinar la viabilidad de las levaduras asiladas.
- Realizar investigaciones sobre levaduras con características fermentativas y resistencia alcohólica, capaces de producir vino a nivel industrial, a partir de otras frutas endémicas que presenten características similares a la uva.

LISTA DE REFERENCIAS

- Beckett, T. (2000). Pruebas Bioquímicas RapID Yeast Plus. *Oxoid*.
- Carrascosa, A. (s.a.). El microorganismo que da cuerpo al pan. *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL*.
- Acosta Carretero, C. (2012). Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. *Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería Química y Ambiental*.
- Aguilar, A., & Hernández, D. (2006). *Elaboración a nivel de laboratorio de vino a partir de fruta: manzana, naranja, papaya, pera y sandía*. El Salvador, C.A: Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”.
- Aleixandre, J. (1998). Revista alimentaria. En J. Aleixandre, *Factores que intervienen en la composición de un vino*. Valencia: A.O.C.
- Alvarez, J. (1991). La viña, la vid y el vino. En R. Gabriel, *Temperatura*. México: Trillas.
- Angulo, R. (2003). Frutales exóticos de clima frío. *Bayer CropScience S.A.*
- Barreno Pérez, C. I. (2013). Elaboración y control de calidad de vino de taxo (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.
- Barreno, C. I. (2013). Elaboración y control de calidad de vino de taxo (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.
- Boulton, B., Singleton, V. L., Bisson, F., & Kunkee, R. E. (2002). Flora espontánea de la uva y de la bodega. En *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Buitrago Estrada, J., & Escobar Romero, A. M. (2009). Aplicación de levadura *Candida* sp., con una alternativa variable par la retardacion en la pudrición del banano (*Mussa acuminata*). *Universidad Pontífica Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera en Microbiología Industrial*.

- Cáceres García , J. C., & Reyna López, A. (2002). Modelamiento microbiológico para la levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad de la Sabana, Facultad de ingeniería. Ingeniería en Agroindustria*.
- Claude Flanzy. (2003). Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. En *Levaduras fermentadoras*. Francia: QTK.
- Cyril J, S. (2009). BY2012 Microbiology Gallery of Yeasts. *Microbiology Gallery of Yeasts*.
- De Rosa, T. (1998). Tecnología de vinos blancos . En P. Julian, *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado*. España: 1998.
- Deginani, N. (Septiembre de 1999). Aportes botánicos de Salta - Ser. Flora. *Flora del Valle de Lerma*.
- Dulau, L., & Palacios , A. (2010). *Levaduras seleccionadas para la vinicación en tinto*. Francia: Vinidea France, 15 rue Ozenne, 31000 Toulouse.
- Ercoli, J. C., Díaz, E., Sfreddo, E., Nazrala, E., & Galiotti, J. (Mayo de 2007). Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas, de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. *Enología*.
- Feoli, M., Gómez, Z., & Muñoz, A. (1997). Aislamiento y Caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*.
- Fernández, J. (Julio de 2013). La evolución reciente del sector vitivinícola internacional. *GeoGraphos*.
- Flanzy, C. (2003). Vitaminas y fenómenos fermentativos. En A. López, Gómez, J. Macho, Quevedo, & A. Madrid, *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2 da ed). Madrid, España: Mundi prensa.
- García Garibay, M., Quintero Ramírez , R., & López Munguía Canales, A. (2004). *Bioteología Alimentaria*. México : Limusa.

- García, Quintero, Lopez. (1993). Desarrollo de la fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema conjunto. En R. Gabriel, *Condiciones de la fermentación* (pág. 106). España: Acribia S.A.
- Garzón, S., & Hernández, C. (2009). Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. *Universidad Tecnológica de Pereira*.
- Godoy, A. (Noviembre de 2013). Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-*Saccharomyces*. *IIBCE*.
- Gonzales, T. (Junio de 2012). Microbiología industrial y Biotecnología microbiana.
- González, E., & Bautista, P. (1998). El cultivo de curuba. *Fonaiap Divulga*.
- Hernandez, A. (2006). Microbiología Industrial. *Procesos Biotecnológicos*.
- Idígoras, J. (2011). Curso sobre vino. 68.
- Landa, D. (2012). Diagnóstico situacional del taxo (*Passiflora mollissima*) en la provincia de Tungurahua. (U. T. Ambato, Ed.)
- Laurent, D., & Palacios, A. (2001). Levaduras seleccionadas para la vinificación en tinto. En e. Escot, *Estabilización del color*. Francia: Toulouse.
- Linares, S., & Solis, C. (2011). Identificación de las levaduras. *Iberoamericana de Microbiología*.
- Medina, C., Sánchez, M., & et. al. (1999). Algunas consideraciones sobre la tolerancia alcohólica en levaduras. *Revista avanzada científica: IDICT*.
- Memenza, M. E. (2009). *Control biológico in vitro de Botrytis cinerea (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (Vitis vinifera)*. Lima, Perú.
- Moreno, Arribas, & M.V. (2005). Winemarking Bichemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. En A. Juan, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Madrid: Facultad de Ciencias.

- Moreno, E. (Julio de 2007). El mercado del vino en Ecuador. (O. e. Quito, Ed.) ICEX, 34.
- Narrea Cango, M., & Malpartida Zevallo, J. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas de hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. *Entomologia*.
- Owen, W. (1991). Biotecnología de la fermentación. *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000*.
- Paréz, R., & Juárez, A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Barcelona, España: Reverté S.A.
- Ponce, J. (2009). Estudio, análisis y propuesta gastronómica del taxo (*Passiflora mollissima*). (U. T. Equinoccia, Ed.)
- Prescott. (2009). La Curva de crecimiento. En J. Willey, L. Sherwood, & C. Woolverton, *Microbiología de Prescott, Harley y Klein* (Séptima ed., págs. 123-125). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Pro-Chile. (2011). *Estudios de mercado de vino para el mercado de Ecuador*. Guayaquil: pro-Chile.
- Regodón, J. A. (2007). Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de Levaduras para la Elaboración Estandarizada de Vinos de Calidad. *Universidad de Extremadura*.
- Reina, C. (1995). Manejo postcosecha y evaluación de la calidad de curuba (*Passiflora mollissima*) que se comercializa en la ciudad de Neiva. *Programa de Ingeniería Agrícola*.
- Rojano, B. A., & Zapata, K. (10 de Junio de 2012). Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (curuba). *Universidad Nacional de Colombia*.
- Salcedo, M. E. (2008). Aislamiento y selección de Levaduras Fermentadoras de Melaza de Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de biología*.

- Sepúlveda, A. (2009). *Características de vinos tintos Pinot Noir, producidos con cepas autóctonas de Saccharomyces cerevisiae aisladas del valle del Maule*. Chile: Universidad de Chile.
- UAM. (2007). Péptidos provenientes de las levaduras. En A. Juan, *La fracción nitrogenada del vino péptidos bioactivos*. Madrid, España: Facultad de Ciencias.
- UNC, U. N. (2009). *Fermentación alcohólica*. Cuyo: Universidad Nacional del Cuyo.
- Unisabana. (1991). Desarrollo de la fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo. En O. Ward, *Biología de la fermentación*. Bogota : Universidad de la Sabana.
- Uribe, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. *Pontificia Universida Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial*.
- UTA. (2007). Los vinos de frutas. “*Elaboración de Vinos de frutas*”. Ambato, Tungurahua, Ecuador .
- UTP. (2009). Resistencia alcohólica. En S. Garzón , & C. Hernández, *Estudio comparativo de la producción de etanol entre Saccharomyces serevisiae silvestre y Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. PEREIRA : Escuela tecnológica química .
- Villacrés, G., Martínez, G., & Pozo, C. (2006). *Aislamiento, selección y adaptación de cultivos iniciadores locales (Saccharomyces), para la producción de vino blanco. Informe de Microbiologia de Alimentos. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmaci*. Quito- Ecuador.
- Villar, A. (1992). Sensibilidad a etanol en levaduras: Bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación. *Universidad Complutense de Madrid*.

GLOSARIO

Aminas biógenas: Son compuestos formados por la transformación de los aminoácidos que se encuentran en los alimentos por la acción de enzimas generadas por microorganismos

Artroconidias: Conidias tálicas, que resultan de la fragmentación o lisis de una hifa vegetativa, se separa por tabicamiento

Ascas: Célula sexual productora de esporas de los hongos ascomicetos.

Blastoconidia: Conidio que se produce por gemación, como en las levaduras.

Clamidospora: Es un tipo de espora de paredes gruesas de varias clases de los hongos. Son el resultado de la reproducción asexual mediante los conidios llamados clamidoconidios.

Descarboxilación: Reacción química en la cual un grupo carboxilo es eliminado de un compuesto en forma de dióxido de carbono (CO_2).

Fermentación maloláctica: Es el proceso por el cual el ácido málico (presente en la pulpa de muchas frutas) se transforma químicamente en ácido láctico; por medio de bacterias de origen láctico existentes de forma natural en el entorno, o en el interior de la fruta misma.

Hifas: Son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio.

Metabolismo heterofermentativo: Se lleva a cabo mediante la vía del 6-fosfogluconato y origina por cada mol de hexosa consumida, un mol de CO_2 , un mol de etanol (o ácido acético) y un mol de ácido láctico.

Micelio: Es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Transaminación: Reacción entre un aminoácido y un alfa-cetoácido.

Tubo germinal: Es una extensión filamentososa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre.

YPD: Yeast Extract Peptone Dextrose.

SDA: Sabouroad Dextrose Agar.

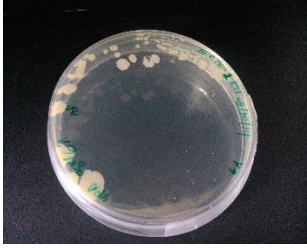

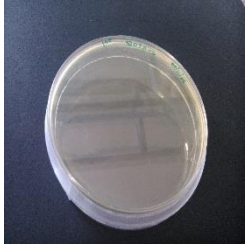

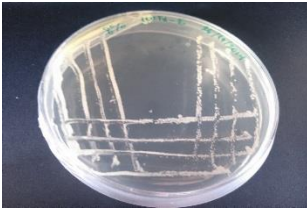
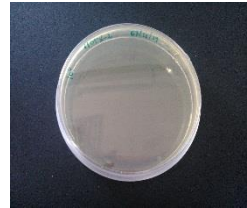
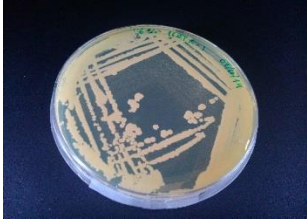

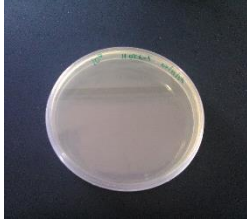



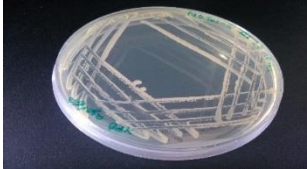
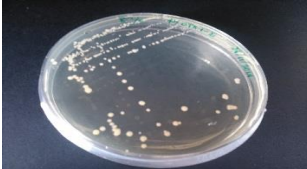
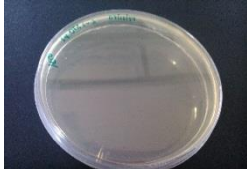
ANEXOS

Anexo 1. Preparación y dispensación de medios de cultivo.




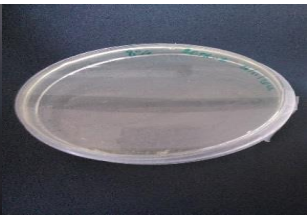
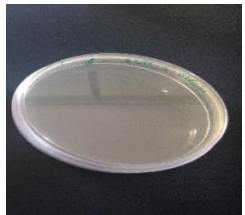
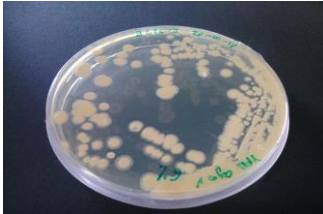
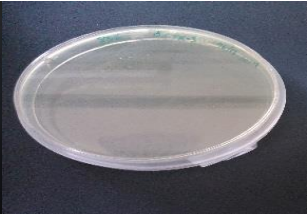
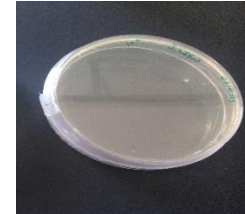
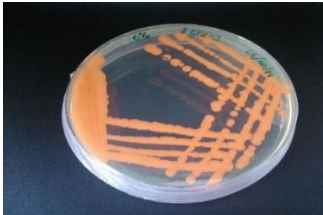
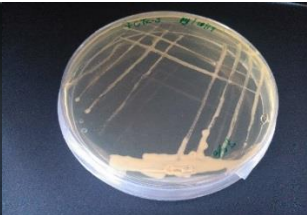
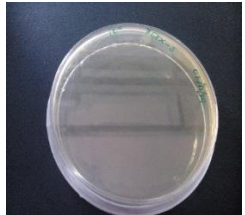

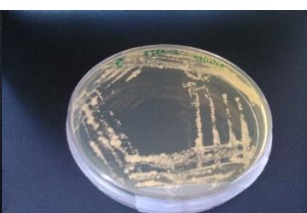
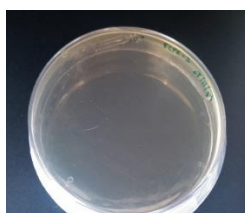

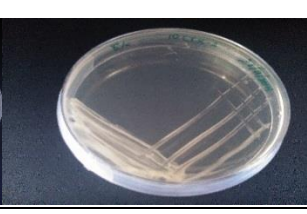
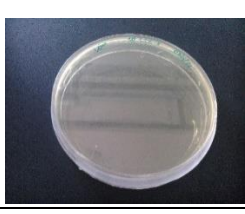
Elaborado por: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Anexo 2. Resistencia alcohólica de cepas aisladas de frutos del cantón Cayambe

Código	Concentración de etanol		
	6%	8%	10%
10 OTX-2 <i>Saccharomyces</i>			
11 OTX-2 <i>Saccharomyces</i>			
11 OTX-1			
14 OTX1-1			
14OTX1-2			

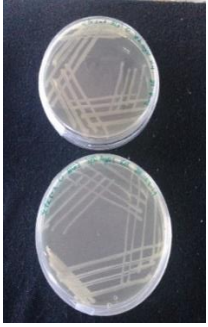
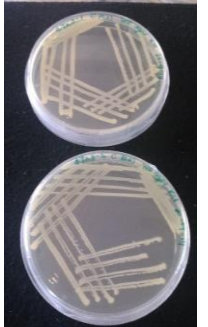
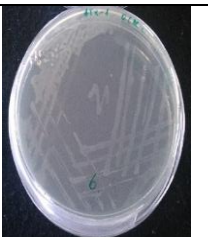


Elaborado por: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.


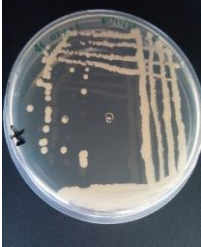



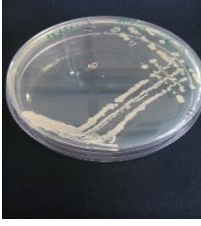
Anexo 3. Resistencia alcohólica de cepas aisladas de frutos de la parroquia Calderón.

Código	Concentración de etanol		
	6%	8%	10%
2 CTX-2			
3 CTX-3			
7 CTX-3			
8 CTX-2			
10 CTX-2			

Elaborado por: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.

Anexo 4. Identificación macroscópica de cepas aisladas de frutos del cantón Cayambe.

Código	Color	Tamaño	Forma	Aspecto	Características del contorno	Foto
2 OTX1-1 2 OTX1-2	Blanco	Pequeña	Alargada	Lisa y plana	Borde Irregular	
4 OTX3-1 4 OTX3-2	Amarillo	Pequeña	Ovoide	Lisa y plana	Borde Regular y transparente	
6 OTX-1 6 OTX-4	Blanco	Pequeña	Alargada	Lisa y plana	Borde Regular	
8 OTX-1	Amarillo fuerte	Mediano	Alargado	Rugosa y con volumen	Centro oscuro y borde irregular	
8 OTX-2 13 OTX-3	Amarillo	Mediano	Alargado	Lisa y con volumen	Centro oscuro y borde irregular	

10 OTX-1 10 OTX-2 10 OTX-3	Crema con un centro de color amarillo	Pequeña	Esférica	Lisa y plana	Borde Regular	
11 OTX-1 11 OTX-2	Crema con un centro de color amarillo	Mediana	Esférica	Lisa y plana	Borde Regular	 
12OTX1-1 12OTX1-2 13OTX1-2 15OTX-2	Blanco	Pequeña	Ovoide	Liso y plana	Borde Regular	 
13OTX1-1 14OTX1-1 14OTX1-2	Blanco	Pequeña	Ovoide	Liso y con volumen	Borde Regular	

Elaborado por: Heredia Katherine y Kwok Estefanía.