



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

“IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE UNA ESPECIE DE LEVADURA, PRESENTE EN EL FRUTO DE JOYAPA (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.), CON LAS MEJORES CARACTERÍSTICAS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.”

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: GUISELLA DE LOS ÁNGELES RIVERA YUNGA

TUTOR: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2022

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Guissella de los Ángeles Rivera Yunga con documento de identificación N° 1105646374, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Guissella de los Ángeles Rivera Yunga

1105646374

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Guissella de los Ángeles Rivera Yunga con documento de identificación N° 1105646374, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo Experimental: “Identificación taxonómica de una especie de levadura, presente en el fruto de Joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.), con las mejores características para la fermentación alcohólica.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Guissella de los Ángeles Rivera Yunga

1105646374

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Myriam Ximena Mancheno Cárdenas con documento de identificación N° 0602018160, docente de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE UNA ESPECIE DE LEVADURA, PRESENTE EN EL FRUTO DE JOYAPA (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.), CON LAS MEJORES CARACTERÍSTICAS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.”, realizado por Guissella de los Ángeles Rivera Yunga con documento de identificación N° 1105646374, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas, Mgr.

0602018160

Agradecimientos

Agradezco a Dios que con su bendición siempre he podido seguir a pesar de los momentos de dificultad y debilidad y a mi familia por estar presente.

Quiero expresar un profundo y sincero agradecimiento a los docentes y a la Universidad Politécnica Salesiana por la oportunidad de adquirir conocimientos y experiencias que aportan tanto a mi formación profesional como personal; de manera especial a la Dra. Myriam Mancheno que con sus valiosos conocimientos, paciencia y apoyo incondicional me ha guiado y acompañado durante este tiempo.

Dedicatoria

El presente trabajo dedico:

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio, gracias a ustedes he logrado cumplir mis objetivos. De manera especial a mi padre que es mi ejemplo y principal apoyo.

A mi hermano, mi oruguita, por estar siempre presente, acompañándome y alegrándome en los momentos tristes.

A Joy y Curtis Hofmann, por su acogida e incentivos constantes en la cervecería artesanal Sol del Venado.

A todos mis amigos por los momentos y conocimientos compartidos.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	II
Índice de tablas	V
Índice de figuras.....	VI
Índice de Anexos.....	VII
Resumen.....	VIII
Palabras clave:	VIII
Abstract.....	IX
Key words:	IX
Capítulo 1.....	1
Antecedentes	1
1.1 Introducción	1
1.2 Problema de Investigación.....	2
1.2.1. Planteamiento del Problema	2
1.2.2 Pregunta de investigación	3
1.2.3 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis	5
Capítulo 2.....	6
Marco Teórico.....	6
2.1 Fermentación alcohólica	6
2.2 Bebidas fermentadas	8
2.3 Industria cervecera	8
2.3.1 Clases de cerveza	10
2.3.1.1 Cerveza de baja fermentación.....	10
2.3.1.2 Cerveza de alta fermentación.....	10
2.3.1.3 Cervezas de fermentación espontanea.	10
2.3.2 Elaboración de la cerveza	11
2.3.2.1 Germinación.....	11

2.3.2.2 Secado y tostado	11
2.3.2.3 Molienda	11
2.3.2.4 Maceración.....	11
2.3.2.5 Cocción	11
2.3.2.6 Fermentación.....	12
2.3.2.7 Terminación	12
2.4 Levaduras	13
2.4.1 Clasificación de las levaduras	14
2.4.2 Morfología de las levaduras	14
2.4.2.1 Composición química de una célula de levadura.....	15
2.4.3 Resistencia alcohólica y capacidad fermentativa.....	16
2.4.3.1 Prueba de fermentación de azúcares	17
2.4.3.2 Determinación de la viabilidad celular	17
2.5 Aislamiento de levaduras	18
2.5.1 Fuentes naturales de aislamiento de levaduras	18
2.5.2 Cultivos puros	18
2.5.3 Técnicas de inoculación en placa.....	18
2.5.4 Medio de Cultivo para aislamiento de levadura	19
2.6 Biodiversidad en Ecuador	20
2.7 Joyapa o uva camarona (<i>Macleania rupestris</i> (Kunth) A.C. Sm.).....	21
2.7.1 Taxonomía de <i>M. rupestris</i> (Kunth) A.C. Sm.....	21
2.7.2 Composición nutricional de <i>Macleania rupestris</i> (Kunth) A.C. Sm.	22
2.8 Secuenciación genética	22
2.8.1 Secuenciación NGS	22
2.8.2 Amplicón para Filogenética.....	23
Capítulo 3.....	24
Marco Metodológico.....	24
3.1 Nivel de investigación.....	24
3.2 Diseño de investigación	24
3.3 Ubicación	24
3.4 Población y muestra	25
3.4.1 Población.....	25

3.4.2 Muestra	25
3.5 Variables	25
3.5.1 Variables Independientes	25
3.5.2 Variable Dependientes	25
3.5.3 Variables controladas.....	26
3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	26
3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de resultados	26
3.8 Equipos, reactivos y materiales.....	26
3.9 Procedimiento	27
3.9.1 Fase 1: Obtención de la muestra de frutos.	27
3.9.2 Fase 2: Aislamiento de las levaduras.	28
3.9.3 Evaluación macro y microscópica para identificar levaduras.....	28
3.9.4 Prueba de fermentación de la maltosa.	29
3.9.5 Evaluación de la resistencia al etanol a diferentes concentraciones y viabilidad de las levaduras.	29
3.9.6 Secuenciación de las muestras seleccionadas.	31
Capítulo 4.....	32
Resultados y discusión.....	32
4.1 Aislamiento de levaduras, codificación y evaluación microscópica	32
4.2 Prueba de fermentación.....	34
4.3 Viabilidad respecto a la resistencia al etanol	35
4.4 Secuenciación	49
Capítulo 5.....	51
Conclusiones y recomendaciones	51
5.1 Conclusiones.....	51
5.2 Recomendaciones	53
Referencias bibliográficas.....	54
Anexos	59

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las levaduras por su actividad y aplicación.....	14
Tabla 2. Composición química de la célula de levadura.	15
Tabla 3. Composición nutricional del medio de cultivo YPD agar	20
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>M. rupestris</i>	21
Tabla 5. Contenido de los elementos en 100 g de pulpa del fruto de <i>M. rupestris</i>	22
Tabla 6. Reactivos, materiales y equipos utilizados.	26
Tabla 7. Resultado de crecimiento de microorganismos en los frascos.	32
Tabla 8. Observación de la resiembra de colonias.....	33
Tabla 9. Apariencia de las células vistas al microscopio.....	34
Tabla 10. Resultados de las pruebas de fermentación.	35
Tabla 11. Resultados del porcentaje de viabilidad.....	36
Tabla 12. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 0% de etanol.	37
Tabla 13. ANOVA para la viabilidad con 0% de etanol.....	38
Tabla 14. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 3% de etanol.	39
Tabla 15. ANOVA para la viabilidad con 3% de etanol.....	40
Tabla 16. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 6% de etanol.	41
Tabla 17. ANOVA para la viabilidad con 6% de etanol.....	42
Tabla 18. Resultados prueba de Tukey de la viabilidad a las 48 horas y 6% de etanol.....	43
Tabla 19. Subconjuntos de la prueba Tukey a las 48 horas y 6% de etanol.	44
Tabla 20. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 9% de etanol.	44
Tabla 21. ANOVA para la viabilidad con 9% de etanol.....	45
Tabla 22. Resultados prueba de Tukey de la viabilidad a las 48 horas y 9% de etanol.....	46
Tabla 23. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 48 horas y 9% de etanol.	47
Tabla 24. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 72 horas y 9% de etanol.	48
Tabla 25. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 96 horas y 9% de etanol.	48
Tabla 26. Taxones más representativos a nivel de especie.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura.....	7
Figura 2. Proceso de elaboración de la cerveza.	12
Figura 3. Técnicas de inoculación en placa.	19

Índice de Anexos

Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo.....	59
Anexo 2. Disolviendo agar YPD.	59
Anexo 3. Frutos maduros y picados de <i>M. rupestris</i>	60
Anexo 4. Agar YPD colocado en las cajas Petri para la resiembra de colonias.....	60
Anexo 5. Caja Petri.....	61
Anexo 6. Caja Petri.....	61
Anexo 7. Caja Petri.....	62
Anexo 8. Porta objetos con las muestras.	62
Anexo 9. Observación en el microscopio.	63
Anexo 10. Observación en el microscopio.	63
Anexo 11. Materiales para la aplicación de gentamicina.	64
Anexo 12. Gentamicina.	64
Anexo 13. Caja Petri.....	65
Anexo 14. Prueba de fermentación con campana de Durham.....	65
Anexo 15. Caja Petri con 9% de etanol.	66
Anexo 16. Caja Petri con 9% de etanol.	66
Anexo 17. Cámara de Neubauer.....	67
Anexo 18. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 1.....	68
Anexo 19. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 2.....	69
Anexo 20. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 3.....	70

Resumen

El trabajo experimental se realizó con la finalidad de identificar taxonómicamente una especie de levadura, presente en el fruto de joyapa (*Macleania rupestris* (kunth) a.c. sm.), con las mejores características para la fermentación alcohólica.

Se inicia con la recolección de los frutos maduros y dejar en frascos con medio agar YPD durante 72 horas a 36 °C para generar el crecimiento de los microorganismos, luego mediante la técnica de estriado en placas se separa en cajas Petri las colonias con diferente aspecto en cuanto a color y forma; se evaluó la morfología de las células para aplicar gentamicina al 10% en aquellos cultivos en los que se evidenció crecimiento bacteriano para evitar el crecimiento de este tipo de microorganismos, tras el aislamiento de las colonias se evaluó la capacidad fermentativa mediante la prueba de la campana de Durham y posteriormente se pasó a la evaluación de la resistencia al etanol empleando diferentes concentraciones, 0%, 3%, 6% y 9%; manteniendo un pH controlado de 4,2 y 36 °C.

Con el análisis estadístico de los resultados se seleccionó tres cultivos que presentan una mejor tolerancia al etanol, se preservaron en una disolución de glicerol al 30% a -30 °C y se enviaron a secuenciar en “BioSequence” empleando la técnica de Secuenciación NGS Amp ITSA1, 20000R, ITS86F-ITS4, para amplicón para filogenética de hongos y levaduras. Finalmente, los resultados recibidos se analizaron e interpretaron; dando como resultado que las levaduras aisladas de fruto maduro de *M. rupestris* son *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras clave:

Levaduras, fermentación, tolerancia alcohólica, *Macleania rupestris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Experimental work aimed to taxonomically identifying a yeast species, present in the fruit of joyapa (*Macleania rupestris* (kunth) a.c. sm.), with the best characteristics for alcoholic fermentation.

It begins with the collection of ripe fruits, leaving them in flasks with YPD agar medium for 72 hours at 36 °C to generate the growth of microorganisms, then through the streaking in plates method, the colonies with different appearance, in terms of color and shape, are separated in Petri dishes; the morphology of the cells was evaluated to apply 10% gentamicin in those cultures in which bacterial growth was evidenced to prevent the growth of this type of microorganisms. After isolation of the colonies, the fermentative capacity was evaluated employing the Durham bell test, and later the evaluation of the resistance to ethanol was made using different concentrations, 0%, 3%, 6% and 9%; maintaining a controlled pH of 4,2 and 36 °C.

With the statistical analysis of the results, three cultures that have a better tolerance to ethanol were selected, preserved in a 30% glycerol solution at -30 °C and sent to be sequenced in "BioSequence" using the NGS Amp ITSA1, 20000R, ITS86F-ITS4 sequencing technique, for amplicon for phylogenetics of fungi and yeast. Finally, the results were analyzed and interpreted; giving the result that the yeasts isolated from the mature fruit of *M. rupestris* are *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words:

Yeast, fermentation, alcohol tolerance, *Macleania rupestris* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Introducción

La biotecnología emplea directamente la capacidad microbiana con la finalidad de ayudar a optimizar o mejorar en el área de producción, dentro de estos, la fermentación alcohólica es uno de los principales procesos de transformación que se realizan en la biotecnología tradicional, donde se utiliza comúnmente *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que transforma los carbohidratos en etanol en condiciones anaerobias, además se encuentra presente en varias frutas, como la uva, pero la fermentación espontánea no es resultado de una única cepa de levadura, sino de varias cepas.

La cerveza es una bebida antigua que se originó en la cultura mediterránea clásica, vinculada desde la antigüedad a fines terapéuticos, que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica de un mosto que puede ser elaborado a partir de diversos cereales como la cebada germinada (malta) sola o en mezcla con otros cereales, sustancias amiláceas, lúpulo, levadura y agua potable, donde la levadura juega un papel fundamental en la elaboración de la cerveza, esto se debe a que la misma es la responsable de transformar los azúcares provenientes de la malta en alcohol (Calvillo, 2017).

Ecuador al ser un país megadiverso, cuenta con recursos endémicos y nativos que se emplean dentro de los procesos industriales para la generación de productos y servicios para el ser humano. Además, muchas de estas especies endémicas y/o nativas han sido poco estudiadas; la joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm), es una Ericaceae, la cual presenta frutos que se

caracterizan por su contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos, los mismos que son una fuente necesaria y esencial en el desarrollo de ciertos microorganismos como el caso de las levaduras.

Dentro de las diversas especies de la familia Ericaceae, la *M. rupestris*, se da propiamente en zonas andinas, además las comunidades andinas la consumen por su sabor dulce tanto de forma fresca como elaborada “mermeladas, jaleas, jugos, licor, entre otros”(Caiza Caizalitin, 2022, p. 19). El proceso de fermentación se presenta para la obtención de algunos productos, por lo que se ven implicados microorganismos propios del fruto maduro para llevar a cabo esta transformación.

1.2 Problema de Investigación

1.2.1. Planteamiento del Problema

La elaboración de bebidas alcohólicas como la chicha en Ecuador es una de las actividades más antiguas realizada por los habitantes con fines de consumo ceremoniales dentro de la historia, por esto se ha convertido en parte de la tradición; sin embargo, en el país aún existen pocos estudios sobre identificación y caracterización de cepas de levaduras, la Colección de Levaduras Quito Católica es un ejemplo de un cepario de levaduras de los pocos que existen en el territorio.

Esta tradición del consumo de bebidas fermentadas ha ido evolucionando con la sociedad, actualmente se ingieren bebidas como cerveza y vino en sus diferentes variedades en eventos sociales, de acuerdo con la OMS (2014), respecto al consumo de bebidas alcohólicas, en Ecuador la ingesta de cerveza representa el 67%, los licores un 32% y el vino el 1%. Así mismo para el año 2018, la OMS asegura que, en Ecuador, el consumo total de alcohol por persona es de 7,2 litros, de los cuales la mayoría son en forma de cerveza, ya que se da en diferentes ocasiones como reuniones familiares, durante un partido de fútbol y las fiestas tradicionales (Cajas *et al.*, 2021).

Para el año 2021 en Ecuador se elaboran cerca de 250 marcas de cerveza artesanal, “ese número es un 20% más alto que el número de marcas de cerveza artesanal que existían antes de la pandemia” (Coba, 2021, p. 1). Pero los productores ecuatorianos se han visto obligados a importar mostos y levaduras aptas para la elaboración de bebidas fermentadas, esto debido al desconocimiento de las levaduras específicas que se aplican en la fermentación (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

La obtención de la materia prima genera un problema, dado que, implica un incremento en los costos de producción; especialmente la adquisición de la levadura, esto se debe a que, no se elabora en el país y se vuelve necesario importar estos microorganismos. Dado esto, se vuelve imprescindible y preciso que la industria apunte a la investigación y producción de sus propios fermentos con el fin de reducir los costos y tener un impacto positivo en la economía del país, además se debe tomar en cuenta que la industria de la cerveza artesanal se encuentra en pleno crecimiento en los últimos años.

1.2.2 Pregunta de investigación

¿Existe una especie de levadura con buena resistencia alcohólica en el fruto maduro de Joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm)?

1.2.3 Justificación

“La biotecnología es una ciencia aplicada que utiliza organismos vivos y sus procesos bioquímicos con la finalidad de obtener, crear o modificar productos para usos específicos”(Renneberg, 2019, p. 302). Esta ciencia permite la utilización integral de la bioquímica, microbiología y la ingeniería, en procesos industriales en donde se aprovechan las capacidades metabólicas de los microorganismos para cambiar la matriz productiva.

La industria de producción de bebidas por fermentación como cerveza y vino, emplean microorganismos para que se dé la transformación de la materia prima, las levaduras se utilizan, en la actualidad se comercializan en forma liofilizada. Como ha crecido continuamente el mercado de la cerveza artesanal se ve aumentado el interés y las exigencias de los consumidores, lo que lleva a la producción de cervezas diferenciales e innovadoras. “En este punto, las levaduras no convencionales han cobrado gran protagonismo como herramientas para el desarrollo de nuevos productos”(Burini *et al.*, 2021, p. 1). La producción de levaduras en Ecuador apoyaría directamente a la reducción en los costos de producción de las pequeñas empresas.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar taxonómicamente una especie de levadura, presente en el fruto de Joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.), con las mejores características para la fermentación alcohólica.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar un cultivo de los microorganismos presentes en la especie nativa *M. rupestris* (Kunth) A.C. Sm., mediante muestreo de frutos maduros en el cantón Loja, aplicando la técnica de la siembra directa para la posterior obtención de cultivos puros.
- Evaluar los cultivos puros de levadura, mediante el empleo de técnicas de laboratorio para la selección de la especie con la mejor resistencia al etanol.
- Identificar la taxonomía de la levadura mediante técnicas de secuenciación genética para verificación de su identidad.

1.4 Hipótesis

Se identifica taxonómicamente una levadura, presente en el fruto de Joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm. s), con buenas características para la fermentación alcohólica.

Capítulo 2

Marco Teórico

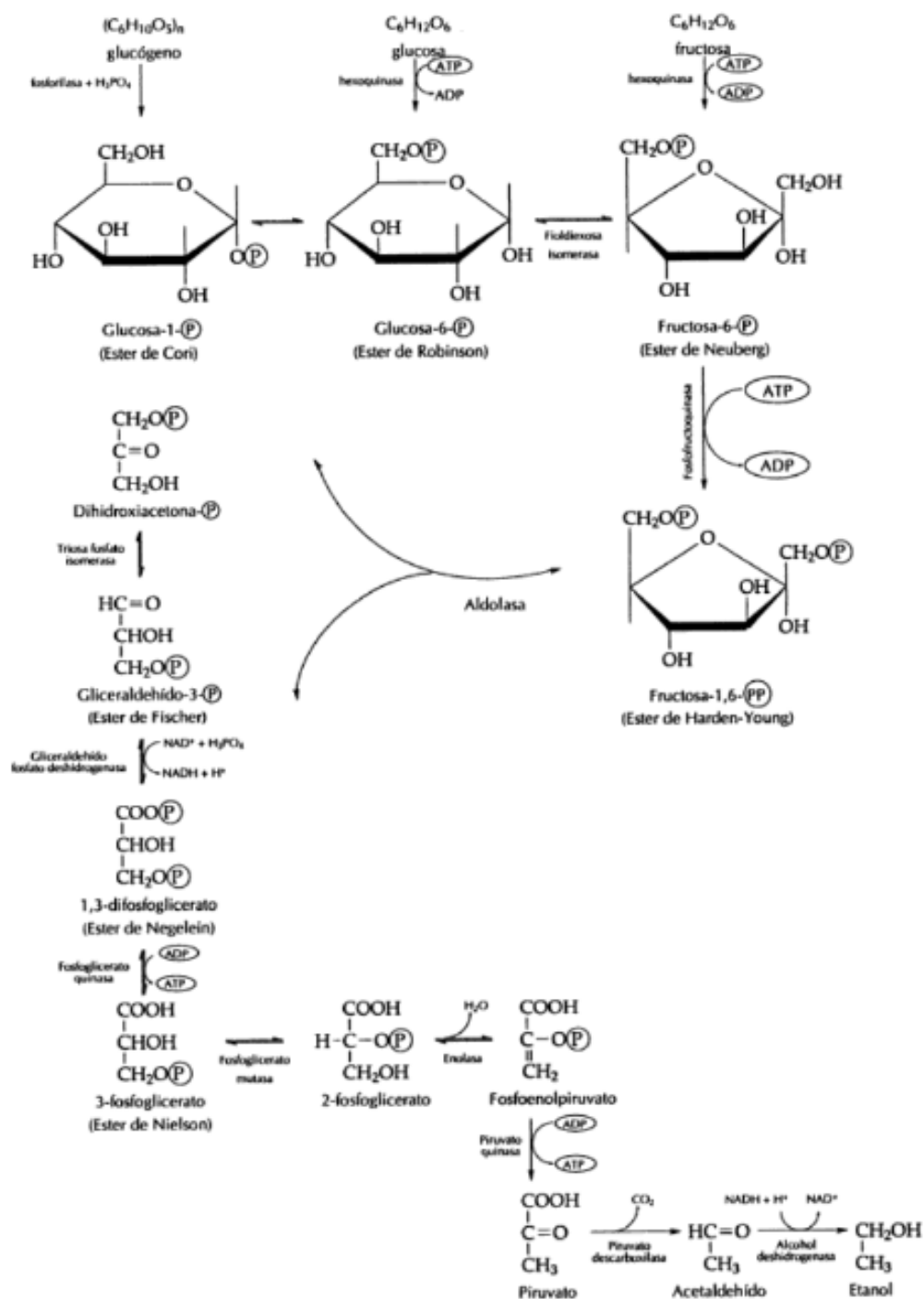
2.1 Fermentación alcohólica

Este proceso biológico consiste en que los microorganismos transforman anaeróbicamente los glúcidos como la glucosa y la fructuosa en etanol, dióxido de carbono y energía, adicionalmente se generan otros subproductos (López de la Maza *et al.*, 2019). Por lo que se emplea para fabricar bebidas alcohólicas como cerveza, vino, sidra, cava, sake, entre otras (Leon y Jaimes Portilla, 2018).

En la fermentación alcohólica, la mayor parte de los azúcares se emplean para la creación de bioenergía, de esta forma se obtienen subproductos como el glicerol, ácidos orgánicos, ésteres y alcoholes superiores, conforme va avanzando el metabolismo fermentativo del mosto, de igual manera el grado de alcohol va a ir aumentando lentamente, hasta llegar a un punto donde se vuelve tóxico para las levaduras y se detiene el proceso fermentativo (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015).

En una primera etapa, las levaduras van a consumir todo el oxígeno disponible, obteniendo un ambiente sin presencia de oxígeno, lo que lleva a que se active el metabolismo anaeróbico y la transformación de los azúcares en alcoholes (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015).

Figura 1. Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura



Nota: Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura. Tomada de

(Parés y Juárez, 1997, p. 46)

2.2 Bebidas fermentadas

La producción de bebidas fermentadas se ha dado en todo el mundo y por miles de años como menciona (Kurtzman *et al.*, 2011). Los humanos han empleado las levaduras desde el Neolítico en China, Irán y Egipto para la producción de bebidas fermentadas. “Las características únicas que las diferencian están determinadas por los productos de fermentación generados por la diversidad de microorganismos presentes en estas, los principales: las levaduras.”(Simbaña y Carvajal, 2019, p. 3). Por esto se considera a la domesticación de las levaduras como un evento clave en la historia humana.

En el proceso de fermentación de bebidas alcohólicas, el microorganismo más empleado es *Saccharomyces cerevisiae*, pero en este proceso se ven involucrados otros géneros de levaduras (Acevedo Casas *et al.*, 2015). Las levaduras en esta transformación de los azúcares generan cerca de 300 compuestos secundarios volátiles y no volátiles, los mismos van a depender de acuerdo con la cepa empleada (Simbaña y Carvajal, 2019). Dado esto se hace necesario determinar la diversidad genética de las levaduras.

Como la producción de chicha es un proceso artesanal que se da en Ecuador, no se conoce las especies de levaduras involucradas y se ha llevado a cabo estudios bioarqueológicos para identificar “levaduras ancestrales aisladas de antiguos recipientes de fermentación de la meseta de Quito”(Carvajal, 2010, p. 1).

2.3 Industria cervecera

A lo largo de la historia de las civilizaciones se ha visto el consumo constante de bebidas alcohólicas, siendo la cerveza el producto fermentado más antiguo y común, además ha tenido

gran relevancia en cuanto al consumo social y se considera como una buena fuente de calorías que puede llegar a suplementar muchas dietas (Suárez, 2013).

Actualmente los niveles de consumo de cerveza son elevados a nivel mundial, debido a diversos factores, entre los más destacados son los beneficios que aporta a la salud gracias a su alto contenido de antioxidantes y el bajo contenido calórico (Sánchez *et al.*, 2010).

En la industria cervecera se puede elaborar cerveza a partir de cualquier cereal que pueda producir azúcares fermentables, de esta manera se ha ido generando una enorme variedad de estilos de cerveza, entre estas se presentan rubias o doradas, rojas, negras, ahumadas, de trigo, amargas, entre otras; además varía su contenido alcohólico. Para la fabricación de cerveza se debe tomar en cuenta las diferentes fases por las cuales tiene que pasar para llegar a obtener una cerveza de calidad, entre ellas está el molido de los ingredientes o cereales, cocción de los mismo, la fermentación y el envasado (Garduño García *et al.*, 2014).

Por otro lado, para la elaboración de la cerveza se debe tener presente la salubridad e inocuidad requerida, la naturaleza y características que presente la materia prima y el control de la temperatura en cada una de las etapas del proceso, por lo que se debe poner especial atención a las propiedades antisépticas que posee el lúpulo, la ausencia de oxígeno, la disposición de anhídrido carbónico, la característica ácida y la carencia de nutrientes (Gonzalez, 2019).

Se dice que la cerveza es una bebida microbiológicamente estable, la presencia de etanol se da entre 0,5 y 10% p/p, un contenido de dióxido de carbono aproximadamente 0,5% p/v; y un pH bastante bajo entre 3.8 – 4,7 (Hill, 2015).

2.3.1 Clases de cerveza

La clasificación de las cervezas es muy amplia, ya que se puede tomar diversos aspectos para la misma, puede ser de acuerdo con la materia prima empleada (cebada, trigo, avena, entre otros cereales), al lugar de elaboración o procedencia del agua, pero la clasificación más admitida es de acuerdo con el tipo de fermentación, la misma es establecida por la Asociación de cerveceros (Díaz Yubero, 2015).

2.3.1.1 Cerveza de baja fermentación.

Este tipo de cerveza se suele fermentar entre 0 – 4 °C, son ligeras, espumosas y suaves; su color tiende a ser negro, se llaman Lager que significa “almacén” en alemán, haciendo referencia al lugar donde se solían guardar para mantenerse frescas (Díaz Yubero, 2015).

2.3.1.2 Cerveza de alta fermentación.

Son aquellas cervezas que se fermentan a altas temperaturas hasta 24 °C, su principal característica es el aroma, con cuerpo y un sabor bastante marcado, además pueden ser secas o dulces; se denominan Ale, estas se pueden subdividir en Mild Ale que se caracteriza por no ser amarga, Bitter Ale que presenta como particularidad su sabor amargo, Pale Ale que ofrece como propiedades ser casi transparente, con poco lúpulo; Indian Pale Ale, Brown Ale y Old Ale o envejecida (Díaz Yubero, 2015).

2.3.1.3 Cervezas de fermentación espontánea.

Son resultado de la acción de ciertas cepas que se presentan en el ambiente, no son cultivadas, dentro de estas se encuentran la Lambic, Gueuze Frambozen y Faro (Díaz Yubero, 2015).

2.3.2 Elaboración de la cerveza

Como se muestra en la figura 2, dentro de los pasos en general para la producción de la cerveza tomados de los estudios de (Gisbert Verdú, 2016) están:

2.3.2.1 Germinación.

Para iniciar, se estimula al grano para que inicie la germinación al agregar agua, gracias a esto, se preparan las enzimas necesarias en los procesos subsecuentes (Gisbert Verdú, 2016).

2.3.2.2 Secado y tostado.

En esta etapa se elimina la mayor cantidad de agua para ser almacenado y a su vez el grano adquiere ciertas características organolépticas que distinguirán la cerveza (Gisbert Verdú, 2016).

2.3.2.3 Molienda.

Al moler el grano se favorece el paso de las enzimas a las reservas de azúcares que se ubican en el interior de los granos (Gisbert Verdú, 2016).

2.3.2.4 Maceración.

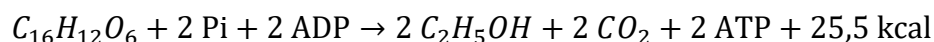
En esta etapa las enzimas promovidas tanto por la temperatura $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ - como por el pH - 5,5- del agua, van a hidrolizar el almidón que se encuentra contenido en los granos (Gisbert Verdú, 2016).

2.3.2.5 Cocción.

Se agrega el lúpulo que otorga a la cerveza el sabor amargo que la caracteriza, también es importante garantizar un medio aséptico, para que luego se inoculen las levaduras en este lugar (Gisbert Verdú, 2016).

2.3.2.6 Fermentación.

Luego de la cocción, se debe dejar enfriar el mosto y se inocula con las levaduras, la temperatura dependerá del tipo de fermentación que se desee obtener; este proceso de fermentación es muy complejo debido a que se compone de aproximadamente 2000 reacciones químicas como se muestra en la figura 1, que, de una manera simplificada y básica, la producción de etanol sería:



2.3.2.7 Terminación.

Son todas las actividades que se llevan al finalizar la fermentación, que le dan las características a la cerveza como filtración, carbonatación y afinamiento del sabor (Gisbert Verdú, 2016).

Figura 2. Proceso de elaboración de la cerveza.



Nota. El presente gráfico representa el proceso que se lleva a cabo para la elaboración de la cerveza. Tomado de *Cerveza: componentes y propiedades* (p. 7), por M. Suárez, 2013, Universidad de Oviedo.

2.4 Levaduras

Los procesos biológicos de las levaduras se encuentran estrechamente relacionados con la fermentación para la producción de cerveza y pan; por esta razón, es que las levaduras son consideradas “hongos ascomicetos fermentadores”(Kurtzman et al., 2011).

Es importante mencionar que las levaduras (ascomicetos o basidiomicetos) se caracterizan principalmente por presentar la fisión como medio principal de reproducción asexual. Este tipo de microorganismos presentan gran beneficio para la humanidad, debido a que se aplican en diferentes campos como “producción de alimentos, vino, cerveza y una variedad de productos bioquímicos” (Wolf, 1996).

Con la finalidad de emplear de una forma eficiente las propiedades que presentan las levaduras a una escala industrial, se va a requerir la identificación taxonómica y a la vez las características fisicoquímicas de la cepa (Vásquez *et al.*, 2016). “Debido a que las levaduras se usan ampliamente en la biotecnología tradicional y moderna, la exploración de nuevas especies debería conducir a nuevas tecnologías adicionales” (Wolf, 1996).

Como se mencionó anteriormente, la domesticación de las levaduras es un evento clave en la historia de la humanidad, en Ecuador también fue un suceso que se dio de forma temprana y esto se evidencia en “las bebidas fermentadas como la chicha [...] data de los 200 A.C., incluso antes del establecimiento de los Incas en la región”(Barbosa Piló *et al.*, 2018, p. 809). Este proceso biotecnológico de producción de bebidas fermentadas presentan un gran impacto económico, ya que produce “aproximadamente \$245 billones anualmente a nivel global” (Jernigan, 2009).

2.4.1 Clasificación de las levaduras

La clasificación más sencilla que se puede hacer respecto a las levaduras es de acuerdo con su actividad y aplicación como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las levaduras por su actividad y aplicación.

Clasificación	Característica distintiva			Uso
Industriales cultivadas	o	Levaduras verdaderas		Industria panificadora Industria cervecera
Naturales		Salvajes		Producción de vino Fermentación del mosto
Falsas		Reproducción exclusiva por germinación		Fermentación perjudicial Industria farmacéutica

Nota: Clasificación característica distintiva y uso de levaduras de interés. Fuente:(Coronel Navarro, 2015).

2.4.2 Morfología de las levaduras

Comúnmente, en cuanto a la forma de las levaduras, se suelen presentar “esféricas, elípticas y cilíndricas su tamaño varía notablemente pero el diámetro de la *Saccharomyces cerevisiae* oscila de 2 a 8 micras”(Nieto, 2009, p. 12). Las células de levaduras, vistas en el microscopio, exhiben una pared celular y una membrana plasmática, debido a esto, el núcleo es diferenciado; además no se presentan órganos de locomoción como flagelos. La pared celular está constituida por macromoléculas de glucosa y manosa, con poca cantidad de proteínas, lípidos y quitina (Nieto, 2009, p. 13).

Para la identificación macroscópica de las colonias se evalúa el aspecto de acuerdo con las especificaciones de (Sicilia y Cuesta, 2007):

Las levaduras desarrollan colonias sin micelio aéreo o con extensiones aracneiformes en el contorno de las colonias. Si la colonia posee aspecto y consistencia mucoide, esto insinúa que

existe composición de cápsulas y sugiere ser *Cryptococcus neoformans*. Respecto al color, si es rojo anaranjado o naranja, con una apariencia cremosa o rugosa, son características de las especies del género *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (anaranjado), la presencia de esta tonalidad se debe a su riqueza en carotenoides.

Saccharomyces cerevisiae es de las levaduras más empleadas en la industria de la cerveza, morfológicamente sus células son elongadas, globulares o una forma de elipse con gemaciones o blastoconidios multilaterales, se presentan hasta cuatro ascosporas globulares o elipsoides con un tamaño entre “5 a 10 μm de diámetro externo y de 1 a 7 μm de diámetro interno”(Durango Londoño, 2007, p. 26).

2.4.2.1 Composición química de una célula de levadura.

Las células de levadura contienen aproximadamente un 75% de agua, el 25% restante se encuentra constituido por minerales y vitaminas que se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Composición química de la célula de levadura.

Compuesto	Porcentaje %
Carbohidratos	18-44
Proteínas	36-60
Ácidos Nucleicos	4-8
Lípidos	4-7
Inorgánicos totales	6-10
Fósforo	1-3
Potasio	1-3
Sulfato	0.4
Vitaminas	Trazas

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

2.4.3 Resistencia alcohólica y capacidad fermentativa

La resistencia alcohólica alude a la capacidad que poseen ciertos microorganismos, como las levaduras, de continuar su crecimiento en la presencia de sustancias alcohólicas como el etanol, esto es gracias a ciertos mecanismos adaptativos que presentan como el engrosamiento de la membrana y caracteres genéticos (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015).

El etanol impide el crecimiento y desarrollo de los microorganismos debido a que genera daños en el ADN mitocondrial, además inactiva ciertas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa y la deshidrogenasa. En las levaduras se presenta una resistencia al etanol gracias a que la célula posee la capacidad de exportar el etanol del medio interior hacia el medio exterior; además la levadura puede modificar su composición de ácidos grasos de la membrana y ven minimizados los efectos de fluidez que son resultado de la presencia de etanol (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015).

Las cepas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, se caracterizan por ser organismos altamente tolerantes al etanol, debido a que pueden crecer en presencia de etanol al 13 %, pero el crecimiento se evita por completo con etanol al 14 % (Ghareib *et al.*, 1988).

La capacidad fermentativa de las levaduras está directamente relacionada con la resistencia alcohólica; es importante tomar en cuenta aspectos como una buena viabilidad de las células y que los procesos metabólicos se desarrollen de una forma correcta, de tal manera que permitan metabolizar los azúcares del sustrato, con el fin de optimizar los recursos del medio y así mismo se va a incrementar la generación de etanol, este es uno de los indicadores más crucial y fundamental en la industria de la fermentación para la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza (Paredes y Yugsi, 2016).

Para conseguir una mayor capacidad fermentativa, se han realizado estudios con respecto a levaduras de naturaleza salvaje que contribuyen a aumentar el perfil de fermentación en los casos en que existen restricciones de nutrientes por mitofagia y se puede optimizar el proceso fermentativo basándose en base a parentales salvajes (Shiroma *et al.*, 2014).

2.4.3.1 Prueba de fermentación de azúcares

Para analizar la capacidad de fermentación de un tipo específico de azúcar que presenten las distintas cepas de levaduras, se suele realizar en tubos con medio líquido y se coloca en el fondo de forma invertida la campana de Durham para que se recojan las burbujas de CO₂ generadas en caso de que exista la fermentación (Sanz Cervera, 2011, p. 51).

2.4.3.2 Determinación de la viabilidad celular

Para la evaluación del impacto de factores estresantes en estudios de microbiología industrial, la determinación de la viabilidad celular es el método más utilizado, se define como un porcentaje de células vivas en una población total (Kwolek-Mirek y Zadrag-Tecza, 2014).

Se recomienda que la viabilidad celular sea de al menos >95 %, dentro del manejo de levaduras en una cervecería, se debe alcanzar una viabilidad del 99 al 100 %, la viabilidad es el principal criterio de análisis, para evaluar el estado y la calidad de la levadura (Hill, 2015).

De acuerdo con experimentos se determinó que el etanol externo afecta la viabilidad de las células, se estableció que después de la incubación durante 3 días a 30 °C, no se pudieron detectar células viables en presencia de 12% etanol (Ghareib *et al.*, 1988).

2.5 Aislamiento de levaduras

2.5.1 Fuentes naturales de aislamiento de levaduras

La superficie de frutas son una fuente natural para realizar el aislamiento de levaduras, esto se debe a su alto contenido de azúcares y el pH bajo; es importante mencionar que en la superficie de cada tipo de fruta coexisten diferentes géneros de levaduras; en cuanto a las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, su presencia es mínima en las frutas, pero estas aumentan al momento en que otros microorganismos empiezan la fermentación (Siccha Sánchez, 2021).

2.5.2 Cultivos puros

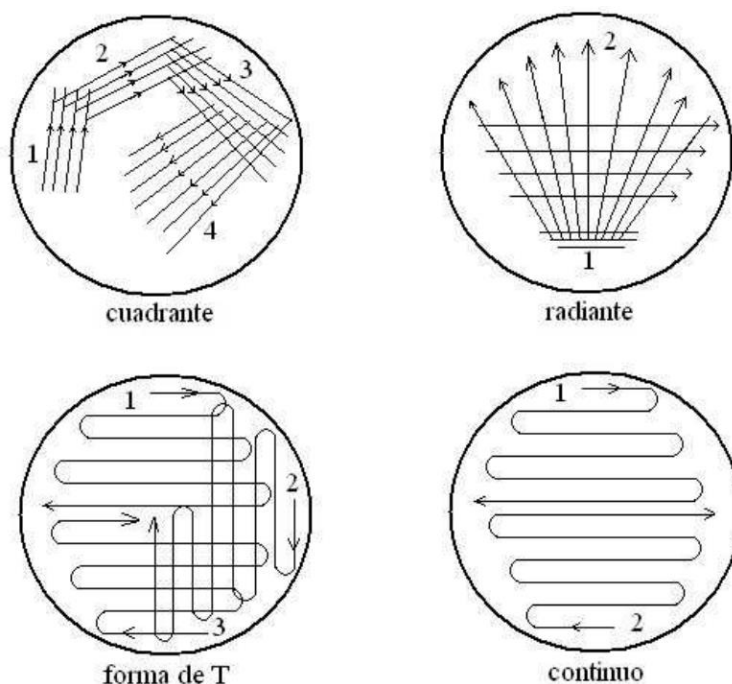
En la naturaleza no se encuentran los microorganismos en forma de colonias formadoras por una sola especie de microorganismos, que son llamados cultivos puros, suelen encontrarse por colonias de diferentes microorganismos; para el estudio de estos se hace necesario la obtención de los denominados cultivos puros; para su obtención, se busca conseguir colonias aisladas que provengan de una sola célula (Hernández, 2018).

Una vez se vea el crecimiento de los diferentes micelios, se procede a realizar resiembras, empleando el método de estriado en placas continuo de los micelios en cajas Petri con medio YPD para la obtención de cultivos puros (Tovar y Martínez, 2017).

2.5.3 Técnicas de inoculación en placa

Las técnicas de inoculación en placas, se emplean para la obtención de cultivos puros, esto se basa en la transferencia de una célula a un medio estéril; la técnica de estriado en placas es un método sencillo y simple para el aislamiento de un microorganismo que se encuentre en una mezcla de diferentes microorganismos (Carrillo Mendivil, 2008, pp. 24-25).

Figura 3. Técnicas de inoculación en placa.



Nota: Explicación gráfica de las cuatro técnicas de estriado. Tomado de (Carrillo Mendivil, 2008, p. 25)

2.5.4 Medio de Cultivo para aislamiento de levadura

El medio agar YPD, extracto de levadura de peptona y dextrosa, se emplea para el mantenimiento y multiplicación de levaduras en procedimientos de microbiología molecular (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015, p. 24). Este medio se emplea para cultivar *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras; es adecuado ya que las levaduras crecen bastante bien en medios con cantidades mínimas de glucosa y sales, en la tabla 3 se muestra los componentes del medio y su función (Condalab, 2019, p. 1).

Tabla 3. Composición nutricional del medio de cultivo YPD agar

Compuesto	Cantidad (g/l)	Función
Agar bacteriológico	15	Agente solidificante.
Peptona	20	Fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos.
Dextrosa	20	Fuente de energía.
Extracto de levadura	10	Fuente de vitaminas, especialmente del grupo B.

Nota: cuadro elaborado con los datos tomados de (Condalab, 2019, p. 1)

2.6 Biodiversidad en Ecuador

Ecuador se considera dentro de los 14 países con mayor diversidad del mundo a pesar de la superficie reducida que posee, cerca de 0,2% del planeta (Aguirre Mendoza *et al.*, 2017). La mega diversidad del país se debe a los ecosistemas y microclimas variados que se generan por la ubicación geográfica y topografía (Guamán Burneo y Carvajal Barriga, 2009).

Ecuador al ser un país con gran diversidad biológica, presenta variedad de organismos con diferentes aplicaciones, entre ellos se encuentran las levaduras que se pueden aplicar en la industria de producción de vinos y cervezas para bajar los costos de la materia prima. La zona de la provincia de Loja presenta un alto grado de diversidad biológica debido a que se encuentra ubicada en la convergencia entre amazonía y costa (Aguirre Mendoza *et al.*, 2017). Además, Aguirre (2017), resalta que, en la provincia de Loja existen alrededor de 3 039 especies de estas 639 son endémicas; las especies presentes en esta provincia representan el 21,19 % de las especies presentes en el Ecuador.

Las plantas pertenecientes a la familia Ericaceae son de las más representativas en los bosques andinos, “principalmente en los bosques nublados de montaña, así como en las regiones de páramo y subpáramo, donde juega un papel ecológico importante” (Durán Casas *et al.*, 2013).

“En el Ecuador hay 22 géneros y 221 especies. Se trata de una de las familias con mayor endemismo en el Ecuador: 44% o 98 especies son endémicas del país” (Pedraza *et al.*, 2019).

Las ericaceas resaltan debido a la morfología de sus frutos y flores (Rodríguez, 2020), además, de ser alimento para insectos, pequeños mamíferos y colibríes (Pedraza *et al.*, 2019).

2.7 Joyapa o uva camarona (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.)

“*Macleania rupestris* tiene varios nombres, en Ecuador, como chamburo, chaquilulo, joyapa, hualicón, joyapa blanca, chupa lulu, entre otros; en Colombia se la conoce como uva camarona” (Suquillo Bermeo, 2022). “Pertenece a la familia *Ericaceae*, crece generalmente en los páramos y se distribuye en las regiones andinas desde el sur de México hasta Perú a altitudes entre 2200 a 3500 metros sobre el nivel del mar” (Caiza Caizalitin, 2022). “*M. rupestris* es un arbusto epítítico que mide de 0,6 a 2,5 m de altura con ramificaciones que se originan casi en la base de los tallos” (Durán Casas *et al.*, 2013).

2.7.1 Taxonomía de *M. rupestris* (Kunth) A.C. Sm.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *M. rupestris*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Macleania
Especie	Rupestris

Nota: Fuente: (Suquillo Bermeo, 2022)

2.7.2 Composición nutricional de *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm.

De acuerdo con el estudio de la composición y las propiedades de los frutos de *M. rupestris* realizada por Amaya y Rincón (1989) se obtienen datos como, acidez total de 0,49% de ácido cítrico, 12,5 °Brix de sólidos solubles, 1,8% de fibra bruta, 1,3% de proteína bruta y 0,08 g de tanino en 100 g de pulpa, además en cuanto al contenido de elemento, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de los elementos en 100 g de pulpa del fruto de *M. rupestris*.

Elementos	Contenido en 100 g de pulpa
Calcio	136,9 mg
Hierro	0,97 mg
Potasio	5,24 mg
Sodio	8,69 mg
Fósforo	10,3 mg
Azúcares	
Fructosa	15,9 g
Sacarosa	1,62 g
γ -glucosa	13,5 g
β -glucosa	16,1 g

Nota: Tabla elaborada con los datos de (Amaya y Rincón, 1989).

2.8 Secuenciación genética

La secuenciación genética es una tecnología y método efectivo para la determinación de la diversidad genética de un organismo; además se puede comparar y analizar las variaciones entre las secuencias de diversos taxones (Paredes y Yugsi, 2016).

2.8.1 Secuenciación NGS

NGS, hace referencia *Next Generation Sequencing*, en español Secuenciación de Nueva Generación; son aquellas tecnologías diseñadas que se aplican para el análisis de grandes

cantidades de ADN de una manera masiva y paralela, además se da en una menor cantidad de tiempo y un costo más bajo por base (Rubio *et al.*, 2020).

2.8.2 Ampliación para Filogenética

La secuenciación de Ampliación es una herramienta importante y ampliamente utilizada para inferir la presencia de grupos taxonómicos en comunidades microbianas (Lundberg *et al.*, 2013).

En las levaduras, los genes ribosomales son las unidades 5.8S, 18S y 26S, si se comparan estas regiones, es posible establecer las relaciones filogenéticas; dentro de cada una de estas secuencias codificantes, se encuentran los denominados espaciadores internos transcritos ITS1 y ITS2, estas regiones son de gran relevancia para la identificación taxonómica precisa (Paredes y Yugsi, 2016, pp. 12-13).

Como se menciona, las regiones ITS, son secuencias no codificantes y variables, estas características son las que permiten una identificación taxonómica precisa, estableciendo relaciones genealógicas entre los hongos por sus diferencias interespecíficas que se presenten; además se debe recalcar que la región ITS se considera como un código universal en el estudio de los organismos pertenecientes al reino fungi (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999, p. 330).

Capítulo 3

Marco Metodológico

3.1 Nivel de investigación

El presente estudio tiene un nivel de investigación explicativo, debido a que, permite establecer la cepa con mejor resistencia alcohólica obtenida de los frutos maduros de joyapa (*M. rupestris* (Kunth) A.C. Sm). Los estudios realizados en Ecuador acerca de las levaduras se han dado principalmente en la identificación de las cepas presentes para la elaboración de bebidas tradicionales como la chicha. Es importante mencionar la variedad de frutos que se utilizan para la obtención de bebidas fermentadas, por lo que es evidente la presencia de levaduras, ya que son las responsables de este proceso biotecnológico.

3.2 Diseño de investigación

La presente investigación es de tipo diseño experimental, debido a que se establecerá la cepa de levadura obtenida de los frutos maduros de joyapa (*M. rupestris* (Kunth) A.C. Sm) con mejor resistencia al etanol (variable independiente); con temperatura y pH contralados. Para esto, se someterá las muestras de levaduras a diferentes concentraciones de etanol, con la finalidad de observar la viabilidad que presenten en cada caso.

3.3 Ubicación

La fase experimental se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología y Biología I de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. Las muestras de los frutos maduros se obtuvieron de una finca de 1,5 hectáreas de extensión en el sector Punzara Grande de la provincia de Loja, cuyas coordenadas son -4,054230, -79,212800, ver el anexo 1.

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

En cuanto a la población, la zona será el cantón Loja de la provincia Loja en un área de 1500 m², esta zona presenta un mismo piso climático, frío, se ubica entre los 2200 y 2300 metros de altura sobre el nivel del mar; presenta 12 °C como temperatura media anual. Por este espacio delimitado, se cuenta con una población finita de plantas de *M. rupestris*.

3.4.2 Muestra

Para la selección de la muestra de esta investigación, se aplicará el muestreo aleatorio simple sin remplazamiento, se asignará a cada planta de la población un número y luego eligiendo al azar n números equiprobables.

Aplicando un nivel de confianza del 95%, 10 como margen de error, 12 como individuos de la población, se calcula que el tamaño de muestra deben ser los 12 individuos.

3.5 Variables

3.5.1 Variables Independientes

Muestras del fruto de *M. rupestris* (Kunth) A.C. Sm.

Porcentaje de etanol para evaluación de la resistencia.

3.5.2 Variable Dependientes

Porcentaje de viabilidad de levaduras fermentativas.

3.5.3 Variables controladas

Temperatura, pH y tiempo.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas para la obtención de datos se realizan mediante el análisis documental y la observación no estructurada; en cuanto a los instrumentos de recolección de datos que se emplean son computadora y sus unidades de almacenaje, diario de campo y cámara fotográfica.

3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de resultados

Para el análisis de los datos experimentales se ejecuta mediante herramientas estadísticas; se maneja gráficos y tablas en donde se visualizan los porcentajes de viabilidad de las cepas de levadura aisladas. Los datos obtenidos se procesan en el programa Microsoft Word, Microsoft Excel del Microsoft Office 365 ProPlus y IBM SPSS Statistics.

3.8 Equipos, reactivos y materiales

Tabla 6. Reactivos, materiales y equipos utilizados.

Reactivos	Materiales	Equipos
Medio YPD agar	Frascos	Micropipeta
Etanol	Caja Petri (4 cuadrantes)	Microscopio
Ácido cítrico	Asa fúngica	Autoclave
Agua destilada	Vaso de precipitación	Cámara de flujo laminar
Azul de metileno	Matraz Erlenmeyer	Cámara de Neubauer
Aceite de inmersión	Porta y cubre objetos	Mechero de Bunsen
Solución criopreservativa	Espátula	Estufa
	Parafilm	Potenciómetro
	Papel aluminio	Balanza analítica
	Guantes, cofia, marcador	Agitador magnético
	Puntas para micropipetas	

Nota: Elaborada por el autor.

3.9 Procedimiento

3.9.1 Fase 1: Obtención de la muestra de frutos.

En esta primera fase, se realiza la obtención de los frutos maduros *M. rupestris* en la ubicación ya mencionada anteriormente, para esto se preparó agar YPD de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Se suspende 65 gramos de medio en un litro de agua destilada. Se homogeniza y disuelve calentando con agitación continua. Se hierve alrededor de un minuto hasta una disolución total. Se esteriliza en autoclave a 121°C en un periodo de 15 minutos. Se deja enfriar a 45-50°C y se coloca en las placas (Condalab, 2019).

Se coloca aproximadamente 30 mL de medio en cada uno de los doce frascos previamente esterilizados en el equipo de autoclave.

Debido a que la población de plantas de *M. rupestris* es finita en la ubicación seleccionada se toma muestra de las doce plantas presentes.

De cada planta se toman entre 5 y 6 frutos maduros y se colocan en los frascos, luego se procede a cortar las frutas cuidadosamente con un cuchillo previamente esterilizado para aumentar la superficie de contacto con el agar.

Los frascos se rotulan con las letras del abecedario de la A hasta la L, respectivamente a las doce plantas.

Posteriormente se colocan los frascos en la incubadora a 36 °C, por un periodo de 72 horas hasta que se evidencie crecimiento de los microorganismos.

3.9.2 Fase 2: Aislamiento de las levaduras.

Se prepara el agar YPD con las especificaciones ya mencionadas anteriormente; se coloca 15 mL de medio en cada caja Petri.

Con ayuda del asa estéril se toma parte de la muestra de los frascos y se realiza una siembra por estriado en las cajas Petri.

Se cierra la caja Petri, se sella con Parafilm en el contorno para evitar contaminación, seguidamente se rotula las cajas de acuerdo con el frasco de procedencia y se colocan dentro de fundas Ziploc. Seguidamente se colocan en la incubadora a 36 °C y se controla el crecimiento de las colonias a las 48 y 72 horas.

Luego de las 72 horas se realiza resiembras seguidas hasta la obtención de cultivos puros tomando en cuenta criterios como la forma de la colonia y la vista de las células en el microscopio.

3.9.3 Evaluación macro y microscópica para identificar levaduras.

Se evalúa las características que presenten las colonias como color y forma.

Se prepara un frotis de cada uno de los cultivos puros obtenidos anteriormente, para esto se coloca una gota de agua destilada en el centro del portaobjetos, con ayuda del asa se toma en condiciones asépticas una mínima cantidad de la colonia que creció en medio agar YPD y se coloca en la gota de agua, así mismo con el asa se homogeniza la muestra y se extiende con el fin de facilitar el secado.

Se flamea el portaobjetos con la muestra en el mechero para desactivar las levaduras y facilitar su secado.

Se tiñe la muestra con azul de metileno, se deja actuar durante unos minutos para una correcta tinción.

Se lava con agua estéril suavemente, a continuación, se deja secar nuevamente con ayuda de la llama del mechero.

Se examina las muestras en el microscopio empleando el objetivo de 100X necesariamente con aceite de inmersión.

3.9.4 Prueba de fermentación de la maltosa.

Se realiza de acuerdo con el protocolo establecido por Sanz Cervera, 2011, respecto a la fermentación de azúcares:

Se coloca 5 mL de agua destilada con extracto de levadura al 0,5% en los tubos de ensayo.

Se coloca de forma invertida en cada tubo de ensayo una campana de Durham, se cierran los tubos y se esterilizan en autoclave.

Se adiciona azúcar para obtener una concentración del 2%.

Cada tubo de ensayo se inocula con las levaduras estudiadas.

Finalmente se incuba 48 h a 25 - 30 °C y observar la aparición o no de burbujas de CO₂ en las campanas.

3.9.5 Evaluación de la resistencia al etanol a diferentes concentraciones y viabilidad de las levaduras.

Para la evaluación de la resistencia al etanol que presenten las levaduras, se prepara agar YPD con concentraciones de etanol al 0%, 3%, 6% y 9%, esto se decidió debido a que las levaduras

como *S. cerevisiae* que se emplean comercialmente presentan resistencia hasta el 13%, sin embargo, en el proceso de elaboración de la cerveza llega hasta 10%.

El pH se controla en 4.2, para el ajuste de este se emplea ácidos clorhídrico o hidróxido de sodio según lo necesario.

Se coloca 15 mL del medio en cada caja Petri, se inocula con las levaduras aisladas, se cierran y sellan con Parafilm, posteriormente se colocan en la incubadora a 36 °C.

Se controla el crecimiento de las colonias durante 48, 72 y 96 horas.

Para el análisis de la viabilidad celular se aplica el conteo de células vivas y muertas al microscopio después de la coloración con azul de metileno, de acuerdo con el método de Lange *et al.* (1993) descrito en (Díaz Nava, 2014) (Coronel Navarro, 2015) (Heredia Peñafiel y Kwok Tacan, 2015) (Almeida Lasso y Betancourt Alvarez, 2015).

La muestra diluida (1:10) se mezcla con el colorante (azul de metileno al 0.01%) en relación 1:1 y se dejó reposar 10 min. Después de transcurrido el tiempo de contacto, se realizó el conteo al microscopio con la cámara de Neubauer, determinando como células vivas a todas aquellas que no presentaron coloración, mientras que las células muertas fueron coloreadas de azul.

Para el cálculo del porcentaje se aplica la ecuación:

$$\%V = \frac{Nv}{Nt} * 100$$

Donde:

Nv: Número de células vivas.

Nt: Número de células vivas y muertas.

Cabe recalcar que la evaluación de la resistencia al etanol tuvo tres réplicas para mayor fiabilidad de los resultados obtenidos.

3.9.6 Secuenciación de las muestras seleccionadas.

Para enviar las muestras a secuenciar se realiza la conservación de las levaduras en frío, para esto se aplica el protocolo donde se emplea un crioprotector, en este caso, glicerol al 30% estéril descrito por (Acosta Ovallos, 2019), para mantener a una temperatura de -30 °C.

Se prepara una solución de glicerol en agua destilada al 30% (p/v), en viales de 2 mL, se suspende 0.8 mL del medio de preservación previamente preparado con ayuda de una micropipeta, realizando luego una homogenización. Finalmente, los viales serán refrigerados a 4 °C por 15 minutos para un periodo de equilibrio e inmediatamente congelarlos a -30 °C.

La levadura seleccionada, se mandará a secuenciar en “BioSequence”, se emplea la técnica Secuenciación NGS Amp ITSA1, 20000R, ITS86F-ITS4, para amplicón para filogenética de hongos y levaduras. Finalmente, los resultados recibidos se analizan e interpretan.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1 Aislamiento de levaduras, codificación y evaluación microscópica

No se observó crecimiento de levaduras en algunos frascos con medio agar YPD y las muestras de frutos maduros *M. rupestris*, los resultados se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Resultado de crecimiento de microorganismos en los frascos.

Código de frasco	Crecimiento de microorganismos
A	+
B	+
C	+
D	+
E	+
F	+
G	+
H	+
I	+
J	+
K	+
L	+

Nota: Se evalúa la apariencia de las colonias, siendo (+) que existe presencia y (-) que no se visualiza. Elaborada por el autor.

Pasadas las 72 horas se evaluó el crecimiento en los frascos, como era de esperar se vio diferentes formaciones de colonias, de las cuales se descartaron automáticamente las que tenían una apariencia algodonosa, ya que esto representa el crecimiento de hongos.

Como se observaba diferentes colonias en cada frasco, se resiembró las colonias con apariencia de levadura, para las resiembras se examina en el microscopio la morfología de las células, tratando de obtener cultivos puros y descartando los frascos en los que no había

crecimiento de colonias de levaduras, este proceso se realizó cuatro veces hasta conseguir los resultados que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Observación de la resiembra de colonias.

Código de caja Petri	Observación
B1	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
B2	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
B3	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
B4	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
C1	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
C2	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
I1	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
I2	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
J1	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.
J2	Se sigue observando crecimiento de diferentes colonias.

Nota: Este es el cuadro resultado luego de la cuarta resiembra. Elaborada por el autor.

Debido a que aún se seguían evidenciando crecimiento de diferentes colonias, y en el microscopio se visualiza crecimiento de bacterias se realizó una quinta resiembra adicionando al medio gentamicina al 10%.

Luego de las 72 horas se observó al microscopio para ver las células que crecían y descartar aquellas cajas Petri en las que no se evidencia crecimiento de levaduras y solo de bacterias. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Apariencia de las células vistas al microscopio.

Código de caja Petri	Crecimiento de levaduras	Crecimiento de bacterias
B1	-	+
B2	+	-
B3	-	-
B4	+	-
C1	-	+
C2	+	-
I1	-	-
I2	+	-
J1	-	-
J2	+	-

Nota: Se evalúa la apariencia de las células, siendo (+) que concuerda con las características y (-) que no se visualiza. Elaborada por el autor.

Cabe recalcar que solo se consiguió aislar levaduras de cuatro de los doce frascos iniciales, a pesar de que se evidenció crecimiento de diversas colonias en todos los frascos, sin embargo, no todos presentaban crecimiento de colonias con características de levaduras.

$$\text{Porcentaje} = \frac{4}{12} \times 100 = 33,33\%$$

Se obtuvo un 33,33% de frascos con crecimiento de micelios de levadura.

4.2 Prueba de fermentación

En las pruebas de fermentación se evaluó las cinco cepas aisladas y se obtuvo los siguientes resultados, tabla 10.

Tabla 10. Resultados de las pruebas de fermentación.

Código de levadura	24 horas	48 horas	72 horas
B2	+	+	+
B4	+	+	+
C2	-	+	+
I2	+	+	+
J2	-	+	+

Nota: Se evalúa la capacidad fermentativa, siendo (+) que presenta gas en la campana de Durham y (-) que no presenta. Elaborada por el autor.

A las 24 horas en las muestras B2, B4 e I2 se evidenció que poseen la capacidad fermentativa ya que se observó la generación de CO₂, pero a las 48 y 72 horas todas las muestras habían producido fermentación, por lo que se afirma que todas poseen capacidad fermentativa de la glucosa, sin embargo, B2, B4 e I2 poseen un metabolismo más rápido en la conversión de los azúcares.

4.3 Viabilidad respecto a la resistencia al etanol

La viabilidad se evaluó a las 48, 72 y 96 horas y se presentan los siguientes resultados, tabla 11.

Tabla 11. Resultados del porcentaje de viabilidad.

Código de levadura	0% Etanol			3% Etanol			6% Etanol			9% Etanol		
	48 horas	72 horas	96 horas	48 horas	72 horas	96 horas	48 horas	72 horas	96 horas	48 horas	72 horas	96 horas
B2	97,44	88,89	49,21	97,67	83,05	46,77	82,50	72,22	38,89	63,58	67,36	61,11
	95,35	91,30	34,04	95,12	79,31	50,77	81,25	77,19	37,29	71,47	69,81	33,33
	100,00	94,00	55,10	100,00	74,51	40,43	86,54	83,93	43,24	62,22	64,51	31,03
B4	100,00	93,75	44,90	87,50	78,18	47,83	90,70	80,36	51,79	63,00	58,50	33,33
	98,56	97,92	48,00	92,11	83,48	43,90	86,00	83,72	36,96	75,47	73,95	33,33
	95,83	100,00	46,67	93,75	82,98	35,19	81,25	79,17	27,27	68,93	69,92	45,16
C2	93,33	92,50	36,00	95,00	76,47	38,64	65,91	74,42	30,77	0,00	0,00	9,00
	96,69	91,49	49,02	94,12	79,63	42,59	63,16	72,22	44,19	0,00	0,00	12,00
	98,65	95,45	38,89	89,13	74,00	33,93	63,89	69,49	34,88	0,00	0,00	0,00
I2	99,16	87,76	43,40	93,18	75,00	48,33	90,70	68,97	34,69	65,75	74,51	27,27
	98,79	93,48	50,00	95,00	80,00	42,86	81,82	80,00	32,65	70,73	68,60	33,33
	100,00	90,70	32,50	95,45	76,00	28,89	87,80	75,00	50,00	75,93	55,35	42,62
J2	98,77	93,33	34,15	88,89	75,00	32,69	72,09	71,43	43,90	35,93	21,89	0,00
	96,56	90,57	41,82	95,45	83,72	41,67	66,00	71,74	27,08	31,97	19,97	0,00
	94,15	93,75	53,45	88,37	83,67	31,11	73,47	82,22	32,50	32,00	19,68	0,00

Nota: Elaborada por el autor.

Los porcentajes de viabilidad a las 48 horas con 0% de etanol son bastante buenos ya que se mantienen en un rango entre 93,33 y 100%; que, conforme a la teoría se recomienda que en una cervecera la viabilidad de ser $\geq 95\%$.

Así mismo la viabilidad conforme el paso del tiempo debe ir disminuyendo, teóricamente pasados los 3 días y con 12% de etanol adicionado no se detecta viabilidad; en este experimento a los 3 días y 0% de etanol se detecta como viabilidad mínima 87,76% y como máximo 100%, sin embargo, al cuarto día los porcentajes disminuyen bastante, obteniendo un rango de 32,50 -50,10% de viabilidad celular.

Para la prueba de normalidad de los datos se utiliza $\alpha=0,05$ y plantean las hipótesis:

H0: Los datos presentan una distribución normal.

H1: Los datos no presentan una distribución normal.

Tabla 12. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 0% de etanol.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
48 horas	,214	15	,064	,914	15	,155
72 horas	,176	15	,200*	,960	15	,688
96 horas	,124	15	,200*	,942	15	,413

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de la prueba de Shapiro-Wilk ya que son menos de 50 datos. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Debido a que todos presentan un valor mayor a 0,05, se acepta la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal, por lo que se aplican pruebas paramétricas como ANOVA.

Las hipótesis para ANOVA son:

H0: Las medias de las poblaciones son iguales.

H1: Las medias de las poblaciones no son iguales.

Tabla 13. ANOVA para la viabilidad con 0% de etanol.

Tabla de ANOVA^a

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
48 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	19,009	4	4,752	1,039	,434
	Dentro de grupos	45,745	10	4,575		
	Total	64,754	14			
72 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	78,507	4	19,627	3,060	,069
	Dentro de grupos	64,130	10	6,413		
	Total	142,637	14			
96 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	68,439	4	17,110	,252	,902
	Dentro de grupos	679,514	10	67,951		
	Total	747,953	14			

a. La variable de agrupación Código de levadura es una cadena, de forma que la prueba para la linealidad no se puede calcular.

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de 48 horas $p=0,434$; 72 horas $p=0,069$ y 96 horas $p=0,902$. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics

Los valores de significancia p son mayores a $\alpha=0,05$; entonces, se acepta la hipótesis nula y se dice que las medias de las poblaciones son iguales.

Para la prueba de normalidad de los datos se utiliza $\alpha=0,05$ y plantean las hipótesis:

H0: Los datos presentan una distribución normal.

H1: Los datos no presentan una distribución normal.

Tabla 14. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 3% de etanol.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
48 horas	,149	15	,200*	,936	15	,339
72 horas	,193	15	,139	,882	15	,050
96 horas	,111	15	,200*	,959	15	,669

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de la prueba de Shapiro-Wilk ya que son menos de 50 datos. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Debido a que todos presentan un valor mayor a 0,05, se acepta la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal, por lo que se aplican pruebas paramétricas como ANOVA.

Las hipótesis para ANOVA son:

H0: Las medias de las poblaciones son iguales.

H1: Las medias de las poblaciones no son iguales.

Tabla 15. ANOVA para la viabilidad con 3% de etanol.**Tabla de ANOVA^a**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
48 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	92,316	4	23,079	2,653	,096
	Dentro de grupos	86,993	10	8,699		
	Total	179,309	14			
72 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	57,016	4	14,254	1,063	,424
	Dentro de grupos	134,111	10	13,411		
	Total	191,127	14			
96 horas * Código de levadura	Entre (Combinado) grupos	199,696	4	49,924	1,131	,396
	Dentro de grupos	441,539	10	44,154		
	Total	641,235	14			

a. La variable de agrupación Código de levadura es una cadena, de forma que la prueba para la linealidad no se puede calcular.

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de 48 horas $p=0,096$; 72 horas $p=0,424$ y 96 horas $p=0,396$. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Los valores de significancia p son mayores a $\alpha=0,05$; entonces, se acepta la hipótesis nula y se dice que las medias de las poblaciones son iguales.

Tabla 16. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 6% de etanol.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
48 horas	,221	15	,048	,894	15	,077
72 horas	,177	15	,200*	,925	15	,230
96 horas	,124	15	,200*	,952	15	,558

a. Corrección de significación de Lilliefors

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de la prueba de Shapiro-Wilk ya que son menos de 50 datos. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Debido a que todos presentan un valor mayor a 0,05, se acepta la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal, por lo que se aplican pruebas paramétricas como ANOVA.

Las hipótesis para ANOVA son:

H0: Las medias de las poblaciones son iguales.

H1: Las medias de las poblaciones no son iguales.

Tabla 17. ANOVA para la viabilidad con 6% de etanol.**Tabla de ANOVA^a**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
48 horas * Código de levadura	Entre grupos (Combinado)	1239,253	4	309,813	22,682	,000
	Dentro de grupos	136,593	10	13,659		
	Total	1375,846	14			
72 horas * Código de levadura	Entre grupos (Combinado)	141,342	4	35,336	1,543	,263
	Dentro de grupos	228,938	10	22,894		
	Total	370,281	14			
96 horas * Código de levadura	Entre grupos (Combinado)	56,491	4	14,123	,189	,938
	Dentro de grupos	745,541	10	74,554		
	Total	802,032	14			

a. La variable de agrupación Código de levadura es una cadena, de forma que la prueba para la linealidad no se puede calcular.

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de 48 horas $p=0,000$; 72 horas $p=0,263$ y 96 horas $p=0,938$. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Los valores de significancia de 72 y 96 horas p son mayores a $\alpha=0,05$; entonces, se acepta la hipótesis nula y se dice que las medias de las poblaciones son iguales. El valor de p a las 48 horas es inferior a $\alpha=0,05$; esto indica que se rechaza la hipótesis nula y existe diferencia en las medias de la población.

Se aplica la prueba de Tukey para las 48 horas para obtener los subconjuntos.

Tabla 18. Resultados prueba de Tukey de la viabilidad a las 48 horas y 6% de etanol.**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: 48 horas

HSD Tukey

(I) Código de levadura	(J) Código de levadura	Diferencia de medias (I- J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
B2	B4	-2,553070960047705	3,017646615928436	,910	-12,484393844201222	7,378251924105811
	C2	19,110862334546553*	3,017646615928436	,001	9,179539450393037	29,042185218700070
	I2	-3,344090915701813	3,017646615928436	,799	-13,275413799855329	6,587231968451704
	J2	12,908683509181856*	3,017646615928436	,011	2,977360625028339	22,840006393335372
B4	B2	2,553070960047705	3,017646615928436	,910	-7,378251924105811	12,484393844201222
	C2	21,663933294594260*	3,017646615928436	,000	11,732610410440742	31,595256178747775
	I2	-,791019955654107	3,017646615928436	,999	-10,722342839807624	9,140302928499409
	J2	15,461754469229561*	3,017646615928436	,003	5,530431585076045	25,393077353383077
C2	B2	-19,110862334546553*	3,017646615928436	,001	-29,042185218700070	-9,179539450393037
	B4	-21,663933294594260*	3,017646615928436	,000	-31,595256178747775	-11,732610410440742
	I2	-22,454953250248366*	3,017646615928436	,000	-32,386276134401880	-12,523630366094850
	J2	-6,202178825364697	3,017646615928436	,309	-16,133501709518214	3,729144058788819
I2	B2	3,344090915701813	3,017646615928436	,799	-6,587231968451704	13,275413799855329
	B4	,791019955654107	3,017646615928436	,999	-9,140302928499409	10,722342839807624
	C2	22,454953250248366*	3,017646615928436	,000	12,523630366094850	32,386276134401880
	J2	16,252774424883670*	3,017646615928436	,002	6,321451540730152	26,184097309037185
J2	B2	-12,908683509181856*	3,017646615928436	,011	-22,840006393335372	-2,977360625028339
	B4	-15,461754469229561*	3,017646615928436	,003	-25,393077353383077	-5,530431585076045
	C2	6,202178825364697	3,017646615928436	,309	-3,729144058788819	16,133501709518214
	I2	-16,252774424883670*	3,017646615928436	,002	-26,184097309037185	-6,321451540730152

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Luego de comparar el nivel de significancia se obtiene los siguientes subconjuntos:

Tabla 19. Subconjuntos de la prueba Tukey a las 48 horas y 6% de etanol.

HSD Tukey ^{a,b}		48 horas	
Código de levadura	N	Subconjunto	
		1	2
C2	3	64,318624844940630	
J2	3	70,520803670305330	
B2	3		83,429487179487180
B4	3		85,982558139534890
I2	3		86,773578095189000
Sig.		,309	,799

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 13,659.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

El subconjunto 2 se encuentra conformado por las cepas que presentan una mejor viabilidad a las 48 horas en medio con 6% de etanol adicionado, son la I2, B4 y B2.

Tabla 20. Prueba de normalidad de los porcentajes de viabilidad con 9% de etanol.

	Pruebas de normalidad			Shapiro-Wilk		
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Estadístico	gl	Sig.
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
48 horas	,292	15	,001	,809	15	,005
72 horas	,244	15	,016	,808	15	,005
96 horas	,173	15	,200*	,899	15	,093

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de la prueba de Shapiro-Wilk ya que son menos de 50 datos. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Debido a que todos presentan un valor mayor o igual a 0,05, se acepta la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal, por lo que se aplican pruebas paramétricas como ANOVA.

Las hipótesis para ANOVA son:

H0: Las medias de las poblaciones son iguales.

H1: Las medias de las poblaciones no son iguales.

Tabla 21. ANOVA para la viabilidad con 9% de etanol.

			Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
48 horas * Código de levadura	Entre grupos	(Combinado)	11405,546	4	2851,386	150,221	,000
	Dentro de grupos		189,813	10	18,981		
	Total		11595,359	14			
72 horas * Código de levadura	Entre grupos	(Combinado)	12202,488	4	3050,622	90,275	,000
	Dentro de grupos		337,925	10	33,793		
	Total		12540,413	14			
96 horas * Código de levadura	Entre grupos	(Combinado)	4401,896	4	1100,474	12,926	,001
	Dentro de grupos		851,374	10	85,137		
	Total		5253,269	14			

a. La variable de agrupación Código de levadura es una cadena, de forma que la prueba para la linealidad no se puede calcular.

Nota: Para evaluar las hipótesis se toma el valor de significancia de 48 horas $p=0,000$; 72 horas $p=0,263$ y 96 horas $p=0,938$. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

Los valores de significancia de p son menores a $\alpha=0,05$; entonces, se rechaza la hipótesis nula y se dice que las medias de las poblaciones son diferentes.

Se aplica la prueba de Tukey para las 48, 72 y 96 horas para obtener los subconjuntos.

Tabla 22. Resultados prueba de Tukey de la viabilidad a las 48 horas y 9% de etanol.**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: 48 horas

HSD Tukey

(I) Código de levadura	(J) Código de levadura	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
B2	B4	-3,374232226267992	3,557272938891496	,871	-15,081509664492378	8,333045211956394
	C2	65,758838545900500*	3,557272938891496	,000	54,051561107676115	77,466115984124880
	I2	-5,043705868432497	3,557272938891496	,631	-16,750983306656885	6,663571569791889
	J2	32,459591234072570*	3,557272938891496	,000	20,752313795848180	44,166868672296960
B4	B2	3,374232226267992	3,557272938891496	,871	-8,333045211956394	15,081509664492378
	C2	69,133070772168500*	3,557272938891496	,000	57,425793333944110	80,840348210392880
	I2	-1,669473642164505	3,557272938891496	,989	-13,376751080388890	10,037803796059881
	J2	35,833823460340560*	3,557272938891496	,000	24,126546022116173	47,541100898564950
C2	B2	-65,758838545900500*	3,557272938891496	,000	-77,466115984124880	-54,051561107676115
	B4	-69,133070772168500*	3,557272938891496	,000	-80,840348210392880	-57,425793333944110
	I2	-70,802544414333000*	3,557272938891496	,000	-82,509821852557380	-59,095266976108610
	J2	-33,299247311827930*	3,557272938891496	,000	-45,006524750052320	-21,591969873603546
I2	B2	5,043705868432497	3,557272938891496	,631	-6,663571569791889	16,750983306656885
	B4	1,669473642164505	3,557272938891496	,989	-10,037803796059881	13,376751080388890
	C2	70,802544414333000*	3,557272938891496	,000	59,095266976108610	82,509821852557380
	J2	37,503297102505066*	3,557272938891496	,000	25,796019664280678	49,210574540729450
J2	B2	-32,459591234072570*	3,557272938891496	,000	-44,166868672296960	-20,752313795848180
	B4	-35,833823460340560*	3,557272938891496	,000	-47,541100898564950	-24,126546022116173
	C2	33,299247311827930*	3,557272938891496	,000	21,591969873603546	45,006524750052320
	I2	-37,503297102505066*	3,557272938891496	,000	-49,210574540729450	-25,796019664280678

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 18,981.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el

programa IBM SPSS Statistics 25.

Luego de comparar el nivel de significancia se obtiene los siguientes subconjuntos:

Tabla 23. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 48 horas y 9% de etanol.

48 horas				
HSD Tukey ^{a,b} Código de levadura	N	Subconjunto		
		1	2	3
C2	3	,0000000000000000		
J2	3		33,299247311827930	
B2	3			65,758838545900500
B4	3			69,133070772168500
I2	3			70,802544414333000
Sig.		1,000	1,000	,631

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 18,981.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

El subconjunto 3 se encuentra conformado por las cepas que presentan una mejor viabilidad a las 48 horas en medio con 9% de etanol adicionado, son la I2, B4 y B2.

Tabla 24. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 72 horas y 9% de etanol.

72 horas			
HSD Tukey ^{a,b}			
Código de levadura	N	Subconjunto	
		1	2
C2	3	,0000000000000000	
J2	3		20,513333333333332
I2	3		66,150829125976600
B2	3		67,226538414107740
B4	3		67,454273504273470
Sig.		1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 33,793.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

El subconjunto 3 se encuentra conformado por las cepas que presentan una mejor viabilidad a las 72 horas en medio con 9% de etanol adicionado, son la I2, B4 y B2.

Tabla 25. Subconjuntos de la prueba de Tukey a las 96 horas y 9% de etanol.

96 horas			
HSD Tukey ^{a,b}			
Código de levadura	N	Subconjunto	
		1	2
J2	3	,0000000000000000	
C2	3	7,0000000000000000	
I2	3		34,409670475244200
B4	3		37,275985663082400
B2	3		41,825197956577234
Sig.		,879	,856

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 85,137.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = 0,05.

Nota: Se compara el nivel de significancia con $\alpha=0,05$, los que sean menores indican diferencia. Elaborada por el autor en el programa IBM SPSS Statistics 25.

El subconjunto 3 se encuentra conformado por las cepas que presentan una mejor viabilidad a las 96 horas en medio con 9% de etanol adicionado, son la I2, B4 y B2.

4.4 Secuenciación

Se secuenciaron los cultivos I2, B4 y B2 ya que estos presentan una mejor viabilidad.

Tabla 26. Taxones más representativos a nivel de especie.

Taxones más representativos a nivel de Especie			
Muestra	Clasificación	Lecturas	%
B2	1 Unclassified at Species level	86,926	47,15 %
	3 Saccharomyces Saccharomyces_sp	85,236	46,24 %
	4 Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	9,191	4,99 %
	5 Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,153	0,63 %
	2 Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	499	0,27 %
	6 Ascochyta Ascochyta_rabiei	162	0,09 %
	7 Talaromyces Talaromyces_ruber	78	0,04 %
	8 Lachancea Lachancea_lanzarotensis	73	0,04 %
B4	1 Unclassified at Species level	117,222	49,42 %
	2 Saccharomyces Saccharomyces_sp	103,768	43,75 %
	3 Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	12,312	5,19 %
	4 Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,380	0,58 %
	5 Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	632	0,27 %
	6 Ascochyta Ascochyta_rabiei	264	0,11 %
	7 Talaromyces Talaromyces_ruber	115	0,05 %
	8 Lachancea Lachancea_lanzarotensis	96	0,04 %
I2	1 Unclassified at Species level	118,369	48,11 %
	2 Saccharomyces Saccharomyces_sp	110,967	45,10 %
	3 Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	12,578	5,11 %
	4 Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,474	0,60 %
	5 Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	720	0,29 %
	6 Ascochyta Ascochyta_rabiei	249	0,10 %
	7 Talaromyces Talaromyces_ruber	120	0,05 %
	8 Penicillium Penicillium_corylophilum	91	0,04 %

Nota: Total de categorías taxonómicas a nivel de especie identificadas: 191, esta tabla muestra las 8 principales de 191 clasificaciones. Obtenida de BioSequence.

Analizado los resultados, las muestras presentan mayoritariamente relación con el género *Saccharomyces*, ya que las tres muestras poseen un porcentaje mayor al 99%, además se evidencia otros géneros en menor cantidad como *Kazachstania*. En cuanto a los taxones más representativos a nivel de especie en las tres muestras entre el 47,15 y 49,42% pertenecen a especies sin clasificación, lo siguiente más representativo es *Saccharomyces Saccharomyces sp.*, en B2 representa el 46,324%; en B4 el 43,75% y en I2 el 45,10%.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

A partir de los frutos maduros de joyapa (*Macleania rupestris*) que se muestreo en la ciudad de Loja, provincia de Loja, fue posible aislar cultivos puros que presenten características de colonias de levaduras, con un rendimiento del 33,33% de las muestras obtenidas.

Los cultivos de levaduras B2, B4 e I2 presentan una capacidad fermentativa de azúcares como la glucosa más eficaz en comparación con C2 y J2 que presentaron fermentación a partir de las 48 horas.

En cuanto a la evaluación de la tolerancia al etanol, cuando se mantiene el medio en 0% de etanol adicionado, todos los cultivos las primeras 48 horas presentan una viabilidad bastante alta y aceptable para su aplicación en la industria de la cerveza; pasadas las 72 horas se ve disminuido su crecimiento lo que concuerda con los estudios previos que a los 3 días con 12% de etanol se va a ver inhibida la viabilidad celular. No se ve una variación significativa al emplear 3% de etanol en el medio, sin embargo, al adicionar 6% de etanol, en las primeras 48 horas ya se genera una variación significativa dejando a los cultivos B2, B4 e I2 como aquellos que presentan una mayor viabilidad; así mismo, al agregar 9% de etanol a los medios y a las 48, 72 y 96 horas se generan variaciones en los cultivos por lo que se determina que B2, B4 e I2, presentan una mayor tolerancia al etanol ya que C2 y J2 presentan inhibición del crecimiento a este porcentaje de alcohol, lo que descarta a estos cultivos para su aplicación en la producción de cerveza.

Como resultado de la secuenciación NGS Amp ITSA1, 20000R, ITS86F-ITS4, para amplicón para filogenética de hongos y levaduras se determinó que las tres muestras aisladas taxonómicamente se clasifican como *Saccharomyces sp.*

Fue posible aislar una cepa de levadura que presenta capacidad fermentativa de azúcares y resistencia alcohólica al crecer en un medio con etanol al 9%, en condiciones de temperatura 36 °C y pH de 4,2; lo que sugiere ser una cepa con buenas características para la fermentación alcohólica.

5.2 Recomendaciones

Para obtener mejores resultados en cuanto al crecimiento de microorganismos, se recomienda que se inicie con frascos de fermentación, para una vez obtenido el producto fermentado se proceda a realizar la siembra en los medios de cultivo y sea más fácil la replicación de microorganismos que se presenten en el fruto maduro.

Para la obtención de cultivos puros de levaduras se recomienda empezar con un medio que sea selectivo para este tipo de microorganismos, además de que tenga adición de un antibiótico de amplio espectro para evitar el crecimiento de microorganismos que no sean de interés en el estudio como el caso de bacterias.

Se recomienda evaluar la cinética del crecimiento microbiano empleando espectrofotometría para el mejor estudio del microorganismo y análisis de sus características para con esta información conocer el ciclo de vida del microorganismo.

Emplear de una forma práctica la levadura obtenida en este trabajo experimental para determinar la capacidad y rendimiento en la producción de etanol, además de evaluar la eficiencia de este microorganismo para su aplicación en la industria.

Se recomienda continuar con futuras investigaciones acerca del empleo de microorganismos aplicados en la industria para mejorar la producción y generar lazos tecnológicos que cambien la matriz productiva del país.

Referencias bibliográficas

- Acevedo Casas, A., Aguilar González, N., De la Garza Toledo, H., Morlett Chávez, J., Montet, D. y Rodríguez Herrera, R. (2015). Importancia de las levaduras no-Saccharomyces durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia*, 23(65), 73–79. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67443217010>
- Acosta Ovallos, A. K. (2019). *Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander*.
- Aguirre Mendoza, Z., Aguirre Mendoza, N. y Muñoz Ch, J. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 523–542. <https://doi.org/10.22497/ARNALDOA.242.24206>
- Almeida Lasso, R. y Betancourt Alvarez, A. (2015). Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica. *Tesis*, 1–108. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Amaya, N. y Rincón, H. (1989). Contribución al estudio de la uva camarona (*Macleania rupestris* HBK) y su posible utilización en la industria alimenticia. In *Undergraduate thesis. Department of Chemistry, Universidad Nacional de Colombia, Bogota*. <https://tinyurl.com/5exuw9wj>
- Barbosa Piló, F., Carvajal Barriga, J., Guamán Burneo, C., Portero Barahona, P., Morato Dias, A., Daher de Freitas, L., Oliveira Gomes, F. y Rosa, C. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.002>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C. y Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 359–377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Caiza Caizalitin, K. G. (2022). Elaboración de una barra energética a base de *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm. como suplemento alimenticio. .2005–2003 ,8.5.2017 ,7787
- Cajas, P., Cauja, L. y León, F. (2021). *Plan de negocio para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de la cerveza artesanal en la ciudad de Guayaquil*. 6.
- Calvillo, E. (2017). La Cerveza Artesanal Una experiencia multisensorial. *Deloitte*, II, 32. <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/mx/Documents/consumer-business/2017/Cerveza-Artesanal-Mexico-2017.pdf>
- Carrillo Mendívil, M. (2008). *Manual de prácticas: Microbiología y biotecnología*.
- Carvajal, E. (2010). *Levaduras ancestrales aisladas de antiguos recipientes de fermentación de la meseta de Quito*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=108234>
- Coba, G. (2021). *El número de marcas de cerveza artesanal crece un 20% en Ecuador*. 2 de Octubre de 2021. <https://www.primicias.ec/noticias/economia/marcas-cerveza-artesanal-crecimiento->

ecuador/

Condalab. (2019). Agar YPD. *Condalab*, 1–2.

Coronel Navarro, D. A. (2015). Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum*) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica. *Tesis*, 1–100. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>

Díaz Nava, L. (2014). Aislamiento y selección de levaduras para la producción de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce. *Pontificia Universidad Católica Del Perú*, 8(33), 44.

Díaz Yubero, I. (2015). *Cerveza. Distribución y consumo*. https://www.mercasa.es/media/publicaciones/222/1437675314_Alimento_con_historia_cerveza.pdf

Durán Casas, S., Veloza Suan, C., Magnitski, S. y Lancheros, H. (2013). *Contribución al estudio de la uva camarona (Macleania rupestris HBK) y su posible utilización en la industria alimenticia. Undergraduate thesis*. 31(1), 18–26.

Durango Londoño, L. P. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. a nivel de laboratorio*. <https://doi.org/10.1136/bjo.35.3.168>

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>

Garduño García, A., López Cruz, I. L., Ruíz García, A. y Martínez Romero, S. (2014). Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 15(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(14\)72212-7](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(14)72212-7)

Ghareib, M., Youssef, K. A. y Khalil, A. A. (1988). Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiologica*, 33(6), 447–452. <https://doi.org/10.1007/BF02925769>

Gisbert Verdú, M. (2016). Diseño del proceso industrial para la elaboración de cerveza. *Universidad Politécnica de Valencia. Campus de Alcoy*, 78. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/73275/Diseño_y_puesta_en_marcha_de_una_planta_elaboradora_de_cerveza.pdf?sequence=3

Gonzalez, S. (2019). *Implementación De Bpm Y Haccp En La Elaboración De Cerveza Artesanal*. http://www.unsam.edu.ar/institutos/incalin/repositorio/TIF_Alimentos/González_Silvia.pdf

Guamán Burneo, C. y Carvajal Barriga, J. (2009). *Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador Introducción*. 1352, 2–3.

Heredia Peñafiel, K. y Kwok Tacan, E. (2015). *Aislamiento e identificación de taxa de levaduras*

presentes en el fruto de taxo (Passiflora mollissima), con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.

- Hernández, N. (2018). *Manual de microbiología*. <https://urural.edu.gt/wp-content/uploads/2018/02/5.-Manual-de-Microbiología.pdf>
- Hill, A. E. (2015). Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. In *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782423317000071>
- Jernigan, D. H. (2009). The global alcohol industry: An overview. *Addiction*, 104(SUPPL. 1), 6–12. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2008.02430.x>
- Kurtzman, C., Fell, J. y Boekhout, T. (2011). The yeasts : A taxonomic study. *Elsevier Science & Technology*.
- Kwolek-Mirek, M. y Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14(7), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Leon, M. y Jaimes Portilla, J. (2018). Efecto de la pasteurización y la temperatura de incubación en la fermentación alcohólica del mosto de mora. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 15(2), 45. <https://doi.org/10.24054/16927125.v2.n2.2017.2967>
- López de la Maza, L., Zumalacárregui de Cárdenas, L. y Pérez Ones, O. (2019). Análisis de componentes principales aplicado a la fermentación alcohólica. *Revista Científica De La UCSA*, 6(2), 11–19. <https://revista.ucsa-ct.edu.py/ojs/index.php/ucsa/article/view/13/13>
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D. y Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(10), 999–1002. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2634>
- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A. y Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7), 759–773.
- Nieto, H. (2009). Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. [Escuela Politécnica del Ejército]. In *Departamento de Ciencias de la Vida Ingeniería en Biotecnología*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/990/1/T-ESPE-026782.pdf>
- Paredes, M. y Yugsi, I. (2016). *Identificación molecular de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de pitahaya (Stenocereus queretaroensis f.a.c Weber)*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.
- Parés, R. y Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. <https://tinyurl.com/2p8sdtuy>

- Pedraza, P., Valencia, R., Montúfar, R. y Santiana, J. (2019). *Especies de Ericaceae*. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500173>
- Renneberg, R. (2019). *Biotecnología para principiantes*. <https://tinyurl.com/ybt39c2r>
- Rodríguez, L. (2020). *Caracterización biométrica y productiva de frutos de las especies Macleania rupestris y Cavendishia nitida (Ericaceae)*. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/50869>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S. y García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Salcedo, M. (2008). *Aislamiento y Selección de Levaduras Fermentadoras de Melaza de Caña de azúcar (Saccharum officinarum)*.
- Sánchez, C. L., Franco, L., Bravo, R., Rubio, C., Rodríguez, A. B., Barriga, C. y Cubero, J. (2010). Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Revista Espanola de Nutricion Comunitaria*, 16(3), 160–163. [https://doi.org/10.1016/S1135-3074\(10\)70034-X](https://doi.org/10.1016/S1135-3074(10)70034-X)
- Sanz Cervera, S. (2011). Prácticas de microbiología. In *Universidad de la Rioja* (Vol. 2).
- Shiroma, S., Jayakody, L. N., Horie, K., Okamoto, K. y Kitagaki, H. (2014). Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 1002–1012. <https://doi.org/10.1128/AEM.03130-13>
- Siccha Sánchez, R. E. (2021). *Aislamiento de levaduras Saccharomyces spp a partir de bayas de uva para su aplicación en procesos de fermentación de cerveza* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://tinyurl.com/2p8rshmk>
- Sicilia, L. M. y Cuesta, S. F. (2007). Capitulo11.pdf. *Asociacion Española de Micologia, Capítulo 3, capitulo 11*. 11-1 al 11–19. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
- Simbaña, J. y Carvajal, J. (2019). Molecular, Fermentative and Sensorial Characterization of Ecuadorian Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* for the Industrial Production of Beverages. *Pontifica Universidad Católica Del Ecuador*, 1–28. <https://tinyurl.com/5898cp2r>
- Suárez Díaz, M. (2013). Cerveza: componentes y propiedades. *MBtA*, 99. [http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_Maria Suárez Diaz.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_Maria%20Suarez%20Diaz.pdf)
- Suquillo Bermeo, M. (2022). *Caracterización fisicoquímica, nutricional, evaluación del potencial antioxidante del extracto micro encapsulado mediante secado por aspersión y su formulación de Macleania rupestris (Kunth) A.C. Sm. Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigac. 8.5.2017, 2003–2005*.
- Tovar, J. y Martínez, F. (2017). Microbiología general. Manual de Laboratorio. *Universidad Autónoma De San Luis Potosi Facultad De Ciencias Químicas. Carrera De Químico*

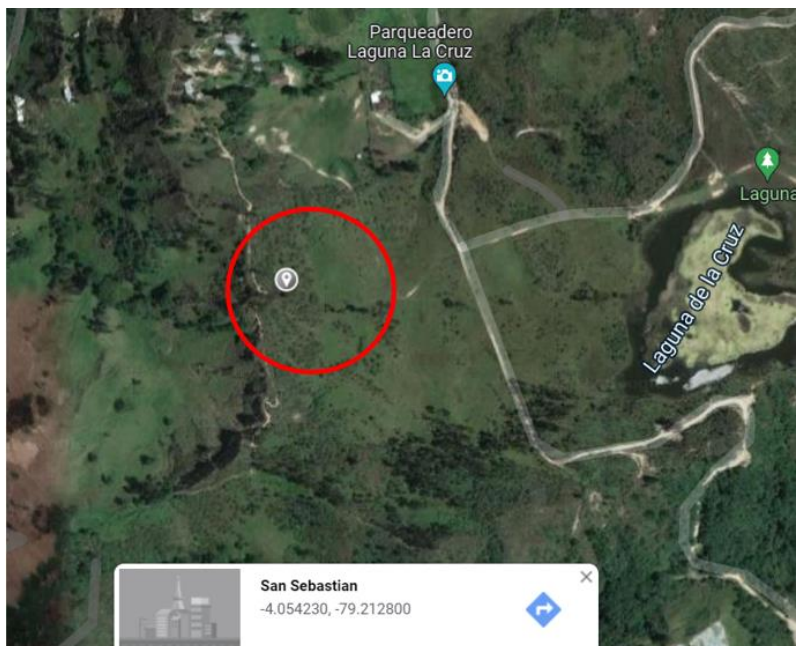
Farmacobiólogo, 6, 1–78. <https://tinyurl.com/y5sus656>

Vásquez C, J. A., Ramirez Castrillón, M. y Monsalve F, Z. I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>

Wolf, K. (1996). Nonconventional yeasts in biotechnology : A handbook. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6>

Anexos

Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo.



Nota: Imagen modificada por el autor para identificación del lugar de muestreo. Fuente: Google Earth, 2021.

Anexo 2. Disolviendo agar YPD.



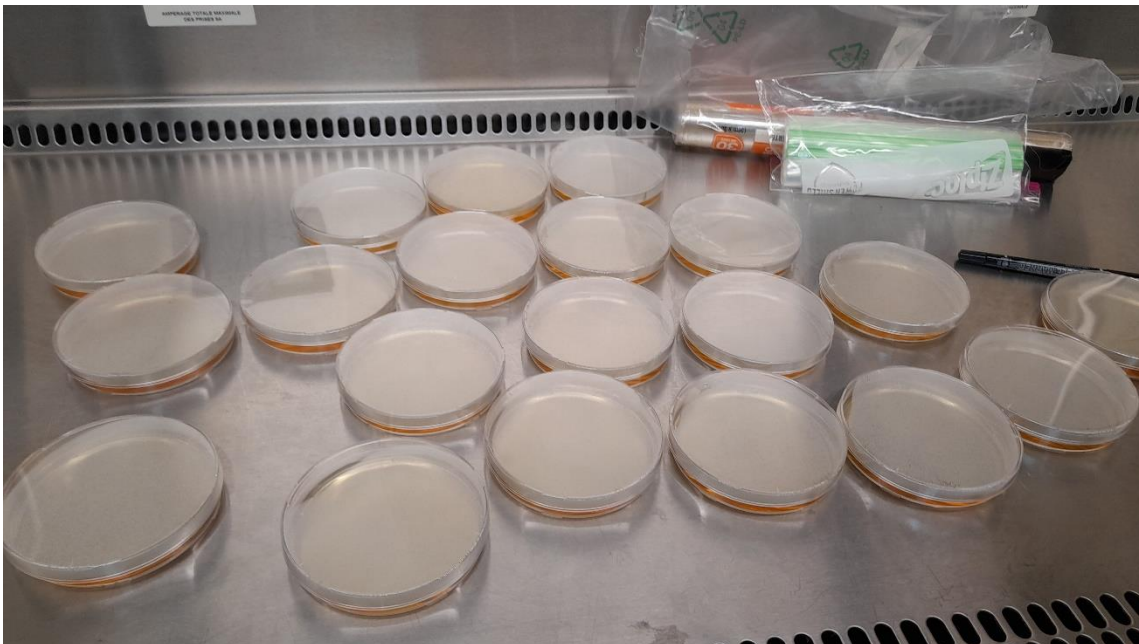
Nota: Imagen tomada por el autor.

Anexo 3. Frutos maduros y picados de *M. rupestris*.



Nota: El frasco contiene agar YPD. Imagen tomada por el autor.

Anexo 4. Agar YPD colocado en las cajas Petri para la resiembra de colonias



Nota: Imagen tomada por el autor.

Anexo 5. Caja Petri.

Nota: Se presenta crecimiento algodonoso lo que indica que no son levaduras. Imagen tomada por el autor.

Anexo 6. Caja Petri.

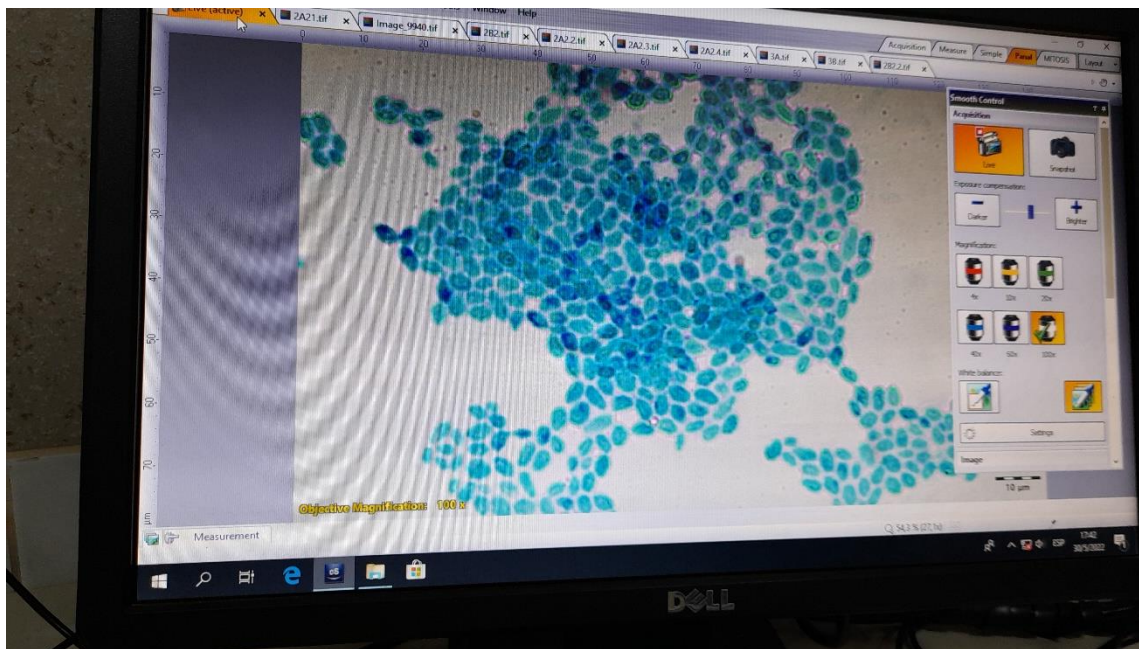
Nota: Se presenta crecimiento de color blanco, es una característica de las colonias de levaduras. Imagen tomada por el autor.

Anexo 7. Caja Petri.

Nota: Se presenta crecimiento de color blanco, es una característica de las colonias de levaduras. Imagen tomada por el autor.

Anexo 8. Porta objetos con las muestras.

Nota: Se empleo azul de metileno para teñir las muestras. Imagen tomada por el autor.

Anexo 9. Observación en el microscopio.

Nota: Se visualiza levaduras, se empleó el lente de 100X. Imagen tomada por el autor.

Anexo 10. Observación en el microscopio.

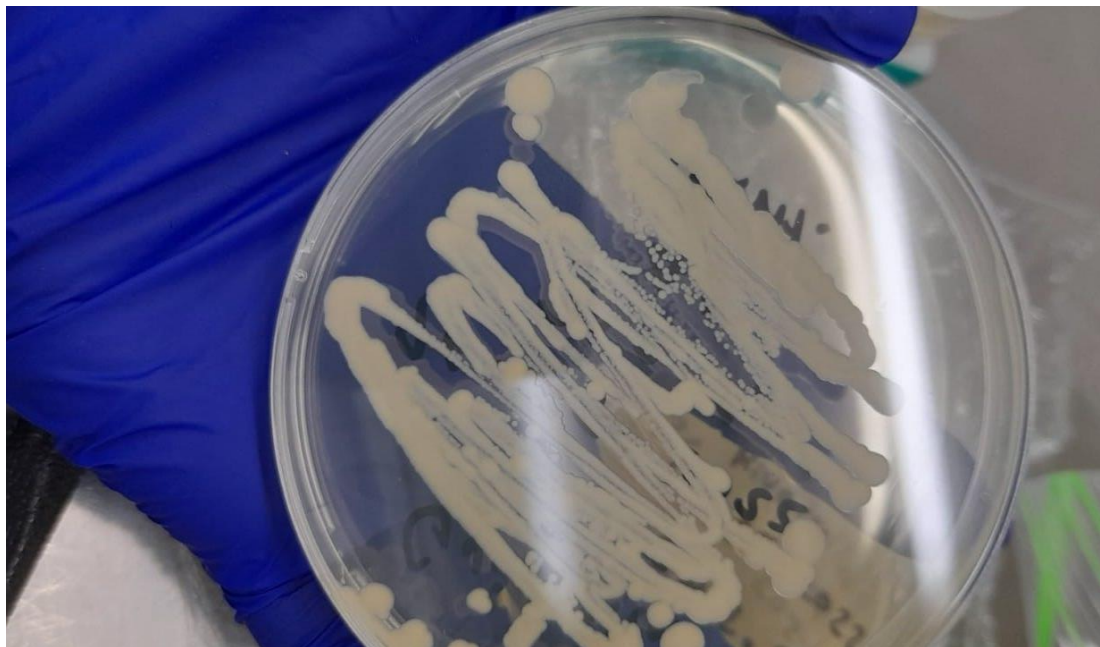
Nota: Debido al tamaño no son levaduras, se empleó el lente de 100X. Imagen tomada por el autor.

Anexo 11. Materiales para la aplicación de gentamicina.

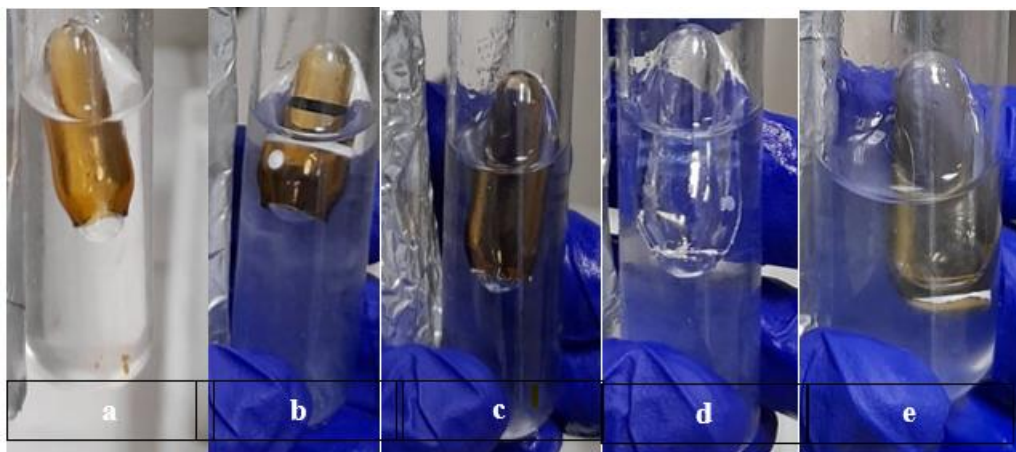
Nota: Se empleó gentamicina para evitar el crecimiento de bacterias. Imagen tomada por el autor.

Anexo 12. Gentamicina.

Nota: Imagen tomada por el autor.

Anexo 13. Caja Petri.

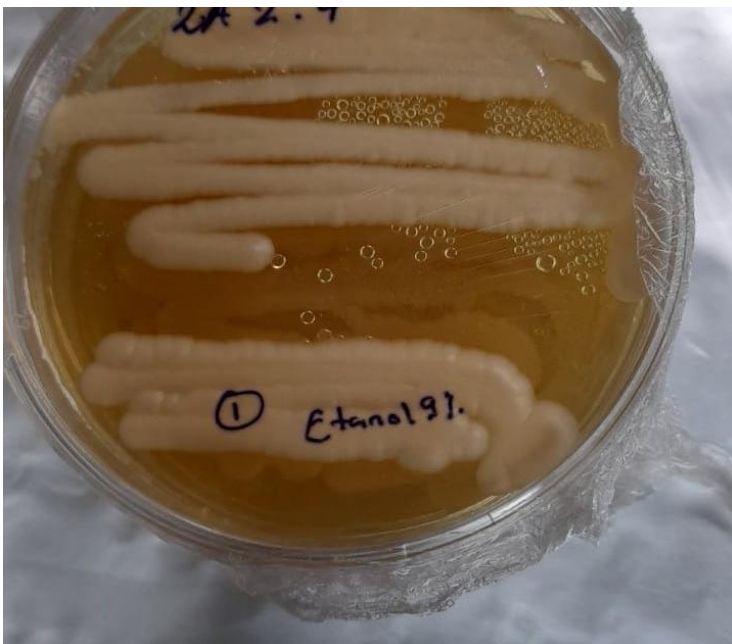
Nota: Crecimiento de cultivo puro de levaduras. Imagen tomada por el autor.

Anexo 14. Prueba de fermentación con campana de Durham.

Nota: Evaluación de los cultivos, a) muestra C2, b) muestra I2, c) muestra B4, d) muestra J2 y e) muestra B3. Imagen tomada por el autor.

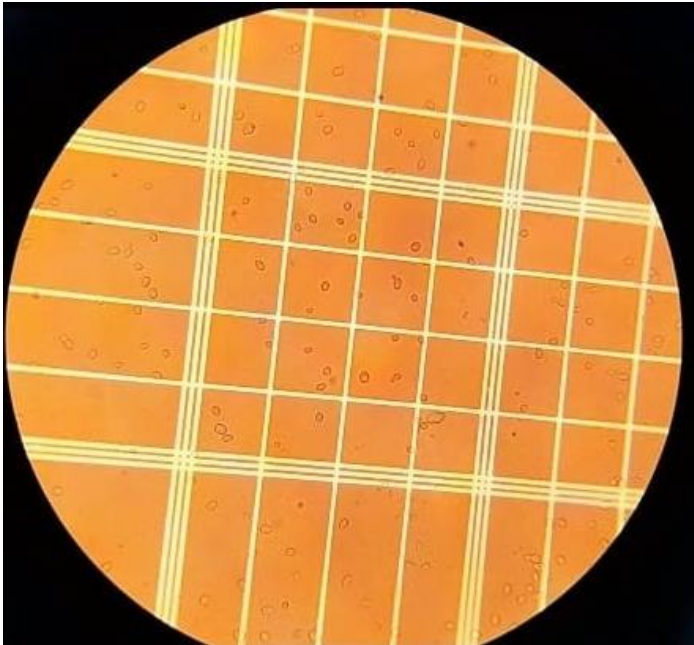
Anexo 15. Caja Petri con 9% de etanol.

Nota: No se evidencia crecimiento de colonias con 9% de etanol. Imagen tomada por el autor.

Anexo 16. Caja Petri con 9% de etanol.

Nota: Se evidencia crecimiento de colonias con 9% de etanol. Imagen tomada por el autor.

Anexo 17. Cámara de Neubauer.



Nota: Se empleó la cámara de Neubauer para el conteo de células. Imagen tomada por el autor.

Anexo 18. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 1.

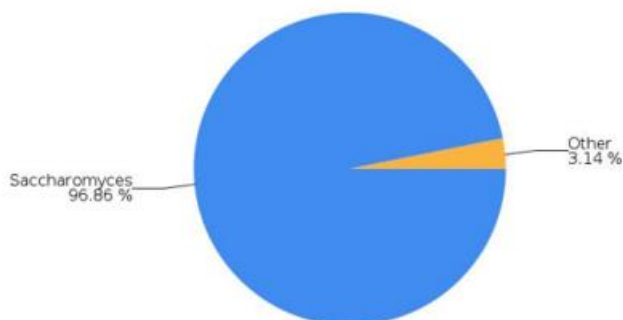
Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Saccharomyces	178,566	96.86 %
Unclassified at Genus level	2,827	1.53 %
Kazachstania	975	0.53 %
Lachancea	199	0.11 %
Ascochyta	182	0.10 %
Vanderwaltozyma	167	0.09 %
Candida	114	0.06 %
Talaromyces	103	0.06 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 197. This table shows the top 8 of 197 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	86,926	47.15 %
Saccharomyces Saccharomyces_sp	85,236	46.24 %
Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	9,191	4.99 %
Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,153	0.63 %
Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	499	0.27 %
Ascochyta Ascochyta_rabiei	162	0.09 %
Talaromyces Talaromyces_ruber	78	0.04 %
Lachancea Lachancea_lanzarotensis	73	0.04 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 207. This table shows the top 8 of 207 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Nota: Resultados obtenidos de la secuenciación en “Biosequence”.

Anexo 19. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 2.

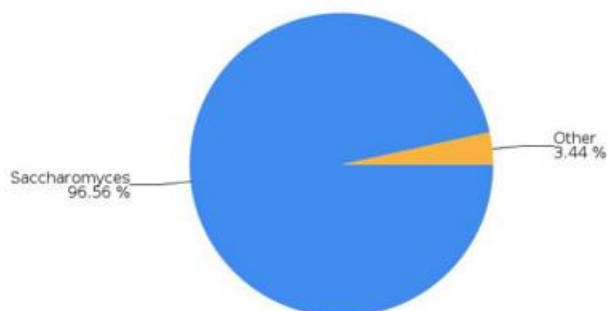
Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Saccharomyces	229,046	96.56 %
Unclassified at Genus level	3,925	1.65 %
Kazachstania	1,465	0.62 %
Ascochyta	282	0.12 %
Lachancea	263	0.11 %
Vanderwaltozyma	227	0.10 %
Candida	147	0.06 %
Talaromyces	145	0.06 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 246. This table shows the top 8 of 246 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	117,222	49.42 %
Saccharomyces Saccharomyces_sp	103,768	43.75 %
Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	12,312	5.19 %
Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,380	0.58 %
Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	632	0.27 %
Ascochyta Ascochyta_rabiei	264	0.11 %
Talaromyces Talaromyces_ruber	115	0.05 %
Lachancea Lachancea_lanzarotensis	96	0.04 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 249. This table shows the top 8 of 249 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Nota: Resultados obtenidos de la secuenciación en "Biosequence".

Anexo 20. Resultados NGS-0201-ITS1 muestra 3.

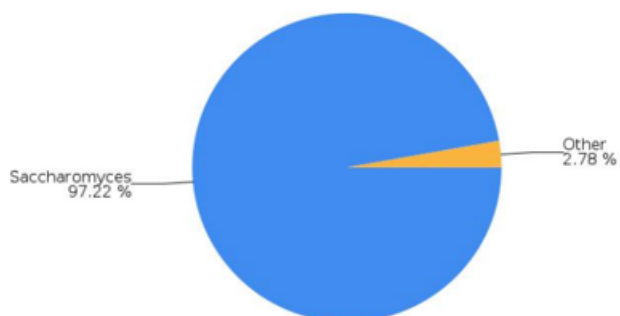
Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Saccharomyces	239,219	97.22 %
Unclassified at Genus level	3,035	1.23 %
Kazachstania	1,252	0.51 %
Ascochyta	258	0.10 %
Lachancea	212	0.09 %
Vanderwaltozyma	169	0.07 %
Talaromyces	138	0.06 %
Candida	118	0.05 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 187. This table shows the top 8 of 187 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	118,369	48.11 %
Saccharomyces Saccharomyces_sp	110,967	45.10 %
Saccharomyces Saccharomyces_eubayanus	12,578	5.11 %
Saccharomyces Saccharomyces_mikatae	1,474	0.60 %
Saccharomyces Saccharomyces_kudriavzevii	720	0.29 %
Ascochyta Ascochyta_rabiei	249	0.10 %
Talaromyces Talaromyces_ruber	120	0.05 %
Penicillium Penicillium_corylophilum	91	0.04 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 191. This table shows the top 8 of 191 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Nota: Resultados obtenidos de la secuenciación en "Biosequence".