

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE TAXA DE LEVADURAS
PRESENTES EN EL FRUTO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum
betaceum*) CON CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA
ALCOHÓLICA**

**AUTORES:
ROBERTO CARLOS ALMEIDA LASSO
ANDRES MAURICIO BETANCOURT ALVAREZ**

**DIRECTORA:
LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN**

Quito, febrero del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

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

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

Quito, febrero del 2015

Almeida Lasso Roberto Carlos

CI: 1716867765

Betancourt Álvarez Andrés Mauricio

CI: 1718119652

Dedicatoria:

Dedico esta tesis a mi familia ya que con su amor incondicional y su apoyo constante, durante todo este tiempo, ayudaron a que yo tenga la predisposición de continuar siempre, son ellos de quienes no dejo de aprender algo nuevo y valioso para mi vida día tras día, sin duda son el único y sincero amor que tengo en mi vida, gracias por soportarme en tantos malos momentos y gracias por tolerarme en otros, este es mi esfuerzo y perseverancia, son mis anhelos y los suyos unidos, es la muestra de un conjunto de situaciones, que de la mano de ustedes las he podido sobrellevar y por las cuales solo puedo y quiero estar eternamente agradecido .

A mis maestros Pablo y Laura quienes nos apoyaron con sus conocimientos, paciencia y amistad, que con el pasar del tiempo se siguen fortaleciendo, gracias por compartir y hacer de las horas de trabajo momentos inolvidables que además de impartir sabiduría también fueron gratas experiencias que ahora son partes de mi vida.

Andrés. B

A Dios, porque me ha permitido llegar a este momento tan especial de mi vida.

A papá Carlos y mamá Anita, porque sin su apoyo jamás hubiera podido alcanzar esta meta, ustedes son mis pilares de vida y mi ejemplo a seguir. Muchas gracias por haberme brindado su apoyo día tras día, y haber sacrificado tanto para ayudarme a llegar a este punto de mi carrera. Los quiero mucho padrecitos.

A mis hermanos y sobrinos, con quienes he pasado tantas alegrías, gracias por estar ahí todos los días y brindarme su apoyo en todo momento.

A Dianita, porque durante todo este tiempo, siempre estuviste a mi lado apoyándome y haciendo de mi mundo algo maravilloso.....a ti mi osita muchas gracias.

A Pablo y Laurita, por haberme apoyado con su tiempo y paciencia para la realización de este trabajo, y en especial por haberme brindado su valiosa amistad.

A Paty y Susy, porque sé que desde el cielo me seguirán cuidando y guiando toda la vida, las extraño mucho.

Roberto A.

Agradecimiento:

A la Ing. Laura Huachi Msc. Por su gran paciencia, oportuna guía y valiosa colaboración en la realización de todas las actividades tanto teóricas como prácticas, en cada fase de la elaboración del presente trabajo de investigación

Al Dr. Pablo Coba, Promotor de este proyecto de investigación, quien brindó su incondicional apoyo para la correcta realización de la presente tesis, ofreciendo en todo momento y de forma desinteresada su tiempo, trabajo y apoyo técnico.

Al Dr. Ever Morales. Por todo el esfuerzo y tiempo invertido para la corrección del presente trabajo de investigación.

A la Universidad Politécnica Salesiana por los valores y enseñanzas impartidas durante toda la carrera Universitaria.

A todos los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de Los Recursos Naturales de la prestigiosa Universidad Politécnica Salesiana, quienes con gran paciencia y perseverancia lograron inculcar nuestro interés por la investigación

Al Químico Christian Larenas Director del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad y a todos los ayudantes de laboratorio del CIVABI, por su gran colaboración y ayuda en la realización de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
Tema.....	2
Objetivos.....	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	2
Justificación.....	3
Hipótesis.....	6
Hipótesis alternativa.....	6
Hipótesis nula.....	6
Variables.....	6
Variables dependientes.....	6
Variables independientes.....	6
CAPÍTULO 1	
MARCO TEÓRICO	
1.1 Industria vinícola.....	7
1.2 El vino y sus tipos.....	8
1.3 La biotecnología en la industria vinícola.....	10
1.4 Tomate de árbol.....	13
1.4.1 Taxonomía.....	14
1.4.2 Características ecológicas.....	15
1.4.3 Localización y distribución.....	15
1.4.4 Enfermedades y plagas del tomate de árbol.....	17
1.5 Levaduras.....	18
1.5.1 Característica generales.....	18
1.5.2 Clasificación.....	18
1.5.3 Aislamiento e identificación de levaduras.....	23
1.5.3.1 Aislamiento.....	23

1.5.3.1.1 Medios de cultivo para aislamiento de levaduras.....	24
1.5.3.2 Identificación de levaduras.....	25
1.5.3.2.1 Métodos de identificación morfológicos.....	25
1.5.3.2.2 Métodos de identificación moleculares.....	29
1.5.3.2.3 Métodos de identificación bioquímicos.....	30
1.5.3.2.4 Otros criterios para identificación.....	34
1.5.3.2.5 Identificación mediante criterios inmunológicos.....	34
1.6 Resistencia alcohólica.....	34
1.7 Fermentación.....	37
1.7.1 Fermentación alcohólica.....	38
1.7.2 Fermentación maloláctica.....	38
1.7.3 Biología de la fermentación.....	39
1.7.4 Condiciones de la fermentación.....	40
1.7.4.1 Temperatura.....	42
1.7.4.2 pH.....	42
1.7.4.3 Aireación.....	43
1.8 Enzimas que intervienen en los procesos fermentativos.....	43
1.9 Proceso fermentativo para la producción de vinos.....	45

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Población y Muestra.....	46
2.1.1 Población.....	46
2.1.2 Muestra.....	46
2.2 Limpieza y Desinfección.....	46
2.2.1 Procedimiento para desinfectar la cámara de flujo laminar.....	47
2.3 Preparación de medios.....	47
2.3.1 Preparación de Caldo YPD para fundas de muestreo de frutos en fundas.....	47
2.3.2 Preparación de Agar YPD Para Trabajo en Laboratorio.....	48
2.3.3 Preparación de Medio Lisina.....	48
2.3.4 Preparación de medio YPD adicionando diversas concentraciones de alcohol.....	49

2.3.5 Preparación de Medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	50
2.4 Muestreo de frutos de <i>Solanum betaceum</i>	51
2.4.1 Muestreo de la fruta en fundas con medio de cultivo y frascos.....	51
2.5 Codificación de las cepas de levadura.....	52
2.6 Aislamiento.....	53
2.6.1 Aislamiento de las taxa de levaduras de fermentación y suspensión.....	53
2.7 Selección de taxa de levaduras por siembra en medio de cultivo selectivo.....	55
2.8 Identificación de cepas de levaduras.....	56
2.8.1 Identificación Macroscópica.....	56
2.8.2 Identificación Microscópica.....	56
2.8.3 Identificación Bioquímica.....	57
2.9 Siembra en medio YPD adicionando diversas concentraciones de alcohol.....	59
2.10 Establecimiento del banco de levaduras.....	60

CAPÍTULO 3

RESULTADOS	62
3.1 Aislamiento y Selección de levaduras.....	62
3.2 Identificación de levaduras.....	68
3.2.1 Identificación Macroscópica.....	69
3.2.1.1 <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	69
3.2.1.2 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	70
3.2.1.3 <i>Cryptococcus neoformans</i>	71
3.2.1.4 <i>Candida krusei</i>	72
3.2.1.5 <i>Cryptococcus neoformans var. uniguttulatus</i>	73
3.3.2 Identificación Microscópica.....	75
3.3.2.1 <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	75
3.3.2.2 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	77
3.3.2.3 <i>Candida krusei</i>	78
3.3.2.4 <i>Cryptococcus neoformans var. uniguttulatus</i>	79
3.4 Pruebas de Identificación Bioquímica.....	81
3.5 Tolerancia al etanol.....	85

3.6 Banco de cepas útiles en procesos fermentativos.....	96
CONCLUSIONES	98
RECOMENDACIONES	99
LISTA DE REFERENCIAS	100
Anexos.....	111
Glosario.....	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Consumo de oxígeno de las levaduras en mosto de diversas cepas de uva (<i>Vitis vinifera</i>).....	11
Tabla 2.	Taxonomía del tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).....	14
Tabla 3.	Condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de tomate de árbol.....	16
Tabla 4.	Exportación de tomate de árbol ecuatoriano por año.....	17
Tabla 5.	Composición nutricional de medio de cultivo YPD agar /litro.....	25
Tabla 6.	Composición de pocillos de reacción de remmel rapID Yeast Plus System.....	32
Tabla 7.	Principios y componentes de remmel rapID™ Yeast Plus System....	33
Tabla 8.	Localidades de muestreo de frutos de <i>Solanum betaceum</i>	46
Tabla 9.	Cantidades de etanol utilizadas en la preparación de medio YPD agar alcoholizado.....	49
Tabla 10.	Ejemplo de codificación de Cajas Petri utilizada por los autores.....	52
Tabla 11.	Principales cepas de levadura aisladas del fruto de <i>Solanum betaceum</i>	62
Tabla 12.	Análisis de crecimiento de levaduras de <i>Solanum betaceum</i> en medio Lysine médium.....	66
Tabla 13.	Descripción macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
Tabla 14.	Descripción macroscópica de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	70
Tabla 15.	Descripción macroscópica de <i>Cryptococcus neoformans</i>	71
Tabla 16.	Descripción macroscópica de <i>Candida krusei</i>	72
Tabla 17.	Descripción macroscópica de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>uniguttulatus</i>	73
Tabla 18.	Imagen microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con lente de 100 aumentos (100X).....	75
Tabla 19.	Imagen microscópica de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> con lente de 100 aumentos (100X).....	77
Tabla 20.	Imagen microscópica de <i>Candida krusei</i> con lente de 100 aumentos (100X).....	78

Tabla 21.	Imagen microscópica de <i>Cryptococcus neoformans</i> con lente de 100 aumentos(100X).....	79
Tabla 22.	Resultados colorimétricos de pocillos de reacción e identificación de levaduras en software Eric®.....	81
Tabla 23.	Porcentaje de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa TA1 F6 R2-3 (1y2)) y (cepaTA3 D12 R21-2-5) en medio Etanolizado....	82
Tabla 24.	Porcentaje de crecimiento de cepas de levadura No- <i>Saccharomyces</i> en medio con diferentes concentraciones de etanol.....	91
Tabla 25.	Ubicación de tubos CRIOBANK ® en contenedor.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.	Proceso de elaboración del vino.....	7
Figura 2.	Vista microscópica de <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 3.	Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura.....	41
Figura 4.	Esquema del proceso fermentativo en la producción de vinos.....	45
Figura 5.	Porcentaje de levaduras obtenidas del fruto de tomate de árbol clasificado por color de la colonia.....	62
Figura 6.	Cantidad de levaduras de géneros <i>Saccharomyces</i> y No- <i>Saccharomyces</i> presentes en <i>Solanum betaceum</i>	67
Figura 7.	Reacción colorimétrica de pocillos 1 al 5 de Remmel Rap ID Yeast Plus System en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
Figura 8.	Reacción colorimétrica de pocillos 7 al 14 de Remmel Rap ID Yeast Plus System en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
Figura 9.	Reacción colorimétrica pocillos 16 al 18 de prueba Remmel Rap ID Yeast Plus System en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
Figura 10.	Porcentaje de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa TA3 D12 R 21- 2-5 a diferentes concentraciones de alcohol en un periodo de incubación determinado.....	86
Figura 11.	Porcentaje de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa TA1 F6 R2-3 (1y2) a diferentes concentraciones de alcohol en un periodo de incubación determinado.....	86
Figura 12.	Imágenes testigo de Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cepa (TA3 D12 R 21- 2- 5) a diferentes concentraciones de etanol.....	87
Figura 13.	Imágenes testigo de crecimiento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> cepa TA1 F6 R2-3 a diferentes concentraciones de etanol.....	88
Figura 14.	Porcentaje de crecimiento de <i>Candida krusei</i> a diferentes concentraciones de etanol en relación al tiempo de incubación.....	92
Figura 15.	Porcentaje de crecimiento de <i>Cryptococcus neoformans</i> a diferentes concentraciones de etanol relación al tiempo de incubación.....	92
Figura 16.	Porcentaje de crecimiento de <i>Rodothorula mucilaginosa</i> a diferentes	

	concentraciones de etanol en relación al tiempo de incubación.....	94
Figura 17.	Porcentaje de crecimiento de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>uniguttutulatus</i> a diferentes concentraciones de etanol en relación al tiempo de incubación.....	94
Figura 18.	Conservación de cepas en crioviales.....	97

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Elaboración y dispensación de medio de cultivo YPD y YPD + Etanol.....	112
Anexo 2.	Muestreo del fruto de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).....	113
Anexo 3.	Fermentación de 72 horas de muestra de tomate de árbol.....	114
Anexo 4.	Aislamiento de levaduras a partir de muestras del fruto maduro de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).....	115
Anexo 5.	Tabla de muestreo del fruto de tomate de árbol.....	116
Anexo 6.	Descripción macroscópica de las 36 cepas de levaduras encontradas en el fruto de <i>Solanum betaceum</i>	118
Anexo 7.	Procedimiento de siembra de muestras microbianas provenientes del tomate de árbol en medio YPD+Etanol.....	124
Anexo 8.	Procedimiento de realización y lectura de pruebas Remmel Rap ID Yeast Plus System.....	125
Anexo 9.	Fichas electrónicas de identificación de levadura en software Eric.....	126
Anexo 10.	Reacción de identificación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa TA1F6R2-3 (1y2)].....	132
Anexo 11.	Preparación y etiquetado de tubos de conservación CRIOBANK.....	133

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de aislar e identificar levaduras del género *Saccharomyces*, del fruto del tomate de árbol (*Solanum betaceum*), mediante análisis de identificación macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, además de pruebas de selección con medio de cultivo selectivo Lisina.

Se identificó dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de las 57 muestras de fruto de tomate de árbol maduro correspondiente al 6% de cepas de levaduras aisladas, y el restante 94% correspondiente en su mayoría a géneros *Rhodotorula*, *Candida* y *Cryptococcus*.

Tras su aislamiento e identificación, se expuso las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a medio de cultivo YPD adicionado con 6.0, 8.0 y 10.0°GL de Etanol, evidenciando 100% de crecimiento de la cepa expuesta a 6.0°GL, 90% de crecimiento a 8.0°GL, y 60% de crecimiento a concentración de 10.0°GL a las 96 horas de incubación. Resultados obtenidos tras comparación de las mismas con el crecimiento la cepa madre inicialmente aislada sin exposición a etanol e incubada a las mismas condiciones de temperatura.

Las cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus* fueron colocadas en viales CRIOBANK® y se congeló a -80°C.

ABSTRACT

The following research work was conducted with the purpose of isolating and identifying yeasts of the *Saccharomyces* gender from the tomato tree fruit (*Solanum betaceum*), by macroscopic, microscopic and biochemical identification analysis in addition to screening tests, through the use of the selective culture medium Lysine.

Two strains of *Saccharomyces cerevisiae* were identified from the 57 samples of mature tomato tree fruit, corresponding to 6% of total isolated yeast strains, and the remaining 94%, corresponding mainly to *Rhodotorula*, *Candida* and *Cryptococcus* genders.

After isolation and identification, the *Saccharomyces cerevisiae* strains were exposed in YPD medium supplemented with 6.0, 8.0 and 10.0° GL ethanol, demonstrating 100% growth of the strain exposed to GL 6.0°, 90% growth at 8.0 ° GL, and 60% growth at a concentration of 10.0° GL after 96 hours of incubation. These results were obtained after comparing the growth masses with that of the main strain, which was isolated in a culture medium without the presence of ethanol and incubated under similar temperature conditions.

The selected strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus neoformans var. uniguttulatus* were placed in conservation vials CRIOBANK® and frozen at -80°C.

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el consumo de vino en Ecuador se limita a determinados estratos socio – económicos, debido al poco interés de la industria local, ha generado grandes dificultades de producción viéndose esto reflejado en una baja calidad de las bebidas elaboradas a nivel nacional y en costos de producción muy elevados. La industria vinícola en el Ecuador está representada por pocas empresas productoras, las cuales han venido utilizando materiales y materia prima importadas para la elaboración de sus bebidas.

El uso de frutos autóctonos Andinos como el Tomate de árbol para la elaboración de sub productos alimenticios y bebidas, se ha visto limitado a la producción de pulpas y mermeladas. Esto debido al desconocimiento de sus propiedades microbiológicas bromatológicas, fermentativas y productivas. Hasta la actualidad estas frutas tienen un elevado potencial industrial el cual sigue siendo desaprovechado. Tal es el caso de la industria licorera, en especial de la industria vinícola, que pese a tener la capacidad de utilizar la gran variedad de frutas andinas e inóculos microbianos propios para la producción de bebidas fermentadas, siguen considerando a la uva como fruta exclusiva para de la producción de vinos, y adquiriendo la levadura a industrias productoras de estárteres microbianos extranjeras.

El principal problema que presenta la industria vinícola ecuatoriana es el desinterés por la investigación microbiológica de frutas autóctonas fermentables; las cuales presentan una microbiota rica en levaduras. Estas a su vez podrían poseer alta resistencia alcohólica y una elevada capacidad fermentativa, llegando a igualar o mejorar las características que poseen las cepas de levadura importadas. La dependencia de inóculos microbianos importados para la producción vinícola, limita la disponibilidad de información útil para ser aplicada en los ámbitos de producción y procesamiento de varios productos alimenticios innovadores. La industria ecuatoriana debería generar investigación en el campo vinícola, aprovechando la gran diversidad de frutos autóctonos, y a partir de estos producir sus propios inóculos microbianos, y de esta manera contribuir con el cambio de la matriz productiva, apoyando al Plan Del Buen Vivir vigente en el país, sustituyendo importaciones,

ahorrando divisas, creando empleo, incrementando la investigación y producción de insumos nacionales.

Este estudio pretende fomentar mediante la investigación microbiológica, al aislamiento e identificación de cepas de levaduras autóctonas a partir del fruto del tomate de árbol, con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, que puedan ser consideradas útiles para el desarrollo de la industria nacional. Esto sin duda permitirá a la industria vinícola nacional obtener una ventaja competitiva con respecto a la industria vinícola global, al elaborar sus propios inóculos microbianos, reduciendo costos de producción, permitiendo poner a disposición de la población un producto competitivo, de calidad y económico.

Tema:

Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*), con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.

Objetivos:

Objetivo General:

Establecer las taxa de levaduras presentes en el fruto de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*), que presenten capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.

Objetivos específicos:

- Aislar levaduras nativas presentes en el fruto maduro de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) muestreados en los cantones de Píllaro, Quito y El Chaco.
- Seleccionar las levaduras que presenten características fermentativas y resistencia alcohólica.
- Identificar morfológica y bioquímicamente taxa de levaduras seleccionadas hasta llegar a nivel de género.
- Implementar un banco de cepas de levaduras útiles en procesos fermentativos, aisladas del fruto de Tomate de árbol.

Justificación:

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es una planta nativa de América del Sur. Revelo, Pérez, y Maila (2009), describen que su origen más probable son los bosques Andinos, mientras que el norte de Ecuador y Sur de Perú son considerados como el núcleo de domesticación de la especie (pág.1).

Los cultivos andinos de acuerdo con Guerrero (2012), son parte de las variedades trabajadas ancestralmente por sociedades prehispánicas, constituyendo un gran repositorio de material vegetal con importancia única y trascendental. (pág. 101). Estos cultivos como el Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*), se han adaptado a los ecosistemas de alturas variadas, condiciones climáticas extremas y alta variabilidad climática. Muchos de estos cultivos poseen un alto valor nutricional, desconocido por gran parte de la población, lo que los convierte en frutos de gran interés investigativo.

En la región interandina ecuatoriana la producción de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es todavía deficiente, teniendo como promedio de siembra 0,68 ha. por cada productor, siendo los principales productores los pequeños y medianos agricultores de la región. Según Quinaluisa (2006), en la última década aumentó la producción de tomate de árbol de 1370 ha, en 1993 a 4062 ha, en 2001, motivo por el cual la industria nacional, muestra mayor interés en el procesamiento y manufactura del producto (pág.5).

De acuerdo con Caicedo, Bolaños y Cruz (2008), esta fruta debido a su delicioso sabor, permite abrir mercados tanto nacionales como extranjeros para una amplia gama de productos como: mermeladas, jaleas, conservas, deshidratados, postres, pulpas, licores y vinos, generando gran demanda por parte de la industria alimentaria y licorera (pág. 5)

La razón por la cual se escogió como fruta de estudio al tomate de árbol es por las cualidades nutritivas, organolépticas y de salud del fruto, que se pueden resaltar según Portilla, (2013) son: reducción de colesterol, calmar migrañas, alto contenido de fibra (2.0g/100g de pulpa), vitamina A (150.0ml/100g de pulpa), vitamina C (29.0mg/100g. de pulpa), nivel de calorías (48.0g/100g de pulpa), rico en minerales como: calcio (9.0mg/100g de pulpa), hierro (0.9mg/100g de pulpa) y fósforo

(4.0mg/100g de pulpa); altos niveles de proteína (2.0g/100g de pulpa) y caroteno (0.67mg/100g de pulpa); además, fortalece el sistema inmunológico y la visión, funciona como antioxidante y fuente de vitamina B, principalmente tiamina (0.10mg/100g de pulpa), riboflavina (0.03mg/100g de pulpa) y niacina(1.07mg /100g de pulpa) (pág. 23).

Según Ayala (2011), actualmente en Ecuador existen cinco empresas productoras de vino, dos de las cuales ya tienen reconocimiento a escala internacional. De los vinos que se consumen a nivel nacional, tan solo el 10 % corresponde a producción interna y pese a esta escasa incidencia, las empresas obtienen muy buenos réditos económicos debido al creciente mercado local de consumo (párr.1). Casi la totalidad de la producción nacional de vinos está enfocada en la fermentación del mosto de uva y en la replicación de técnicas ancestrales de vinificación, es por este motivo, que se podría considerar la innovación de estas técnicas y la investigación de frutos ancestrales como el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), una forma estratégica para ganar posicionamiento y entrar en nuevos mercados locales e internacionales.

La industria Ecuatoriana según Villacrés, Martínez, y Pozo (2006), limita sus esfuerzos a la compra e importación del mosto de la fruta junto con los inóculos de producción necesarios, a empresas de investigación extranjeras, lo que nos muestra una total falta de conocimiento de la complejidad de los procesos fermentativos y productivos de vino a partir de frutos ancestrales (pág.15).

La capacidad microbiana puede ayudar a optimizar muchos procesos biotecnológicos, es por esta razón que, el trabajo de aislamiento, identificación y caracterización de especies, que se canalizan en la colección de cepas y taxa en el laboratorio destinadas a un fin productivo, pueden ser el preámbulo para posteriores investigaciones en lo referente al levantamiento de información y de la aplicación tecnológica como la identificación, perfil molecular, taxonomía, ecología o aplicaciones en procesos de la industria alimenticia y de producción vinícola.

La fermentación alcohólica corresponde al proceso más importante en la elaboración del vino, el microorganismo responsable de la fermentación alcohólica de acuerdo con Villacrés et al. (2006), es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; la misma que desarrolla metabolismo aeróbico y anaeróbico; pero solo produce etanol en

condiciones de crecimiento anaerobio y está presente en una gran cantidad de frutas, entre las cuales se encuentra la uva, que hasta el momento sigue siendo considerada como la fruta vinícola por excelencia (pág.17). Sin embargo, las fermentaciones espontáneas no son producto de la acción de una única especie de levadura, sino de una sucesión de cepas diferentes como la *Hanseniaspora* al inicio de la fermentación y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rodotorula*, *Metschnikowia* conforme avanza el proceso, las cuales después de 2 o 3 días reducen su número, dando paso a otras especies más tolerantes al etanol como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* y *Candida colliculosa*, cuyas altas concentraciones microbianas contribuyen de forma significativa a la fermentación e influyen en la composición organoléptica del vino.

La mayoría de las levaduras según Déak y Beauchat (1996), toleran un rango de pH entre 3.0 y 10.0, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4.5 a 6.5 (pág.4). Al ser el pH del tomate de árbol de 3.76, convierte a esta fruta en un sustrato ideal para el crecimiento de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* por la acidez que presenta.

La investigación microbiológica de frutos fermentables locales como el tomate de árbol, permitiría un significativo desarrollo en la industria local, disminuyendo la necesidad de comprar insumos en el exterior, mediante el uso de cepas de levaduras locales para la producción vinícola, cepas que presentan una mejor adaptabilidad a las condiciones ambientales y climáticas debido a la zona de producción, por estas razones el estudio microbiológico del tomate de árbol aportaría al crecimiento potencial de la pequeña industria de nuestro país, este documento, pretende ser una herramienta útil para la producción de inóculos microbianos locales, provenientes del tomate de árbol, con el objetivo de generar beneficios económicos y sociales para su negocio propio, su comunidad y el Ecuador entero, poniendo en evidencia el plan del buen vivir ya que comparte los ideales de la convivencia armónica con la naturaleza al extraer sus beneficio sin necesidad de destruir su ecosistema.

Hipótesis:

Hipótesis alternativa:

Levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica pueden ser aisladas del fruto de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Hipótesis Nula:

Levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica no pueden ser aisladas del fruto de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Variables:

Variables Dependiente:

Especies de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica en el fruto y fermentación de tomate de árbol.

Variables Independientes:

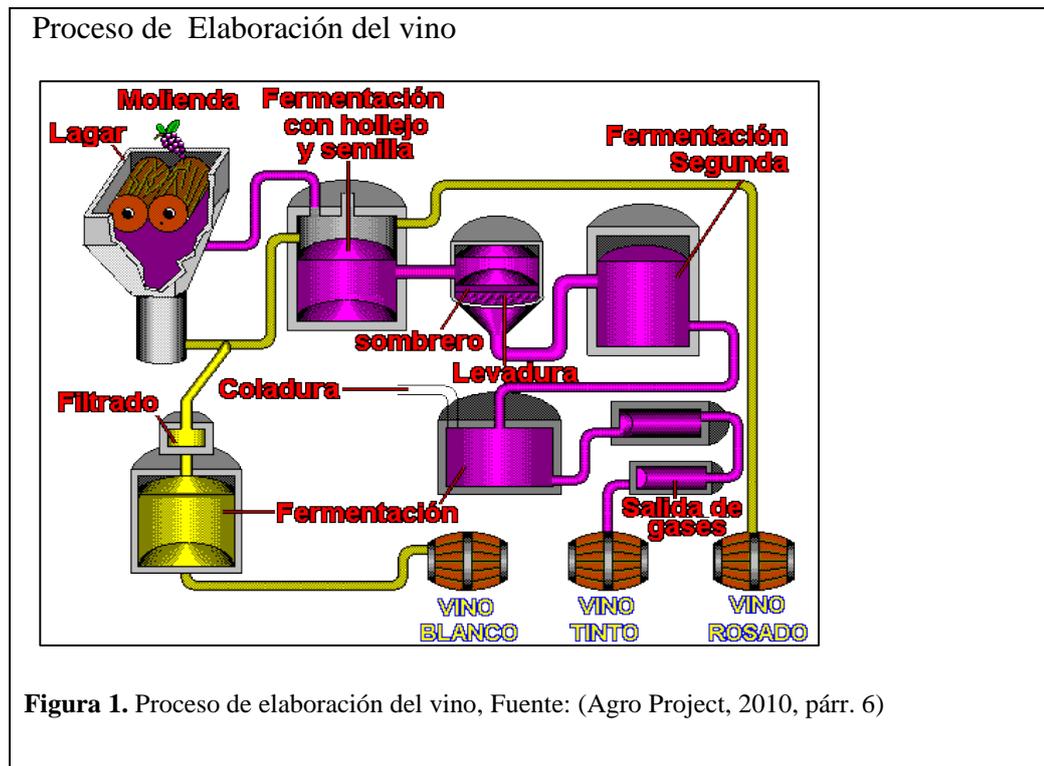
Especies de levaduras, nutrientes; temperatura; pH; capacidad fermentativa; humedad; porcentaje de etanol utilizado al que las levaduras muestran resistencia.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Industria vinícola:

El vino es una bebida que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica de una fruta (ver gráfica 1), sea fresca o madura, o del mosto de la fruta fresca, con un contenido mínimo de alcohol del 7.0%. La superficie vinícola global, en el año 2007 fueron cultivadas 7.9 millones de hectáreas, el 63.0% perteneció a Europa, el 15.0% a Asia, el 13.0% a América y el 7.0% correspondiente a África. La producción de vinos a nivel mundial es de 270 millones de hectolitros, de los cuales el 47.0% de esta producción pertenecen a Italia, Francia y España. Organización Internacional del Vino. (OIV, 2007, pág.11)



1.2 El vino y sus tipos:

Para conocer las distintas clases de vinos, se debe comprender el efecto que las levaduras poseen sobre los polifenoles. La pared celular de las levaduras se encuentra compuesta por varios polisacáridos como los glucanos y las manoproteínas. Cada cepa de levadura presenta una diferente pared celular y varían en la fineza de su pared. Desde hace mucho tiempo se conoce que al morir la levadura por medio de autólisis, libera la mayoría de su materia, incluyendo el material que se encuentra en su pared celular. Al final de los años 80, encontraron que se liberan también polisacáridos durante la fermentación alcohólica, y esta liberación varía de una cepa a otra, algunos de estos polisacáridos liberados tienen la propiedad de poder ligarse a algunos taninos y antocianos, se ha comprobado que las manoproteínas forman complejos junto con los compuestos antes mencionados, provocando que los vinos disminuyan su astringencia y muestren una estabilidad en su color, los vinos que han sido fermentados con estos tipos de cepas muestran ser más suaves según un panel de cata. (Laurent y Palacios, 2001, pág.4).

- **Vino tinto:**

Se caracteriza por sus dos fermentaciones, la primera, es la alcohólica en la cual las levaduras desdoblan los azúcares en alcohol desprendiendo anhídrido carbónico en el proceso, el mosto se demora de 6 a 10 días en fermentar, durante el proceso se producirá el incremento de temperatura, esto determinará la ebullición del mosto, en el proceso de ebullición se irá formando el sombrero que son las pepitas y las pieles que suben a la superficie del mosto. El vino que se obtiene en este proceso sale con una graduación de 15°C y se denomina vino en flor, este vino requiere de fermentación maloláctica. El vino obtenido es un vino joven el cual debe ser consumido en el primer año de existencia. (Microsistemas, 2008, pág.6)

- **Vino blanco:**

De acuerdo con Microsistemas (2008) se obtiene a partir del estrujado de uvas blancas, a este estrujado se lo deja reposar dejando que poco a poco vayan cayendo las gotas en un recipiente por la fuerza de gravedad, este mosto obtenido es mezclado con ácido sulfuroso, con el fin específico de

retrasar la fermentación (p 7). Este vino se diferencia del vino tinto ya que no se utiliza el bagazo sino solo la uva, el final de la fermentación espontánea es producido cuando en el mosto no existen más de 4.0 a 5.0 g de fruta por litro, a esto se le conoce como vino seco.

- **Vino rosado:**

Es similar a la vinificación del vino blanco, solo que en esta se debe mezclar uva blanca y una uva tinta, antes de la fermentación se debe macerar el mosto para que el color pueda salir y se obtenga un vino rosado. (Microsistemas, 2008, pág.7).

- **Cava:**

Microsistemas (2008) menciona que, este tipo de vino proviene de España, su elaboración requiere de la combinación de 4 uvas: xarelo, macabeo, parellada y rioja viura, se debe realizar el vino blanco de cada una de estas uvas por separado, después se mezclan los cuatro vinos, este vino debe permanecer en la botella durante 3 años para después ser consumido, es clasificado por su grado de dulzura en (p 8):

- Brut nature: no tiene azúcar ni licor de expedición.
- Extra brut: de 0.0 a 6.0 g de azúcar por litro.
- Brut: de 0.0 a 15.0 g por litro.
- Extra seco: de 12.0 a 20.0 gramos por litro.
- Seco: de 17.0 a 35.0 g por litro.
- Semiseco: de 33.0 a 50.0 g por litro

- **Gran-vas:**

Es un vino espumoso, este es producido en grandes tanques de acero inoxidable, en este proceso se añaden azúcar y levaduras que actúan durante 15 días, luego se clarifica y se filtra para embotellarlo. (Microsistemas, 2008, pág. 8).

- **Transfer – fermentación en botella:**

Es un vino espumoso que se inicia con el llenado en botella de un vino conjuntamente con azúcares y levaduras, se tapa la botella y se deja reposar

durante 2 meses, luego de este periodo se traspa el vino a otra botella nueva, se caracteriza porque, en su tapón lleva un rectángulo en la parte de abajo. (Microsistemas, 2008, pág.9).

- Champán:

Este es un vino espumoso que se elabora de uvas blancas y negras. Se deja fermentar el mosto de uvas durante cuatro semanas junto con azúcar de caña y levadura, esto produce el anhídrido carbónico característico del champán (Microsistemas, 2008, pág.9).

- Vinos de jerez:

Se caracterizan por poseer una alta graduación, por esta característica también se los conoce como vinos generosos, la variedad de uva utilizada para la elaboración de este vino es la palomino, se lo fabrica mediante la fermentación y posterior sedimentación, este vino puede llegar a alcanzar desde los 15.0° GL. hasta los 18° de alcohol. (Microsistemas 2005, pág.9).

1.3 La biotecnología en la industria vinícola:

La biotecnología presenta diversas aplicaciones en la industria vinícola, puede abarcar todo el proceso productivo, iniciando desde el cultivo de la fruta de la cual se obtendrá el vino, esto comprende el riego, manejo del suelo, microflora y todos los factores asociados hasta la valorización de los residuos de la producción, o el uso de los componentes del vino que sirvan para potenciales aplicaciones en la industria cosmética o farmacéutica. De acuerdo con Lavarello, Gutman y Filipetto (2011), las áreas en las que la biotecnología permite obtener mejoras en el campo vinícola industrial son: (pág. 177).

- Planta:

Por medio de la biotecnología se puede lograr la mejora en la calidad de la uva, se aumentan tanto la resistencia al estrés como a las enfermedades y al estrés, también optimiza la identificación y disminuye los factores que impiden la producción.

- Fermentación:

Ayuda a la mejora de las características de las levaduras, permite seleccionar las mejores cepas, facilita los procesos de fermentativos y mejora las características organolépticas de los vinos. La importancia de la biotecnología en el tiempo actual representa dentro de la industria vinícola se encuentra reflejada en el creciente número de países que han implementado centros de biotecnología aplicada hacia la industria vinícola, como: Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Estados Unidos, Alemania, etc. Estas instalaciones demuestran el interés que la biotecnología tendrá a medio y largo plazo en la industria. (Lavarello, Gutman y Filipetto, 2011, pág.178)

Tabla 1:
Consumo de oxígeno de las levaduras en diversos mosto de uva (*Vitis vinífera*)

Cepas Tintas	Consumo de oxígeno (g/min)	Cepas Tintas	Consumo de oxígeno (g/min)
Pinot noir	438	Maccabeo	355
Gamay	376	Muscat de frontignan	273
Grenache	311	Savagnin	257
Merlot	307	Pinot blanc	257
Syrah	285	Ugni blanc	252
Cabernet-Sauvignon	273	Colombard	246
Cinsaut	256	Merlot blanc	234
Mourvedre	251	Sylvaner	234
Aramon	165	Chardonnay	211
Carignan	165	Muscadelle	211
		Chenin blanc	211
		Sémillon	194
		Terret	170
		Muscat d' Alexandrie	159
		Riesling	157

Notas: Consumo de oxígeno de levaduras en mosto de Uva. (Claude y Flanzky, 2003, pág.235)

En la actualidad, las actividades vinícolas requieren del estudio de nuevas técnicas agronómicas, sin olvidar saberes tácitos ancestrales de los viticultores. La industria vinícola ha incrementado mediante la nueva tecnología implementada, por los saberes artesanales de los enólogos, y por la selección de cepas de levaduras que presenten una alta tasa fermentativa. La acumulación de capital determina el avance en la industrialización de los procesos que se requieren para obtener vino de calidad,

para lograr esto se deberá asegurar, la reducción de los tiempos de rotación del capital y llegar a alcanzar una producción a gran escala. Mediante la biotecnología se pueden llegar a cumplir los puntos antes expuestos, a partir de la identificación, selección y modificación de las levaduras, las innovaciones en nuevas levaduras permiten controlar, agilizar y producir procesos fermentativos confiables, los cuales son esenciales para llegar a conseguir vinos que posean gustos consistentes y calidad predecible, por estas razones la biotecnología se convierte en una herramienta importante para la industria vinícola. (Antonelli, 2011, pág. 177).

En el Ecuador de acuerdo con la Universidad Técnica de Ambato, UTA (2007) elaborar vino no es una tradición, pero existe la tradición de elaborar licores artesanales mal llamados vinos (pág.58). Sin considerar lo anterior, la elaboración de vinos se podría convertir en un proyecto, el cual serviría para hacer sostenibles a los cultivo de frutas típicas del Ecuador. Actualmente, se pueden evidenciar algunos esfuerzos aislados, los cuales desean conseguir productos que poseen altos índices de calidad. Existen muchos factores y requisitos que son necesarios para la obtención de un vino, con calidad final excelente, estos detalles contribuyen para que la elaboración de vino sea una exitosa combinación entre arte y ciencia, los mismos han sido mejorados y perfeccionados por la industria vinícola para llegar a alcanzar estándares de calidad elevados por su esquisito sabor y consistencia, todo esto gracias a los ensayos realizados, investigaciones científicas y protocolos que se han originado a partir de la elaboración del vino.

Las herramientas que permitirán llegar a conseguir productos que posean una aceptación comercial elevada van a ser las variedades de fruta que se utilicen como materia prima, las cepas de levaduras que posean resistencia alcohólica darán al vino un grado alcohólico adecuado, equipos industriales que garanticen un adecuado control del proceso, el uso de aditivos es de vital importancia en cuanto a la producción y conservación de las características organolépticas del vino en el tiempo. Los vinos de frutas representan un reto tecnológico ya que para su elaboración se requerirá realizar varias transformaciones a la materia prima que se desee utilizar para finalmente llegar a un nivel óptimo de calidad, esto representa un reto ya que todas las condiciones están dadas para obtener un vino de uva, pero no para un vino de frutas. Por lo tanto estas transformaciones van a asegurar la viabilidad del proceso, para de esta manera lograr que este sea rentable y se logren

determinar y adaptar todas las condiciones necesarias para la fabricación de un vino de frutas. (UTA, 2007, pág.59).

Al momento en el país existen varias marcas de vino de buena calidad, Pro-Chile (2011), informa que, cada año el consumo de vino es más común en la población ecuatoriana, esto se debe a las propiedades organolépticas y saludables que poseen los vinos. Actualmente el consumo de vino en el Ecuador per cápita es de una botella y media por consumidor (pág.4). El mercado ecuatoriano sigue creciendo, al igual que el número de consumidores que prefieren productos de calidad a buenos precios, que contengan propiedades beneficiosas para su salud, como el poder antioxidante que poseen los vinos.

1.4 Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Esta especie de acuerdo con Riofrio, Arias, Arahana, y Torres (2009), es un arbusto leñoso de 2.0 a 3.0 metros de altura, con fruto de color rojo, naranja o amarillo, de forma ovoide o elipsoide puntiagudo, con gran utilidad en la gastronomía ecuatoriana debido a su alto valor nutricional (pág.75). En la medicina ancestral según Morales y Romero (2009), por su alta cantidad de flavonoides que proporcionan cualidades estimulante, anticolesterolemiantes, analgésicas y antiinflamatorias. (pág.37)

Autores como Revelo et al. (2009), aseguran que, la siembra de esta fruta se la puede llevar a cabo durante todo el año (si se expone a condiciones adecuadas) y se la realiza principalmente mediante el trasplante de plántulas (pág.10).

En un periodo de entre 10 a 14 meses tras el trasplante se puede realizar la primera cosecha, debiendo recolectarse los frutos de forma continua todo el año. La vida altamente productiva de la planta se calcula entre 3 a 4 años, siendo un promedio la de obtención entre 350.0 a 550.0 frutos/planta/año. La capacidad de producción continua de esta fruta, además de su agradable y exótico sabor, y sus adecuadas características enológicas (pH, grados Brix, acidez, composición, etc), por lo que se podría considerar al tomate de árbol como

fruta incluso más útil que la uva en la producción de vinos, esto porque a que a diferencia de la uva la cual tiene un solo periodo de alta productividad al año entre los meses de diciembre a marzo, de acuerdo con Revelo et al. (2009), el tomate de árbol mantiene una producción constante durante toda su vida productiva, pudiendo

de esta forma reducir la estacionalidad de procesamiento del fruto, disminuyendo costos por escasas de materia prima, evitando de esta forma los descensos de producción y pudiendo conservar una distribución constante en el mercado (pág.11).

De acuerdo con Farfán y Zambrano (2010), en Ecuador no existe una clasificación clara del genotipo de esta planta, por lo cual no existen variedades propiamente dichas con excepción del híbrido mora, el cual ya ha sido registrado en Nueva Zelanda (pág.15). Es por este motivo que en el país se lo continúa clasificando de acuerdo a su fenotipo de la siguiente forma:

Tomate Amarillo, Tomate Negro, Tomate Redondo, Tomate Puntón (común), Tomate Rojo, Tomate Amarillo Gigante, Tomate Mora (Neozelandés) y Tomate Mora Ecuatoriano. (Revelo et al. 2009, pág.18).

1.4.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del tomate de árbol se describe en la siguiente y tabla (Caicedo, Bolaños, y Cruz, 2008 (a), pág. 35):

Tabla 2.

Taxonomía del Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Reino	Plantae
División	Angiosperma
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum betaceum</i>
Ecotipos	Común, amarillo puntón, alargado morado y anaranjado, redondo colombiano, tomate mora.

Notas: (Caicedo, Bolaños y Cruz, 2008(a), pág.35)

1.4.2 Características ecológicas

Esta especie según Revelo et al. (2003), corresponde a las zonas de vida bosque húmedo premontano, bosque seco premontano, bosque seco montano y bosque húmedo montano bajo (pág.3).

Los factores ambientales que influyen en el cultivo de tomate de árbol según García M. (2008) y Revelo et al. (2003), se detallan en la tabla 3 presentada a continuación (pág. 93):

Tabla 3.
Condiciones ambientales adecuados para el
cultivo de tomate de árbol.

Temperatura (°C)	17.0 – 19.0
Altitud (m.s.n.m.)	1.800 - 2.200
Precipitación (mm)	1.500 - 2.000
Humedad relativa	70.0%
Radiación:	Cercana a 12.0 horas/día
Vientos:	Libre de vientos fuertes
Pendiente:	No mayor a 40°C
Suelo	Franco-franco arenoso
pH	5.5-6.5

Notas: Condiciones óptimas de cultivo de Tomate de árbol

Elaborado por :Almeida y Betancourt (2014)

1.4.3 Localización y Distribución

Es una planta nativa de América del sur, de acuerdo con Revelo et al. (2009), se encuentra en forma natural en Bolivia, Argentina, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (pág.9). Según Chalapunte y Prado (2005), este es un cultivar autóctono de Ecuador, debido a que se pueden encontrar variedades propias y domesticadas por los pobladores aborígenes, y agricultores a partir de las especies silvestres que se las pueden encontrar todavía en vegetación de montaña. En el país se cultiva en las

provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Azuay y Loja, pero las zonas de Patate y Baños, pertenecientes a la provincia de Tungurahua, se caracterizan principalmente en su producción y venta (pág. 25).

La demanda de este fruto ha aumentado desde hace 15 años, siendo la variedad más demandada la tradicional anaranjada. Este cultivo es la base de la sustentación económica de pequeños agricultores de la zona de los valles interandinos.

El tomate de árbol ecuatoriano es principalmente exportado a Estados Unidos, España y Chile, siendo de acuerdo con Lucas, Maggi y Yagual (2010), EEUU el principal consumidor abarcando aproximadamente el 53.0 % del producto.

Tabla 4.
Exportación de tomate de árbol
ecuatoriano por año

Años	Exportaciones (Toneladas métricas)
2004	1.34
2005	103.45
2006	1.78
2007	21.35
2008	26.02
2009	6.69
2010	10.63
2011	41.92
2012	37.59
Total	250.76

Notas: Estadística del Ministerio de Agricultura y Ganadería (2009)

1.4.4 Enfermedades y plagas del tomate de árbol

La producción a gran escala de tomate de árbol se ha visto afectada por varios factores como: condiciones climáticas, plagas y enfermedades, siendo las plagas y enfermedades aquellas de mayor importancia debido al daño inmediato y a gran escala que estas generan.

- Enfermedades

Entre las enfermedades que más afectan a los cultivos de tomate de árbol según Revelo et al. (2009) se puede citar las siguientes (pág.54):

- Oidium (*Oidium* sp.).
- Phytoptora (*Phytophthora infestans*).
- Alternariosis (*Alternaria alternata*).
- Fusariosis (*Fusarium* sp.).
- Esclerotinia (*Sclerotinia minor*; *Sclerotinia jagger*; *Sclerotinia sclerotiorum*)
- Roya (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)
- Enfermedades provocadas por Virus. (Potyvirus; CMV; ToMV; PLRV) (Jaramillo, 2011, párr. 22)

- Plagas

De acuerdo con Lucas et al (2010), las principales plagas que afectan al cultivo son (pág. 132):

- Pulgones Verde (*Myzus persicae*)
- Pulgón Negro (*Aphis craccivora*)
- Chinche foliado (*Anisoscelis affinis*)
- Gusanos Cortadores (*Agrotis* sp.)
- Nemátodos (*Meloidogyne*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, etc.)

1.5 Levaduras

1.5.1 Características Generales

Las levaduras de acuerdo con Carlile, Watkinson, y Gooday (2001), son hongos constituidos en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoides o alargadas. Unas pocas levaduras presentan hifas, y sus células son conidios (pág. 70).

Estos microorganismos son células muy importantes en el sector biotecnológico industrial y principalmente en el campo alimenticio. De acuerdo con Uribe (2007), son de gran importancia para la elaboración de alimentos y bebidas como el pan, vino, cerveza, sidra, vinagre y quesos, pero no solamente ayuda en procesos de elaboración de alimentos, sino también en procesos de descomposición de la materia orgánica y fermentaciones en general.(pág. 32)

Otra de las utilidades de estos microorganismos son la obtención de productos y subproductos enzimáticos, generados principalmente en su pared celular, muchos de los cuales se conocen por sus actividades probióticas, ciertos compuestos han demostrado gran actividad inmunoestimulante en animales de granja, provocando también el mejoramiento de su fisiología digestiva. Pérez (2007), afirma que, además de las estructuras enzimáticas, se ha venido utilizando levadura viva, principalmente la especie *Saccharomyces cerevisiae* como suplemento nutricional adicionado en la dieta de animales y también del ser humano. (pág. 36)

Gran parte de las levaduras son organismos aerobios fermentadores, existen algunas excepciones bastante aisladas como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Las levaduras fermentan algunos glúcidos, principalmente hexosas y disacáridos. El género de las *Saccharomyces* y otros, son fermentadores de varios azúcares, siempre que se encuentren en condiciones anaeróbicas mientras que *Dekkera*, *brettanomyces* y algunas otras, solamente llegan a fermentar más rápidamente la glucosa en condiciones de aerobiosis (Déak y Beuchat, 1996, pág. 8).

1.5.2 Clasificación

Las levaduras de acuerdo con Regodón (2000), las define como, hongos microscópicos, unicelulares, que pueden multiplicarse mayoritariamente por

gemación y algunas otras por escisión. Estos de microorganismos poseen varios géneros, comprenden entre 60 géneros y unas 500 especies (pág.75).

El término levadura se refiere básicamente a un grupo de hongos unicelulares, el cual puede o no presentar hifas o pseudohifas, y poseen una fase de reproducción sexual considerada perfecta o teleomorfa. De acuerdo con Fisher (1998), existen levaduras en las cuales hasta la actualidad no se ha podido describir una fase sexual, es por este motivo que a aquellas especies se las denomina especies “parecidas a levaduras” o “yeastlike”, estas se caracterizan por tener una reproducción asexual que se da mediante gemación (párr. 3).

Todas las diversidades de especies de levaduras se engloban en tres grandes grupos: Cuando la levadura da origen a ascos con sus ascosporas se incluyen en la División Ascomycota, clase Ascomycetes. Mientras que aquellas que producen basidios con basidiosporas, se localizan entre los Basidiomycota, clase Basidiomycete. Además un tercer grupo formado por las especies “yeastlike” que por el momento se lo ubica en la división Deuteromycota u hongos anamorfos, clase Blastomycetes o Levaduras.

Las levaduras de acuerdo con Regodón (2000), son los microorganismos más importantes en muchos de los procesos biotecnológicos industriales de la actualidad, entre los cuales se puede encontrar por ejemplo la vinificación, proceso en el cual las levaduras van a presentarse como las protagonistas de la conversión de azúcares en alcoholes, principalmente etanol. De las 500 especies de levaduras descritas en el mundo, solo se consideran importantes para los procesos de fermentación de alimentos 20 especies en total, las cuales se puede englobar en 8 géneros que se describen a continuación (pág. 1):

- *Candida*:

Este es un género débilmente fermentativo, no esporulante, que se presenta principalmente en la superficie del vino, oxidando el etanol conseguido en la fermentación y produciendo compuestos que modifican las cualidades organolépticas del vino. De acuerdo con Hidalgo (2003), las levaduras de este género son las responsables de la alteración conocida como “flor de los vinos”, que es el desarrollo de un velo en la superficie de la bebida al tener contacto con el aire, produciéndose la degradación de los ácidos fijos,

formándose ácido acético y acetaldehído que cambian y degradan el sabor de la bebidas (pág.456).

- *Pichia:*

Regodón (2000), afirma que, este género es otro de los responsables de la formación del velo en el vino y cerveza, generando en algunos casos un sabor aldehídico a la bebida. Las especies que más comúnmente se puede encontrar en este tipo de bebidas son *P.vini* y *P. farinosa* (pág. 3)

- *Hansenula:*

Su principal representante es *H. anómala* la cual de acuerdo con Estela, W., Rychtera,, Melzoch,, Quillama y Hatta, (2011), es considerada como contaminante tradicional de las bebidas fermentadas pese a ser una levadura nativa de la mayoría de frutas fermentables. Este microorganismo tiene capacidad oxidante y fermentativa, llegando a tolerar etanol a concentraciones entre 0,2 a 4,5 % v/v (pág.325). Regodón (2000), afirma que, sta levadura cuando se presenta en las etapas tempranas de la fermentación, puede aportar con una gran cantidad de ácido acético y ésteres volátiles, brindando sabores y aromas beneficiosos y característicos de ciertos tipos de vinos (pág.4).

- *Brettanomyces:*

Es un género el cual abarca especies de levadura comúnmente presentes en todo vino comercial o artesanal, la especie más representativa para la industria fermentativa de acuerdo con Regodón (2000), es *Brettanomyces intermedius*, tradicionalmente encontrada a pequeñas concentraciones en el vino tinto. Esta especie al igual que las *Saccharomyces* posee buena capacidad fermentativa, pudiendo producir etanol en concentraciones de hasta 12.0 % V/V, pero, esta capacidad fermentativa no es realmente apreciada por las industrias vinícolas, porque aparte de poder convertir los azúcares en etanol, genera también una indeseada turbidez en la bebida, provocando gran cantidad de acidez volátil (hasta 7,2 g/L) y alta presencia de ésteres, que afectan el sabor de la bebida, pudiendo llegar a echar a perder el producto (pág. 4).

De acuerdo con Navazcuéz (2009), *Brettanomyces* ocasiona problemas muy graves en la enología, esto principalmente por la generación de fenoles volátiles, ocasionando de esta forma sensaciones olfativas desagradables descritas como “olor a animal” o “sudor de caballo” entre otros (pág.1).

- *Kloekera*

Este género de acuerdo con Regodón (2000), se puede encontrar en las primeras etapas de la fermentación de los mostos. Este es muy sensible al SO₂, el cual se considera un inhibidor efectivo de levaduras en alimentos, cuando aumenta la densidad de este compuesto en la bebida fermentada, puede producir compuestos tóxicos que afectan el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* (Efecto Killer). *Kloekera* puede también producir grandes cantidades de ácido acético provocando la degeneración del sabor de las bebidas. (pág. 4)

- *Zygosaccharomyces*

Zumarraga y Barbero (2009), afirman que, estas levaduras son un gran problema para la industria vinícola, especialmente en el periodo de conservación en bodega del producto, esto debido a una alta resistencia de las mismas ante los conservantes convencionales del mercado. La especie *Z. bailii* es considerada la más alterante y peligrosa en producción de vinos, especialmente conocida por su alta resistencia a SO₂, ácido sórbico, ácido benzoico, y la mayoría de los conservantes tradicionales, además puede llegar a sobrevivir en ambientes con pH menores a 2.0 y resiste a concentraciones de alcohol superiores a 15.0% v/v, esta especie de levadura puede provocar modificaciones organolépticas de gran afectación para el vino (pág. 38).

Pero no todas las especies de este género son potencialmente dañinas pues existen otras de gran utilidad para la industria, como por ejemplo *Z. veronae*, que es una levadura con buenas propiedades enológicas, con baja producción de acidez volátil, por lo cual puede ser considerada como parte del inóculo inicial en procesos fermentativos. (Regodón, 2000, pág 5).

- *Torulaspota:*

Su principal representante es *T. delbrueckii* que tiene un fuerte vigor fermentativo y una alta resistencia alcohólica (hasta 10% v/v). Suarez e Iñigo (1992), afirman que, ciertas especies de *Torulaspota*, pueden ser incluidas en el inoculo de fermentación inicial del vino por las características que brinda a la bebida.

- *Saccharomyces:*

Son levaduras de forma generalmente esférica o elipsóidea, con un diámetro aproximado de 8.0 mm. Generalmente contienen de 1.0 a 4.0 ascosporas. De acuerdo con Gonzales y Valenzuela (1998), *S. cerevisiae* es y ha sido a través de los años la levadura más importante para la humanidad en producción tanto de alimentos como bebidas, y es en la actualidad el organismo eucariótico mas estudiado a nivel de biología celular y molecular. (párr. 1)

La reproducción de esta levadura es normalmente de forma asexual por gemación, pero también puede reproducirse de forma sexual en determinadas condición. La gemación ocurre mediante la formación de una yema en la célula madre, produciéndose posteriormente una división nuclear, ruptura de pared y por último la separación de célula madre e hija.

De acuerdo con Regodón (2000) y Gonzales y Valenzuela (1998), *S. cerevisiae* es la levadura fermentadora por excelencia la cual al ser expuesta a condiciones adecuadas de pH, aireación, temperatura, humedad, luz, nutrientes etc. Puede utilizar con gran eficiencia los azucares del medio de crecimiento y convertirlos en etanol, pudiendo llegar a generar concentraciones de hasta 18.0 % v/v. (pág. 6) (párr. 1)

Entre las especies de *Saccharomyces* más utilizadas en procesos de producción de bebidas fermentadas podemos encontrar a *S. bayanus*, *S. carlsbergensis* y *S. Boulardi*, pero no solamente por su capacidad fermentativa, sino también por las propiedades organolépticas que estas pueden aportar a los productos fermentados, tal es el caso de *S. bayanus* que brinda intensos olores florales a la bebida, además de poder ser considerada

sumamente útil para fermentación de frutas que contienen concentraciones de azúcares superiores a lo normal.

La utilidad de *S. cerevisiae* no se limita simplemente a las bebidas alcohólicas, sino también a alimentos como por ejemplo el pan, el cual debe parte de su valor nutricional a la adición de este microorganismo en su procesamiento. *S. cerevisiae* de acuerdo con Perdomo, Vargas y Campos (2004), es una gran fuente de aminoácidos, vitaminas (principalmente del complejo B) y minerales, motivo por el cual, su consumo tanto de forma cruda así también al ser ingerido como sub-producto de la elaboración del alimento, provoca un efecto sumamente benéfico y útil (pág. 90). Es por este motivo que puede ser considerado un excelente suplemento nutricional para el ganado y el hombre (Mena, Bernal, Rodriguez, Aguilera, Reis, Carrillo y Romero, 2007, pág.1).

Autores como Menocal, Ávila, López, García, A y Garcia. (2005) afirma que, la utilidad de *S. cerevisiae* en la producción animal, especialmente en aves, se debe principalmente a la composición de polisacáridos en su pared celular (80.0- 85.0%) cuyos componentes principales son Glucosa y Manosa, las cuales son consideradas buenos inmuno-estimulantes porque impiden la adhesión de bacterias entero patógenas en el tracto gastro-intestinal, evitando de esta forma la utilización de medicamentos antibióticos sea como promotores de crecimiento o para su uso sanitario, además de compuestos sintéticos que pueden afectar al metabolismo del animal (pág.156).

1.5.3 Aislamiento e Identificación de Levaduras

1.5.3.1 Aislamiento

El aislamiento de levaduras a partir de muestras naturales se realiza de acuerdo con Mardigan et al. (2003), en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos por medio del vertido en placa. El crecimiento explosivo de microorganismos permite producir un gran número de células a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales o clones celulares. (pág. 132).

- Tomar mediante un aza una alícuota de la muestra.
- Dispensar sobre el medio nutritivo.
- Estriar la muestra sobre la superficie del medio.
- Cerrar y sellar la caja petri con cinta parafilm.
- Incubar las cajas petri a 28°C durante 48 horas.
- Revisar la presencia de colonias en la caja petri.
- Seleccionar las distintas colonias mediante un aza, diferenciandolas por su tamaño, forma y color.
- Inocular en una nueva caja petri las colonias seleccionadas.
- Sellar bien las cajas petri y dejarlas en un cooler a temperatura ambiente.
- Observar el crecimiento de las colonias cada 24 horas. (ver anexo 4)

1.5.3.1.1 Medios de cultivo para aislamiento de levaduras

- Medio YPD (Difco y BBL Manual, 2009, pág. 645)
 - Extracto-peptona-dextrosa de levadura (YPD) Agar
 - Extracto-peptona-dextrosa de levadura (YPD) Caldo

YPD agar y caldo YPD, son dos medios utilizados para el mantenimiento y multiplicación de levaduras en los procedimientos de microbiología molecular. Son medios específicos para el crecimiento de levaduras, principalmente para cultivar *Saccharomyces cerevisiae* y otras. Las levaduras se caracterizan por presentar un adecuado desarrollo en medios que contienen sólo dextrosa y sales minerales. La adición de hidrolizados de proteínas y extracto de células permiten un crecimiento más rápido de las levaduras, de manera que durante el crecimiento exponencial, las células se dividen cada 90 minutos.

La formulación de YPD agar se puede evidenciar en la tabla 5 descrita a continuación:

Tabla 5: Composición nutricional de medio de cultivo YPD agar/litro

Compuesto	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10.0
Peptona de Carne	20.0
Dextrosa	20.0
Agar	15.0

Notas: (Difco y BBL Manual, 2009, pág.645)

Difco™ YPD Caldo consta de los mismos ingredientes que posee el medio YPD agar, solo se diferencia en que su composición no contiene agar por lo tanto es totalmente líquido.

- Medio Lisina

Es un medio complejo que de acuerdo con Morris y Eddy (1957), tiene gran utilidad para el aislamiento y recuento de cepas precisas de levaduras del género *Saccharomyces* (pág.34). Tras estudios realizados por Walters y Thiselton (1953), se examinó 180 especies de levaduras en medio de cultivo sintético que contenía lisina como única fuente de nitrógeno, con lo que se determinó que no existen cepas clásicas de *S. cerevisiae* y *S. carlbergensis* que utilicen lisina; mientras que otras cepas de levaduras si asimilan este aminoácido. Años después Morris y Eddy (1957), formularon un medio de cultivo sólido para el aislamiento y recuento de cepas de levaduras del género *Saccharomyces*, formulación que se mantiene hasta estos días como producto comercial de la marca OXOID (pág.35).

1.5.3.2 Identificación de levaduras

Existen 4 métodos de clasificar e identificar los diferentes géneros y especies de levadura entre las cuales se encuentra:

1.5.3.2.1 Métodos de identificación Morfológicos

Los criterios morfológicos pueden ser macro y microscópicos

- **Macroscópicos:**

Se tiene en cuenta el aspecto de las colonias de levadura al crecer en los diferentes medios de cultivo, cada medio de cultivo tiene una característica propia de crecimiento respecto al tiempo de siembra de cada especie de levadura. Siempre se debe trabajar con colonias frescas las cuales muestren crecimiento total en la placa Petri.

Las colonias de levaduras de acuerdo con Linares y Solis (2007), suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas y cambiando de color a medida que envejecen, es por esta descripción que los principales aspectos diferenciadores de las colonias microbianas a considerar son:

(pág.1)

- Color : Colores blanquecinos y crema para géneros de *Saccharomyces* y *Candida*; escala de color desde el rosado intenso hasta el crema para el género *Rodothorula* y colores del crema al amarillo para el género *Cryptococcus*
- Olor: Olores generalmente dulces y frutales para el género *Saccharomyces*, Olores a fermento en géneros de *Candida*.
- Consistencia: Pastosa en la mayoría de los casos
- Forma: redonda, ovalada, amorfas, etc.
- Tiempo de crecimiento desde la siembra

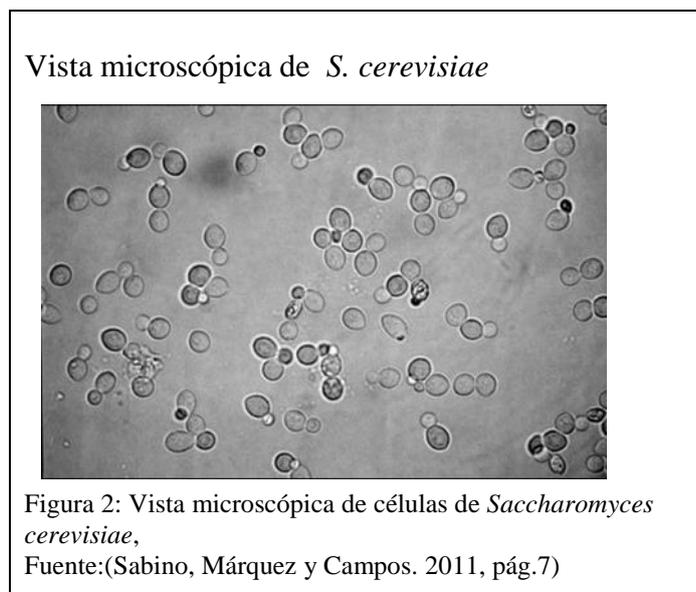
Cada levadura tiene su característica de crecimiento específico de acuerdo al medio de cultivo a la que sea expuesta, es de esta forma que Win et al. (2008), afirma que, la forma tradicional de las cepas del género *Saccharomyces* sembradas en medio de cultivo SDA tras 36 horas de incubación son colonias de color blanco grisáceo, de textura pastosa y con bordes enteros. (pág. 1696).

- **Microscópicos:**

Piña (2014), describe microscópicamente a las levaduras como:

“hongos unicelulares de forma esférica, alargada u ovalada, presentan diferentes colores: blanco, rosado, beige o rojo. Su tamaño oscila entre 2,5 – 10,0 micras de ancho y 4,5 – 21,0 micras de largo” (Piña, 2014, pág.42).

Entre las principales pruebas que se utilizan para identificar levaduras se encuentran: Prueba del tubo Germinal, Formación de hifas y Tinciones, pero, las levaduras con características fermentativas y resistencia alcohólica en especial aquellas del Género *Saccharomyces*, de acuerdo con Win et al. (2008), se las puede distinguir por la formación de racimos laxos de levadura de color blanco, de gran tamaño y con forma oval (Ver figura 2), con una característica distintiva específica que es la formación de ascosporas en medios selectivos, esto sucederá al cabo de 7 días del inicio de su incubación (pág.1696).



– Tinción gram:

Esta tinción sirve principalmente para diferenciar la estructura de la pared y su composición, esta técnica puede ser utilizada para observar al microscopio bacterias y hongos. La pared celular le provee al microorganismo resistencia a la lisis osmótica, le da su forma característica y su tamaño. El peptidoglicano es el componente principal de la pared celular de los microorganismos, les confiere su rigidez. La pared de la célula gram-positiva es bastante gruesa ya que se encuentra formada por varias capas de

peptidoglicano así como también una pequeña parte de ácido teicóico, en las células Gram positivas generalmente la concentración de peptidoglicano se encuentra en un porcentaje del 80.0 al 90.0%. Por otro lado la pared de las células Gram negativas es más delgada que la de las Gram positivas, contienen únicamente peptidoglicano y una membrana exterior formada por fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas que las rodean, el peptidoglicano en estas células se encuentra únicamente del 10.0- 20.0%. (Beveridge 1990, pág.14).

La tinción Gram se basa principalmente en colocar un colorante primario que en este caso es el cristal violeta, este colorante posee afinidad con el peptidoglicano que posee la pared celular, el siguiente paso es colocar lugol, este sirve como mordiente impidiendo la salida de cristal violeta por medio del complejo que se forma entre cristal violeta-yodo, esto satura los espacios que se encuentran en la pared del microorganismo. Después de este proceso se procede a colocar alcohol acetona, el cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, posee una reacción directa con la pared de los microorganismos gram negativos ya que al contacto destruye completamente su pared, esto se debe a que esta es soluble a la acción de solventes orgánicos. Por otra parte los microorganismos gram positivos que contiene gran cantidad de peptidoglicanos retienen este complejo. El último paso es colocar safranina, este colorante tiene la propiedad de funcionar como colorante contratinción, solo colorea a los microorganismos que no retuvieron. El estudio microscópico de los organismos levaduriformes es complejo, se lo realiza con cristal violeta-yodo y microorganismos relacionados se puede llevar a partir de tinciones, ya sean estas simples o tinción gram, generalmente las levaduras se comportan como gram negativas cuando son expuestas a la tinción gram. Esta tinción es muy utilizada en el campo de la microbiología ya que permite observar la formación de blastosporas, artrosporas, hifas, pseudohifas o endosporas según el microorganismo que se esté investigando. (Allen, Koneman. y Janda, 2007, pág. 12).

- Tinción con azul de algodón de lactofenol:

Según López (2014), esta tinción presenta la característica de preservar la integridad de las estructuras fúngicas, principalmente con fines taxonómicos, ya que permite visualizar cada órgano del microorganismo, lo que permite una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula evitando de esta manera que esta se rompa, de la misma forma destruye a la flora acompañante dejando a la célula totalmente inactiva. El ácido láctico provoca un gradiente osmótico en la célula con relación al interior fúngico, esto genera una película protectora lo cual preserva sus estructuras. El azul de algodón es un colorante ácido que tiñe al citoplasma y a la quitina presentes en las células fúngicas, y el glicerol mantiene humectada a la muestra. (pág. 16).

1.5.3.2.2 Métodos de indentificación moleculares:

Paff (1984), afirma que, la comparación de los ácidos nucleicos entre cepas de levaduras, se limitaba originalmente a la determinación de la composición de dos de las bases nitrogenadas del ADN, y la mayoría de los investigadores usaron la desnaturalización térmica para conocer la composición del ADN, reportando principalmente el porcentaje en moles de Guanina + Citocina. La inexactitud que generaban en los resultados de estos estudios, no permitiría una identificación exacta de ciertas taxa de levaduras, en especial aquellas que se encuentran relacionadas entre sí por su género, y mucho menos reconocer variedades generadas dentro de una misma especie o que se producen por mutaciones de la misma. Es por este motivo que a través de los años se consideró necesario el desarrollo de nuevas técnicas de análisis del ADN microbiano, entre las cuales Orberán (2004) describe las siguientes: (p. 17).

- Microsatélites
- RFLP (Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción)
- mtDNA (Polimorfismos del ADN mitocondrial)
- RAPD (Polimorfismo de ADN aleatoriamente amplificado)
- LMW-RNA (RNA de bajo peso molecular)

1.5.3.2.3 Métodos de Identificación Bioquímicos.

Las características morfológicas de las levaduras se pueden apreciar tanto macro como microscópicamente, estas técnicas permiten la identificación del género de levadura, es por este motivo que las características bioquímicas son una alternativa para la identificación de levaduras, hasta identificar la especie de levadura, Carlile et al. (2001), esto se puede evidenciar mediante el análisis de la capacidad de las levaduras para utilizar compuestos carbonatados como (almidón, L-arabinosa, cadaverina, celobiosa, 2-cetogluconato, citrato, eritritol, galactosa, inositol, lactosa, lisina, maltosa, manitol, melibiosa, α -metilglucósido, rafinosa, ramnosa, sacarosa, trehalosa, xilosa) y nitrogenados (nitratos), el crecimiento a 37.0 °C, la fermentación de glucosa y sacarosa, la necesidad de vitaminas, la resistencia a la cicloheximida, la hidrólisis de urea o el desarrollo en presencia de algunos inhibidores (acetato de sodio 1.0%, cloruro de sodio 16.0%, glucosa 60.0%) (pág. 43). Autores como Linares y Solís (2007), clasifican los métodos de identificación bioquímica de la siguiente forma (pág.11)

- Criterios Bioquímicos Enzimáticos (Linares y Solís 2007, pág. 11)
 - Medios Cromogénicos: Se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima.
 - Sistemas enzimáticos que utilizan sustratos fluorogénicos: Estos sistemas necesitan el empleo de una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm. con el fin de detectar los sistemas enzimáticos utilizados por el microorganismo.
 - Prueba de Fenol- Oxidasa: Se utiliza debido a que los microorganismos productores de fenol-oxidasa, tienen la capacidad de sintetizar melanina, la cual evidencia un cambio de color del medio de cultivo.

- **Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes:** Los microorganismos de acuerdo con Linares y Solís (2007), actúan de diversas formas al exponerlos a carbohidratos específicos, es por este motivo que si un microorganismo es capaz de asimilar un determinado carbohidrato, presentará una expresión diferente en comparación de los carbohidratos que no lo asimilen. (pág. 5)
 - Auxonograma convencional: Son sistemas de identificación de microorganismos de uso comercial que se basan en la aplicación por separado de diferentes nutrientes sean hidrocarburos o nitrogenados sobre un medio sintético base para el crecimiento selectivo de una determinada levadura.
 - Sistemas semi-automáticos: Son sistemas comerciales de identificación que se basan en la asimilación de nutrientes y métodos cromogénicos, para indicar una determinada reacción del microorganismo lo cual permitirá su posterior identificación, entre estos se encuentran por ejemplo los sistemas de Identificación Api 20.
 - Sistemas automáticos: Son sistemas comerciales que de acuerdo con Thermo Scientific (2009), se basan en la capacidad de degradación microbiana de sustratos específicos detectados por sistemas indicadores colorimétricos (pág.23). Los reactivos utilizados son generalmente una mezcla de pruebas convencionales y pruebas cromogénicas de monosustrato. En este grupo de sistemas de identificación se encuentra RapID Yeast Plus System, un sistema específico para levaduras el cual, utiliza 18 diferentes tipos de reactivos para comprobar la asimilación que tiene una especie de levadura frente a estos compuestos en estudio, esto se apreciará mediante cambios colorimétricos en los sustratos probados. Las concentraciones de los reactivos cambiará de acuerdo a las necesidades determinadas para el estudio de levaduras, tal como se muestra en la tabla 6 que se detalla a continuación:

Tabla 6:
Composición de Pocillos de Reacción de Remmel
RapID Yeast Plus System.

Ingredientes de los reactivos	Cantidad (%)
Glucosa	1.0
Maltosa	1.0
Sacarosa	1.0
Trehalosa	1.0
Rafinosa	1.0
Éster de ácido Graso	1.0
p-nitrofenil-N-acetil- β , D-galactosamida	0.05
p-nitrofenil- α ,D-glucósido	0.05
p-nitrofenil- β ,D-glucósido	0.0
α -nitrofenil - β , D-galactósido	0.05
p-nitrofenil, α , D-galactósido	0.50
p-nitrofenil- β ,D-frucósido	0.05
p-nitrofenil fosfato	0.05
p-nitrofenil fosforilcolina	0.05
Urea	0.30
Prolina- β -naftilamida	0.01
Histidina β -naftilamida	0.01
Leucil-glicina β -naftilamida	0.01

Notas: composición de los 18 pocillos de reacción de Remmel RapID Yeast Plus System, (Thermo Scientific, 2009, pág.23)

Los resultados de estas pruebas están sujetas a programas computacionales que van a identificar en base a estadística e informes probabilísticos, los géneros y/o especies de las cepas en investigación.

Tras la realización de todas las pruebas de identificación y selección ya mencionadas, se aplicarán las pruebas bioquímicas Remmel, las cuales tienen como

objetivo identificar la cepa de levadura hasta llegar al nivel de especie, estas pruebas se utilizarán para confirmar los resultados obtenidos en pruebas macroscópicas, microscópicas y de crecimiento en medio Lisina y medio etanolizado.

Las pruebas de identificación Bioquímica Remmel se basan en la asimilación que presenta el microorganismo ante los diferentes compuestos orgánicos contenidos en cada uno de los pocillos presentes en la cubeta de Inoculación Remmel, produciendo o no un cambio de color en los pocillos de reacción (ver anexo 8).

La tabla 7 descrita a continuación muestra el principio de reacción (cambio de pH o hidrólisis) que se pueden producir en los pocillos de reacción.

Tabla 7:
Principios y Componentes de Remmel RapID™ Yeast Plus System

Ingredientes de los pocillos	Concentración (%)	Código	Principio
Glucosa	1	Glu	La utilización del hidrato de carbono da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador. (Balows, Hauster, y Herrmann, 2003)
Maltosa	1	Mac	
Sacarosa	1	Suc	
Trehalosa	1	Tre	
Rafinosa	1	Raf	
Éster de ácido Graso	1	Lip	La hidrólisis del ácido graso da lugar a productos ácidos que bajen el pH e induzcan un cambio en el indicador. (Lodder, 1970, pág.5)
p nitrofenil-N-acetil-β,D galact samide	0.05	Naga	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera o- o p-nitrofenol amarillo que es detectado con ayuda del reactivo RapID™ Yeast Plus A. (Bobey & Ederer, 2003, pág.393)
p-nitrofenil-α,D-glucósido	0.05	Aglu	
p-nitrofenil-β,D-glucósido	0.05	Bglu	
β nitrofenil-β, D-galactosidasa	0.05	Onpg	
p-nitrofenil,α, D-galactósido	0.05	Agal	
p-nitrofenil-β,D-frucósido	0.05	Bfuc	
p-nitrofenil fosfato	0.05	Phs	
p-nitrofenil fosforilcolina	0.05	Pcho	
Urea	0.3	Ure	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH e inducen el cambio del indicador. (Roberts, Horsmeir, & Land, 2003, pág. 586)
Prolina-β-naftilamida	0.01	Pro	La hidrólisis enzimática del sustrato de arilamida libera β-naftilamina que se detecta con el reactivo RapID™ Yeast Plus B. (Norris & Ribbons, 2003, pág.38)
Histidina β-naftilamida	0.01	Hist	
Leucil-glicina β-naftilamida	0.01	Lgy	

Notas: 18 pocillos de reacción Remmel con su justificación,

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Una vez realizado el análisis cromogénico de cada cubeta de inoculación aplicada a los microorganismos en estudio, se procede a introducir los datos obtenidos en el software computacional Eric®, el cual mediante análisis estadístico proporciona la información necesaria para la identificación de una cepa de hongo o levadura. El anexo 9, muestra los resultados de los análisis comparativo colorimétrico entregados por los pocillos de reacción luego de la inoculación microbiana, además de los resultados entregados por el software Eric de estos resultados.

1.5.3.2.4 Otros Criterios para Identificación

- **Similitud Enzimática:** Las coenzimas se unen a las enzimas para transportar electrones en la membrana mitocondrial que, permite el paso desde el complejo I (NADH reductasa) o complejo II (succinato deshidrogenasa) al complejo III (Coenzima Q-citocromo c reductasa). De acuerdo con Yamada y Kondo (1972), la Coenzima Q presente en la levadura puede variar desde la forma Q6 a la Q10. Pero, en casi todas las especies de levaduras descritas, se encuentra el mismo sistema Q, a excepción de géneros como *Pichia* y *Hansenula*. Los estudios de coenzima Q en las levaduras asporógenas, puede ser utilizado para determinar la correlación de ciertas levaduras imperfectas con otros grupos de levaduras perfectas. (pág. 64).
- **Pared Celular:** (López et al. 2014), afirman que, los polisacáridos que cubren la pared celular, pueden ser de gran importancia en taxonomía y filogenética de las levaduras. Del gran número de levaduras descritas en el mundo, han sido pocas las que se estudia con referencia a su composición de polisacáridos en membrana, siendo éste un método muy sencillo para realizar una identificación a nivel de género. (pág. 11).

1.5.3.2.5 Identificación mediante Criterios Inmunológicos:

Son sistemas que utilizan anticuerpos monoclonales que permiten la detección de antígenos específicos los cuales permiten diferenciar a los microorganismos analizados de acuerdo a su género.

1.6 Resistencia alcohólica.

Se refiere la capacidad que posee una levadura para continuar con su crecimiento en presencia de etanol, por medio del engrosamiento de su membrana y de sus caracteres genéticos que le proveerán dicha resistencia.

El etanol es bien conocido como un inhibidor de crecimiento de microorganismos que Kyung, Claire y Douglasque (2003), lo reportan como generador de daños en el ADN mitocondrial de las células de levadura y causante de la inactivación de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa y deshidrogenasa. Esto es producido debido a que el etanol, es un inhibidor del transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos. En la inhibición enzimática se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol, este complejo detiene el paso de glucosa a glucosa-6 fosfato. La tolerancia al alcohol en las levaduras está dada por la habilidad que posee la célula para exportar el etanol del medio interior al medio externo, este proceso va a depender estrictamente de la composición que posea la membrana y de su fluidez (párr.2). Esto ocurre cuando la levadura modifica su composición de ácidos grasos presentes en la membrana, para que de esta manera se puedan minimizar los efectos de la fluidez que se produce por el etanol. La adaptación de las levaduras al etanol también es producida debido a una modificación en la composición lipídica presente en las membranas, Lo cual se produce por un enriquecimiento en esteroides y ácidos grasos de cadena larga, para que las levaduras se puedan adaptar a altas concentraciones de alcohol deben poseer gran cantidad de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos. Algunas de las cepas de levaduras, principalmente del género *Saccharomyces* de acuerdo con Garzón y Hernadez (2009), muestran tolerancia alcohólica y pueden adaptarse a altas concentraciones de etanol (pág. 33)

En el momento en que la pared de las levaduras presenta mayor longitud en la cadena de ácidos grasos, muestra un mayor contenido de grupos CH, estos interactúan provocando el engrosamiento de la membrana y también ayudan al aumento de su hidrofobicidad, esto provoca que la solubilidad de las moléculas polares disminuya, lo cual contribuye al comportamiento de barrera que posee la membrana, al mismo

tiempo contrarresta la desorganización membranal que provoca el etanol. (Medina et al. 1999, pág.47)

Las levaduras secas activas, disponibles comercialmente como inóculo, que particularmente se caracterizan por crecer en aerobiosis y con bajas concentraciones de glucosa, lo cual les confiere a las células concentraciones elevadas de factores de supervivencia, estos factores van a ser transferido durante las generaciones que se desarrollen durante el proceso fermentativo, que regularmente produce de 6 a 7 generaciones durante la fermentación vínica. La ausencia de glucosa que existe durante el desarrollo de los cultivos industriales, da lugar a la formación de orgánulos en la célula, especialmente de mitocondrias, las cuales contienen factores que sirven a la célula para sobrevivir, estos factores explican los procedimientos fermentativos que usan las industrias Europeas, moviendo el mosto varias veces al día para que las levaduras se oxigenen antes de la fermentación. (Boulton, Singleton, Bisson y Kunkee, 2002, pág. 119)

La adición de esteroides no aumenta el crecimiento de las células durante las primeras fases de la fermentación, lo que hace es mejorar la supervivencia de las células en las etapas finales, mejorando su resistencia alcohólica. Los esteroides cumplen con la función de construir y mantener las membranas eucariotas, regulando la permeabilidad y la fluidez de la membrana, la resistencia al etanol y la actividad de la ATPasa plasmática. El ergosterol que es uno de los esteroides más abundantes, en pequeñas cantidades ayuda a iniciar el crecimiento celular, y en cantidades abundantes actúan como componentes estructurales de la membrana. La solubilización de esteroides se da por la formación de una micela entre los fosfolípidos de membrana, los polisacáridos y los esteroides específicos de la pared celular, estas micelas son capaces de interactuar con las membranas celulares, modificando su orden y su composición lipídica, dándole de esta manera mayor resistencia a las sustancias tóxicas como el etanol. (Nuria, 2009, pág.30)

Otros componentes importantes de la membrana, son los ácidos grasos, un aumento en el contenido de ácido oleico en la membrana lipídica mejora la tolerancia de las células frente al etanol. Los ácidos grasos de cadena larga están ligados con la tolerancia alcohólica, en cambio ácidos grasos de cadena mediana como el hexanóico, octanóico, decanóico, dodecanóico junto con el etanol inhiben el

crecimiento celular, ocasionando una disfunción en el intercambio celular de sustancias. (Nuria, 2009, pág.32).

Al género de las *Saccharomyces* pertenece la especie *Saccharomyces cerevisiae*, conocida por encontrarse entre las especies con mayor asimilación y resistencia a altas concentraciones de etanol, toma el control de los procesos fermentativos alimenticios, principalmente en la producción de bebidas fermentadas como vinos, cerveza y demás derivados de la conversión de azúcares. Esto sucede de forma constante en todo el proceso fermentativo hasta el agotamiento de los azúcares, o bien, hasta que algún componente esencial para el crecimiento se agote, o hasta que aparezca algún efecto inhibitor propiciado por ciertos metabolitos producidos durante la fermentación (Lucio, Polo, Pardo y Ferrer, 2009, pág.254)

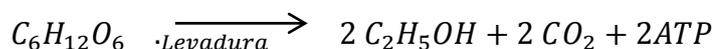
1.7 Fermentación

El término “fermentación” ha sufrido distintos cambios en el transcurso del tiempo, inicialmente este término se utilizó para nombrar a todos los procesos de descomposición de la materia, en los cuales se podía percibir la presencia de gas, esta palabra tiene sus raíces en el verbo hebreo: “fervere” el cual significa hervir, este proceso se puede observar en el instante en que las levaduras actúan sobre un sustrato determinado en el proceso de fermentación para obtención de bebidas alcohólicas, entonces el nombre de fermentación se debe a que durante este proceso se pueden apreciar burbujas, que determinan la presencia y expulsión de dióxido de carbono, causado por la acción catabólica anaerobia de un microorganismo. Bioquímicamente la fermentación es el proceso por el cual se generará energía mediante el catabolismo de compuestos orgánicos, quienes según Núñez (2004), actuarán como aceptores y donares de electrones. (pág. 17).

Este, es un proceso ancestral y por su alto valor dentro de la industria, se ha convertido en objeto de varios estudios, muchos de estos han servido para determinar los factores responsables de las mismas. Las numerosas investigaciones realizadas, han demostrado las diferentes condiciones de fermentación, sus deficiencias en cuanto al nivel nutricional, los niveles de azúcares y las sustancias que pueden inhibirla.

1.7.1 Fermentación alcohólica:

El metabolismo de la fermentación alcohólica de acuerdo con Souza, Rosa, Morgano, y Serra (2004), se puede resumir en la siguiente fórmula (pág.20):



La fermentación alcohólica se caracteriza por el consumo de azúcares durante toda la fase estacionaria, la glucosa y fructosa serán metabolizadas por la levadura, siendo degradados en el proceso de glicólisis. El alcohol es el producto representante de la fermentación alcohólica. Gran parte de los azúcares son utilizados para la formación de biomasa, obteniendo también subproductos de la fermentación como: glicerol, ácidos orgánicos, ésteres y alcoholes superiores. A etapas avanzadas de la fermentación del mosto de la fruta, el grado alcohólico aumenta lentamente, volviéndose tóxico para la levadura, provocando que el uso de fructosa se torne cada vez más difícil y el proceso se detenga.

La acidez en la fermentación según Gallego (2007), es de vital importancia para las levaduras en cuanto a su crecimiento y al azúcar disponible que aparte de ser la fuente de alimentación para las levaduras, también optimiza la producción de alcohol que a su vez actúa en el vino como un buen antiséptico. (pág. 12)

En la primera etapa del proceso de fermentación, las levaduras crecen consumiendo el oxígeno que se encuentra en el medio, por lo tanto, llegan a consumir totalmente el oxígeno, con lo cual se activa su metabolismo anaerobio, de esta manera se inicia la fermentación con la producción de alcohol, la resistencia alcohólica que presente una levadura dependerá de todos los factores antes mencionados, pero sobre todo de la genética de la levadura la cual determinará su capacidad metabólica.

1.7.2 Fermentación maloláctica

Esta fermentación se basa en el uso de bacterias malolácticas durante la fermentación alcohólica. Según Palacios, Sibylle, Suárez, & Heras (2006), es mejor añadir las bacterias malolácticas al final de la fermentación alcohólica ya que de esta manera, estas bacterias no van a tener un proceso antagónico con las levaduras porque al final de la fermentación alcohólica estas levaduras se encontraran inviables, esto favorece a las bacterias por la gran cantidad de nutrientes que se encuentran en el medio, ya

sea por la muerte de las levaduras y por su autólisis (pág.6). La bacteria maloláctica más utilizada en este tipo de fermentación es la *Oenococcus oeni*, la cual se encargará de consumir el ácido málico y transformarlo en ácido láctico. De esta manera se consigue que los vinos disminuyan su acidez, refuercen su sabor afrutado en los vinos blancos y ayuda a mejorar el color de los vinos tintos contribuyendo con la polimerización de los polifenoles lo que genera una estabilización en el color, y logrando que soporten largos periodos de guarda y añejamiento en las barricas. (Davis, Wibowo, Eschenbrunch, Lee y Fleet, 1985, pág. 300)

1.7.3 Biología de la fermentación:

De acuerdo con estudios realizados por Ramírez y Pedroza (2001), las levaduras más utilizadas para realizar la fermentación alcohólica a nivel industrial son las *Saccharomyces cerevisiae* con un 96% aproximadamente de las fermentaciones alcohólicas. La producción de etanol se produce en la ruta de la glucólisis anaerobia, por medio de la cual el piruvato se transforma en acetaldehído y etanol (Ver figura 3) El paso del ácido pirúvico a etanol se puede resumir en los siguientes pasos: el primero consiste en la liberación de CO₂, en el segundo paso se produce la oxidación del NADH y se reduce a acetaldehído, por último se produce alcohol que es el producto final de la glucólisis anaeróbica, entonces en este ciclo se producen 2 moléculas de etanol más dos moléculas de CO₂ a partir de 1 molécula de glucosa (pág.4).

La estructura celular de las levaduras, consta de una envoltura celular que está formada por la membrana plasmática, un espacio periplásmico y la pared celular que contiene polisacáridos y péptidos, de acuerdo con la Universidad Autónoma de Madrid (2007), la determinación de los péptidos que se encuentran presentes en las levaduras es muy complicado, esto se debe al amplio número de estructuras que estos compuestos pueden presentar, la tecnología más utilizada para determinarlos es el HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) (pág.5), mediante el cual se han logrado determinar algunos aminoácidos que están formando a los péptidos, estos son: lisina, ácido γ -aminobutírico, treonina, glicina, prolina, serina y ácido aspártico más asparagina que fueron encontrados por Moreno-Arribas y Polo (2005). La pared de la levadura posee una estructura semirrígida que le provee a la levadura fuerza compresional y tensil. (pág. 28)

1.7.4 Condiciones de la fermentación:

Estas son dadas por el consumo que poseen las levaduras en cuanto a los distintos azúcares que se encuentran en el medio, la sacarosa es la primera en ser consumida, esta se hidroliza por la acción de la invertasa que es la beta-fructosidasa, la cual es producida por las levaduras pertenecientes al género de las *Saccharomyces* que está dentro del espacio periplásmico extracelular, la función que cumple la invertasa es la transformación de la sacarosa en forma lenta a azúcar invertido que posee mayor poder edulcorante, humectante, solubilidad y por estos motivos presenta menor probabilidad de cristalizar o endurecer, por lo tanto es un agente que contribuye con el reblandecimiento de los azúcares, cristalizando la sacarosa y evaporando el agua. Ramirez y Pedroza (2001), afirman que, en la fermentación anaeróbica no se requiere de oxígeno en gran cantidad, solo se necesita de su presencia en pequeñas cantidades ya que, en la primera etapa de la fermentación su presencia es necesaria para que se puedan sintetizar varios ácidos grasos insaturados y también algunos esteroides (pág.3).

Existen varias cepas de levaduras que pueden llegar a producir concentraciones de etanol del 12% al 14% entre las cuales las más reconocidas son, las *Saccharomyces cerevisiae*, esto fue determinado por Owen (1991), pero también existen varias cepas seleccionadas que pueden llegar a presentar concentraciones del 18% al 20% de alcohol, este nivel de alcohol producido, será el que determine la velocidad de fermentación, ya que entre más se aumente el nivel de alcohol más se restringirá la capacidad fermentativa de las levaduras. (p. 53).

Es importante que exista un adecuado control en el proceso de fermentación, para que las levaduras puedan asimilar de forma correcta los carbohidratos y otros nutrientes que al final del proceso se convertirán en etanol, y también en compuestos con aromas característicos deseables, lo que se evitará con el control en el proceso de la fermentación serán los compuestos que tengan aroma y sabor indeseables. Algunos de los compuestos que presentan cualidades organolépticas deseables son los ésteres, ácidos orgánicos, compuestos azufrados, compuestos carboxílicos, fenoles y aminas. (Ramirez y Pedroza, 2001, pág. 9)

Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura

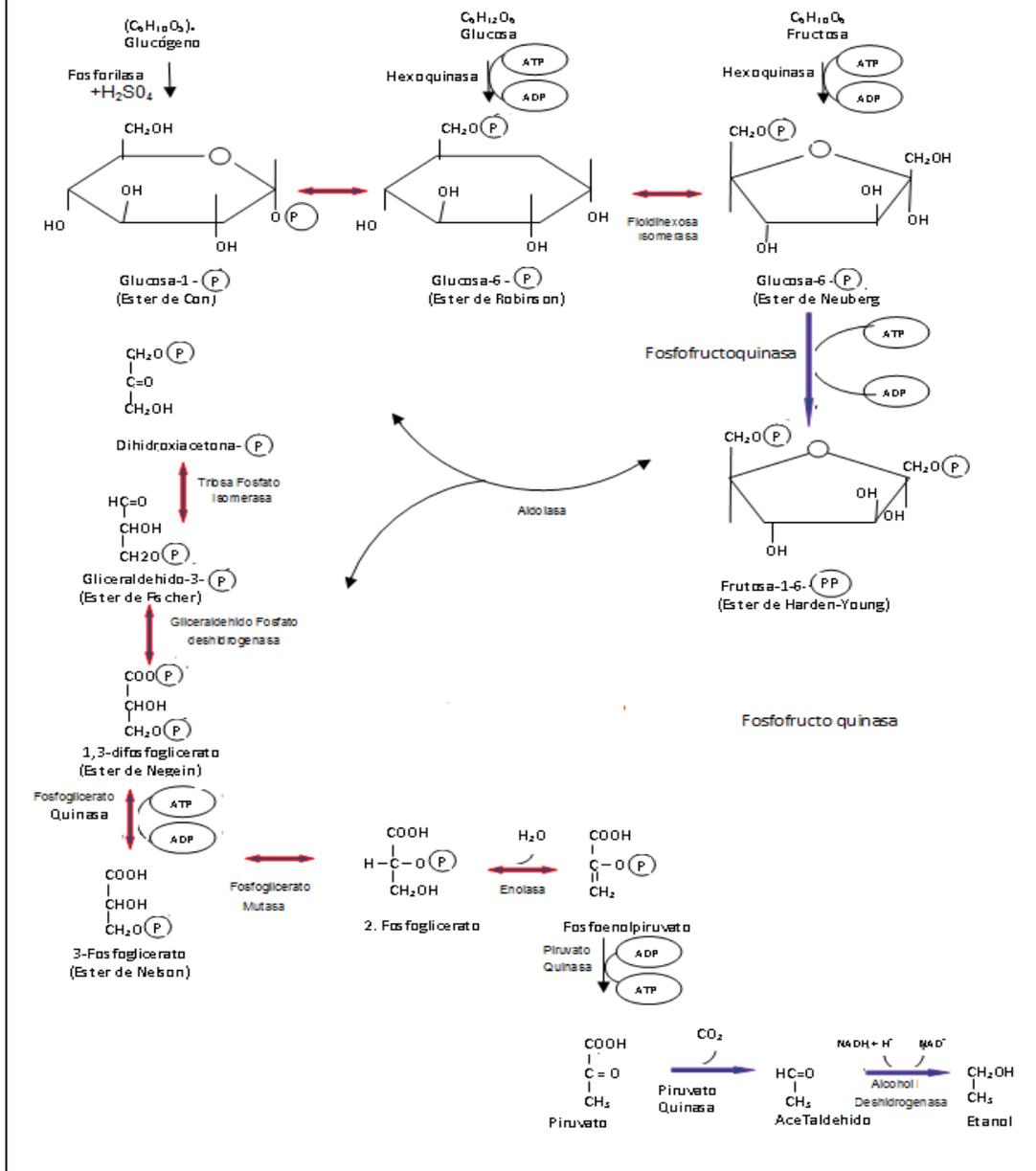


Figura 3: Proceso mediante el cual la levadura realiza la conversión de azúcares en alcohol
Elaborado por: (Pares y Juárez 1997, pág.64)

1.7.4.1 Temperatura:

Influye directamente en la reproducción y en la velocidad a la cual las levaduras fermentan, la temperatura más adecuada para que las levaduras puedan realizar las actividades antes mencionadas son las que oscilan entre 22.0°C a 27.0°C, siendo la más adecuada la de 25.0°C. Cuando la temperatura sobrepasa los 30.0°C, la capacidad que poseen las levaduras para desdoblar los azúcares es inhibida, a temperaturas próximas a los 40.0°C las levaduras pierden totalmente la habilidad para poder crecer y reproducirse. Dentro de una fermentación alcohólica no se debe permitir que la temperatura supere los 32.0°C ya que se puede llegar a una inactivación celular, la pérdida de alcohol por evaporación con una disminución en el nivel de grados alcohólicos y por último se pueden dar reacciones de fermentación no deseadas. (Álvarez 1991, pág. 6).

1.7.4.2 pH:

Las levaduras generalmente presentan un buen desarrollo a un pH que se encuentre entre 3.50 y 6.00 pero el pH donde las levaduras presentan mayor rendimiento en pH que van desde los 3.05 a 3.50 niveles de acidez. El pH en las fermentaciones alcohólicas puede variar entre 2.80 y 3.80, este pH dependerá de forma directa de la composición que presente el medio. El pH es de vital importancia en la fermentación alcohólica, al presentarse un pH menor a 3.00, esto determinará la inhibición de los centros activos de las enzimas, los cuales se ven afectados en su estado de ionización por el cambio de pH. (Aleixandre 1998, pág. 5).

Saccharomyces cerevisiae se desarrolla más rápidamente que las bacterias a pH bajos, esto beneficia a que el proceso fermentativo pueda ser controlado y de esta manera se evite la contaminación. Según De Rosa (1998), en la fermentación alcohólica el producto final será una solución hidroalcohólica que está compuesta principalmente por ácidos grasos salificados, los más destacados son los que están compuestos por magnesio, potasio y calcio. La proporción en la que estos elementos se encuentren va a estar determinada por el nivel de pH que se encuentre en el medio. Organolépticamente el pH influye principalmente sobre lo que percibe el paladar, es decir la sensación de acidez que es proporcionalmente dependiente de la fuerza ácida, mas no de la cantidad de ácidos que pueda contener el fermento. (pág. 10)

1.7.4.3 Aireación:

Al inicio de la fermentación, la velocidad estará relacionada directamente con la cantidad de oxígeno que se encuentre en el medio, aumentando la velocidad siempre que exista mayor concentración de oxígeno en la primera etapa. Una vez se culmine el inicio de la fermentación, las levaduras ya no requerirán del oxígeno. Si el medio contiene gran cantidad de oxigenación el proceso de fermentación alcohólica se volverá aerobio, por lo cual las levaduras empezarán a metabolizar los azúcares presentes en el medio por la vía respiratoria, formando de esta manera mayor cantidad de células. La agitación en la fermentación sirve para que esta se efectúe ligeramente más rápido que una fermentación sin agitación, al final si se comparan los dos procesos de fermentación alcohólica, el uno con agitación y el otro sin agitación, no se determinará mayor diferencia, lo único que se puede evidenciar al final de estos procesos es que en la fermentación sin agitación se encuentra un mayor grado alcohólico y mayor cantidad de azúcar al final de la fermentación. (Ramírez y Pedroza, 2001, pág.3).

1.8 Enzimas que interviene en los procesos fermentativos: (UNC, 2009, pág.1)

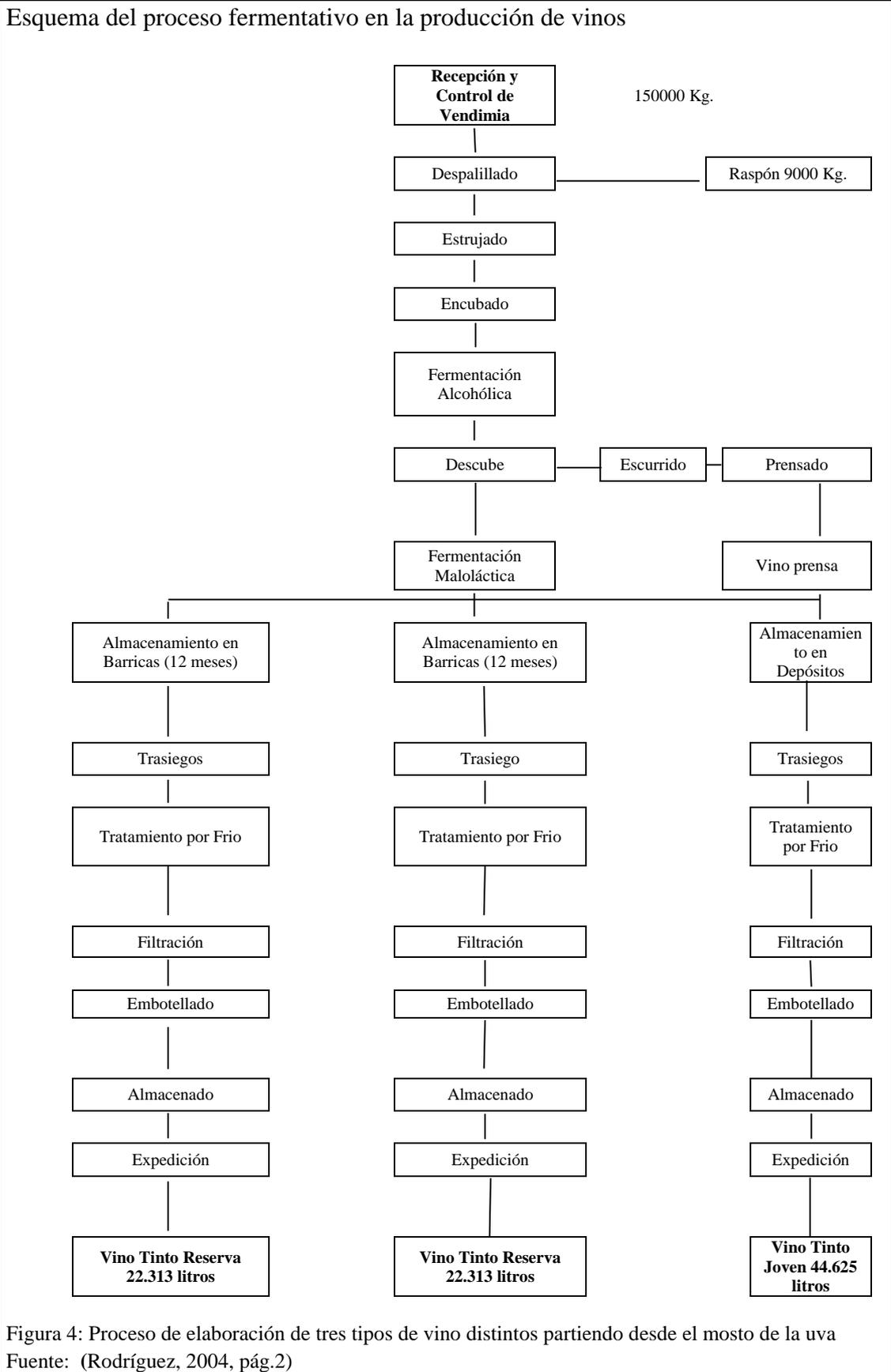
La función más importante que cumplen las enzimas en un proceso fermentativo es la de catalizar las reacciones bioquímicas. Existen cuatro grupos principales de enzimas que intervienen en la fermentación, estos son los siguientes.

- **Fosforilantes:** Tienen la función de unir o separar los radicales de fósforo que se encuentren presentes en las diferentes moléculas que intervienen en la fermentación. El mecanismo de acción de estas enzimas, consiste en degradar los polisacáridos mediante una reacción de fosforilación, la cual es catalizada mediante glucógeno-fosforilasa, liberando unidades de glucosa-1-fosfato, que a su vez serán transformadas en glucosa-6-fosfato la cual es el primer intermediario que se encuentra presente en la ruta de degradación de la glucosa
- **Oxidorreductoras:** Principalmente transportan hidrogeniones y colaboran con las reacciones de reducción y oxidación. Son enzimas de acción múltiple, la presencia de oxígeno se puede evitar por la adición de esta enzima,

acompañada de catalasa para impedir la destrucción de aromas y de pigmentos antociánicos por el peróxido libre que forma la glucosa-oxidasa.

- Carboxilasas: Principalmente intervienen en reacciones de descarboxilación y carboxilación con liberación de CO₂. Su mecanismo de acción en la fermentación alcohólica consiste principalmente en la degradación del piruvato por medio de la descarboxilación degradativa que es realizada por la enzima piruvato deshidrogenasa, la cual hace que el piruvato pierda una molécula de CO₂ y sea degradado a acetil CoA.
- Cuarto grupo: En este grupo se encuentran todas las enzimas restantes que catalizan otras reacciones como las de mutarotación, isomerización, en el caso de las isomerasas. Estas actúan desdoblado primero el almidón mediante glucoamilasa eventualmente inmovilizada, la glucosa resultante puede ser transformada mediante glucosa-isomerasa, para conseguir un alto poder edulcorante en la bebida que en este caso sería el vino.

1.9 Proceso fermentativo para la producción de vinos



CAPITULO 2

MARCO METODOLÓGICO.

El presente proyecto constó de dos fases, la primera fue el muestreo de la fruta en campo, y la segunda fase se llevó a cabo mediante el trabajo en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana CIVABI. (ver anexo 2)

2.1 Población y Muestra:

2.1.1 Población: 60 frutos de *Solanum betaceum* recolectados en 3 localidades distintas, como se detalla en la tabla 8.

Tabla 8.
Localidades de muestreo de frutos de *Solanum betaceum*

Provincia	Cantón	Parroquia	Coordenadas
Tungurahua	Santiago de Píllaro	Presidente Urbina	1°09'00.0"S 78°33'00.0"W
Pichincha	Quito	Yaruquí	0°09'39.1"S 78°19'24.7"W
Napo	El Chaco	Oyacachi	78°15'77°22'W 0°20'N 0°28'S

Notas: Coordenadas geográficas del muestreo realizado por Almeida y Betancourt (2013).

2.1.2 Muestra:

12 fundas Ziploc con un tomate de árbol cada una y 3 frasco de vidrio de 3.0L con 15 tomates de árbol cada uno, con el fin de obtener un peso total (Frasco + Frutos) de 1125.0g por frasco.

2.2 Limpieza y Desinfección

- Materiales y Reactivos

Papel Absorbente, agua destilada, etanol 70.0 °GL, Sablón, Mechero de gas, Hipoclorito de Sodio 5%

2.2.1 Procedimiento para desinfectar la cámara de flujo laminar basado en la Organización Panamericana de la Salud 2002:

- Encender el UV unos 15-20 min antes de usar la cabina. Transcurrido este tiempo, apagar la lámpara UV y encender el flujo laminar y la luz.
- Separar la tapa unos centímetros hasta que el flujo laminar se estabilice, entonces se puede retirar por completo.
- Limpiar la superficie de trabajo con un poco de agua, secar con papel absorbente, asperjar 10.0 ml de sablón por un minuto y secar con papel.
- Esparcir etanol al 70.0% durante un minuto y limpiar con papel absorbente.
- Colocar el material y los reactivos que se vayan a utilizar dentro de la cabina, rociándolos previamente con etanol.
- Encender el mechero de bunsen.
- Limpiar la cabina (cristal frontal incluido) con agua destilada y etanol.
- Al finalizar, colocar la tapa, apagar el flujo y encender la lámpara UV.
- Transcurridos 15-20 min apagar la lámpara UV. (pág.17):

2.3 Preparación de medios:

- Materiales y reactivos:

Plancha térmica, frasco autoclavable Boeco, agitador magnético, espátula, Paños absorbentes, papel aluminio, placas Pétri, Parafilm, esterilizador autoclave, balanza Analítica, Medio de cultivo YPD, Medio de cultivo Lisina, cloranfenicol, etanol 96.0°GL, etanol 70.0°GL,

2.3.1 Preparación de Caldo YPD para fundas de muestreo de frutos en fundas (Difco y BBL Manual, 2009, pág. 645)

- Instrucciones de preparación de Caldo YPD:
 - Suspender 65.0g de YPD agar o 50.0g de caldo YPD en un frasco Boeco con 1 L de agua destilada y mezclar bien.
 - Calentar el medio agar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolver el polvo completamente.
 - Autoclavar los medios tanto agar como el caldo, durante 45 minutos a una temperatura de 121.0°C y presión de 15.0 PSI.

- Dejar enfriar el frasco con el medio a temperatura ambiente hasta llegar a una temperatura aproximada de 50.0°C y bajo cámara de flujo colocar al medio de cultivo estéril 0,01 g. de Cloranfenicol.
- Dispensar 50.0 ml de Caldo YPD en cada una de las fundas Ziploc a utilizar, sellar la funda utilizando el sello hermético propio de la funda y refrigerar.

2.3.2 Preparación de Agar YPD Para Trabajo en Laboratorio. (Difco y BBL Manual, 2009, pág. 645)

- Instrucciones de Preparación para agar YPD (Difco y BBL Manual, 2009, pág.645)
 - Suspender 65.0g de YPD agar o 50g de caldo YPD en un frasco Boeco con 1 L de agua destilada y mezclar bien.
 - Calentar el medio agar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolver el polvo completamente.
 - Autoclavar los medios tanto agar como el caldo, durante 45 minutos a una temperatura de 121.0°C y presión de 15.0 PSI.
 - Dejar enfriar el frasco con el medio a temperatura ambiente hasta llegar a una temperatura aproximada de 50.0°C y bajo cámara de flujo colocar al medio de cultivo estéril 0,01 g. de Cloranfenicol.
 - Dispensar 15.0 ml de agar YPD en cada caja Petri estéril, repetir el procedimiento en las cajas que se crea necesario, sellar con cinta Parafilm y refrigerar (ver anexo 1)

2.3.3 Preparación de Medio Lisina

- Instrucciones de preparación (Fowell, 1965, pág.374).
 - Colocar 33.0g. del medio lisina (Lysine Medium) en un frasco Boeco con 500.0 ml de agua destilada.
 - Adicionar 5.0ml de Lactato de Potasio (Potassium Lactate marca Oxoid), calentar y agitar la solución en una plancha térmica con agitación magnética a una temperatura de 35.0°C para facilitar la dilución de los compuestos.

- Calentar el medio hasta llevarlo a ebullición, una vez llevado a ebullición retirar el frasco de la plancha térmica con la ayuda de guantes de calor y dejar reposar hasta que la temperatura descienda a 50.0°C aproximadamente.
- Bajo cámara de flujo, medir el pH del medio de cultivo con ayuda de un pH-metro digital.
- Regular el pH del medio de cultivo colocando mediante goteo, ácido láctico 10.0% V/V hasta regular el pH del medio a $4,8 \pm 0,2$
- Dispensar 15.0 ml de medio lisina en cada una de las placas Petri.

2.3.4 Preparación de medio YPD adicionando diversas concentraciones de alcohol.

- Instrucciones de preparación:
 - Colocar 65.0g de YPD agar en un frasco Boeco con 1L. de agua destilada, calentar y agitar la solución en una plancha térmica con agitación magnética a una temperatura de 350.0°C para facilitar la dilución de los compuestos.
 - Calentar la suspensión hasta llevarlo a ebullición, una vez llevado a ebullición, retirar el frasco de la plancha térmica con la ayuda de guantes de calor.
 - Autoclavar el medio de cultivo durante 45 minutos a una temperatura de 121.0° C y presión de 15.0 PSI.
 - Dejar en reposo el frasco con el medio de cultivo a temperatura ambiente con el fin de enfriarlo hasta llegar a una temperatura aproximada de 50.0°C.
 - Trasladar el frasco a una cámara de flujo laminar y con ayuda de pipetas estériles colocar las distintas concentraciones de etanol con las cuales se desea trabajar las que se especifican en la tabla 9:

Tabla 9.
Cantidades de etanol utilizadas en la preparación de medio YPD agar alcoholizado

Cantidad de medio de cultivo preparado (ml)	Concentración inicial de Etanol (°GL)	Cantidad de etanol a dispensar en el medio de cultivo (ml)	Concentración final de etanol en el medio (°GL)
1000	96°	62,5	6°
1000	96°	83,33	8°
1000	96°	104,16	10°
1000	96°	125	12°

Notas: Concentraciones de etanol utilizadas para preparar el medio de cultivo YPD para prueba de resistencia alcoholica.

Fuente: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

- Dispensar 15.0ml de agar YPD en cada caja Petri estéril, hasta obtener 60 cajas por cada litro de medio YPD, repetir el procedimiento en las cajas de ser necesario, sellarlas con cinta Parafilm y refrigerar (ver anexo 7)

2.3.5 Preparación de Medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA): (Difco y BBL Manual, 2009, pág.645)

- Instrucciones de Preparación para SDA
 - Suspender 65.0g de SDA en un frasco Boeco con 1 L de agua destilada.
 - Calentar y agitar el medio hasta llevar a ebullición con el fin de conseguir una mezcla homogénea.
 - Autoclavar el medio de cultivo durante 45 minutos a una temperatura de 121.0 ° C y presión de 15.0 PSI.
 - Dejar enfriar el frasco con el medio a temperatura ambiente hasta llegar a una temperatura aproximada de 50.0°C y bajo cámara de flujo colocar al medio de cultivo estéril 0,01g. de Cloranfenicol.
 - Dispensar 15.0ml de medio SDA en cada caja Petri estéril, repetir el procedimiento en las cajas que se crea necesario, sellarlas con cinta Parafilm y refrigerar de 0.0 - 4.0°C.

2.4 Muestreo de frutos de *Solanum betaceum*

- Materiales y Reactivos

Fundas Ziploc, Cooler, cuchillos estériles, guantes estériles, papel absorbente, fundas plásticas, tijeras en forma de hoz, marcador, frascos de vidrio de 3L de capacidad, de boca ancha y estériles, papel aluminio, papel periódico, marcador permanente, gel refrigerante; Alcohol 70°GL, Caldo YPD, agua destilada; GPS: GARMIN ETREX VENTURE HC.

2.4.1 Muestreo de la Fruta en fundas con medio de cultivo y frascos

- Materiales y Reactivos

Fundas Ziploc, Cooler, cuchillos estériles, guantes estériles, papel absorbente, fundas plásticas, tijeras en forma de hoz, marcador, frascos de vidrio de 3L de capacidad, de boca ancha y estériles, papel aluminio, papel periódico, prensa para muestreo vegetal, flexómetro de 50.0 m, gel refrigerante; Alcohol 70°GL, Caldo YPD, agua destilada; GPS: GARMIN ETREX VENTURE HC.

- Toma de muestras de tomate de árbol en fundas Ziploc con medio YPD:

- Establecer un perímetro de muestreo, el cual fue un cuadrante de 50m².
- Mediante GPS determinar las coordenadas del muestreo.
- Observar y determinar las distintas plantas que posean frutos maduros.
- Tomar los frutos mediante un corte en su pedículo, dejándolo caer dentro de las fundas Ziploc, que contuvieron 50.0ml de caldo YPD.
- Presionar los frutos con suavidad hasta que quiebre su corteza para homogenizar la muestra con el caldo.
- Llevar cada fruto muestreado en las fundas Ziploc, al cooler.

- Toma de muestras en frascos de fermentación:

- Establecer un perímetro de 50.0m².
- Dejar caer uno a uno dentro del frasco estéril los frutos maduros cortando sus pedúnculos con cuidado para evitar contaminación cruzada.
- Llenar 3 frascos con 15 frutos maduros en cada frasco.
- Perforar a todos los frutos con un cuchillo hasta que su pulpa quede expuesta.

- Sellar los frascos y guardarlos en el cooler para su traspaso al laboratorio.
- Dejar estos frascos a condiciones ambientales durante 72 horas para que produzcan el fermento que se requiere (ver anexos 2 y 3)

2.5 Codificación de las cepas de levadura

- Asignar un código a cada una de las cepas obtenidas, este código consistió en una combinación de dígitos de texto y numéricos, los cuales indicaron el código de la muestra, el tipo de inóculo del cual procede el microorganismo y el número de colonia analizada.
- Identificar el fruto con las letras “TA” (Tomate de árbol), seguido por el número de muestra (número de muestra de fruto de tomate de árbol), acompañado por el estado original de la muestra (dilución o fermentación) y número de colonia de levadura seleccionada de la placa madre con la que se está trabajando, y finaliza con la letra “R” correspondiente a la resiembra y los números de las mismas, un ejemplo de esta codificación antes mencionada se puede evidenciar en la tabla 10 detallada a continuación.

Tabla 10.
Ejemplo de codificación de Cajas Petri utilizada por los autores

Código para cepas de levaduras que provienen de la fermentación.	Código para cepas de levaduras que provienen de las fundas Ziploc (dilución)
	

Notas: Orden de condificación de cepas de levaduras del tomate de árbol.

Fuente: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

2.6 Aislamiento

2.6.1 Aislamiento de las taxa de levaduras de fermentación y suspensión

- Materiales y Reactivos

Asas de microbiología, placas Petri, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 50.0ml, micropipetas de 500 y 1000 μ l, puntas de micropipeta, asas de Winogradsky, mechero de Bunsen, vaso de precipitación de 500ml, marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Sablón, Alcohol de 70.0°GL, caldo peptonado, medio Agar YPD y YPD Broth, agua destilada; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2. Autoclave horizontal TUTTNAUER AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER 3870M y autoclave vertical LINHA AV AV-50, balanza analítica Mettler Toledo NewClassic MF ML204/01, estufa magnética Mettler Toledo, microondas Panasonic NN – SA968W.

- Aislamiento de levaduras a partir de las fundas Ziploc:

- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo
- Tomar una porción del inóculo de cada funda Ziploc por medio de un asa previamente esterilizada en la llama del mechero.
- Estriar el inóculo sobre la superficie del agar YPD.
- Expandir el inóculo por toda la caja usando la técnica de agotamiento en placa o estría escocesa.
- Cerrar la caja Petri cerca del mechero.
- Sellar la caja con cinta parafilm en todo su contorno.
- Colocar las cajas selladas en un cooler a temperatura ambiente.
- Controlar el crecimiento de las colonias cada 24 horas.

- Aislamiento levaduras del frasco de fermentación:

- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo mediante 10.0ml de alcohol al 70.0% y 10.0ml de sablón.
- Abrir el frasco de vidrio en presencia del mechero.
- Tomar una alícuota de 1ml del fermento por medio de una micropipeta.

- Inocular la muestra del fermento en el centro de la caja Petri que contiene el medio YPD.
- Extender el inóculo en la caja Petri mediante un asa de Winograski estéril, en forma circular.
- Cerrar la caja Petri en presencia del mechero.
- Sellar la caja con cinta parafilm y proceder a titularla.
- Colocar las 60 cajas sembradas en un cooler a temperatura ambiente (24.0°C aprox.)
- Observar el crecimiento de las colonias cada 24 horas.

- Re-siembra de taxa de levaduras por medio de estría escocesa: (García 2010, pág.21)

Una vez obtenida la muestra frutal, que posee distintos microorganismos, provenientes de los frascos de fermentación y de las fundas Ziploc, se resiembra cada una de las colonias hasta conseguir aislarlas y purificarlas, para lo cual se establece los siguientes pasos:

- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo con 10.0ml de alcohol al 70.0% y 10.0ml de sablón.
- Esterilizar el asa por medio de un esterilizador de asas.
- Enfriar el asa en la proximidad de la llama.
- Tomar una porción del inóculo con el asa.
- Transferir el inóculo hacia la superficie del medio de cultivo gelificado, intentando que sea justo en el borde. Extender este inóculo formando estrías sobre la superficie del medio. Realizar el estriado oscilando el asa de siembra sobre la superficie del agar, balanceando sucesivamente y rápidamente la muñeca. Flamear el asa nuevamente después de cada estría y dejarla enfriar. Repetir el proceso hasta completar los cuatro, aprovechando todo el espacio de toda la superficie de las cajas.
- Flamear el asa y tapar la placa de Petri.
- Colocar en el cooler las placas Petri a temperatura ambiente (aprox. 24°C) en posición invertida.

- Obtención de cultivos puros :(García 2010, pág.22):

- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo con 10ml de alcohol al 70.0% y 10.0ml de sablón.
- Seleccionar visualmente las colonias a ser sembradas.
- Sembrar una colonia aislada de cada tipo de levadura en una placa con medio nutritivo.
- Incubar durante 24 horas las cajas sembradas a 37.0°C.
- Confirmar visualmente que el nuevo cultivo es puro por la morfología colonial.

2.7 Selección de taxa de levaduras por siembra en medio de cultivo selectivo

- Materiales y Reactivos

Asas de microbiología, cajas Petri estériles, toallas desechables, parafilm, marcador permanente, fósforos, cooler, Alcohol de 70°GL, Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.

- Re-Siembra de cepas puras de levadura en Medio Lisina: (Morris y Eddy. 1957, pág.34)
- Utilizar los cultivos puros aislados en medio YPD y las placas Petri contenedoras del medio Lisina.
- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo mediante 10ml de alcohol al 70.0% y 10.0ml de sablón.
- Tomar una porción de inóculo de levadura aislada en medio YPD (una ligera punción del asa de inoculación sobre una colonia pura perfectamente formada).
- Sembrar en la placa Petri con medio lisina mediante estría escocesa.
- Cerrar de forma inmediata la placa Petri de medio lisina y sellarla con cinta Parafilm.
- Guardar las placas Petri inoculadas con los cultivos puros de levadura a temperatura ambiente y controlar el crecimiento microbiano tras 24 y 48 horas de la siembra.
- Realizar un repique de las cepas que presenten crecimiento microbiano y formación de colonias para confirmar los resultados obtenidos.

2.8 Identificación de cepas de levaduras (Linares y Solís, 2007, pág.39)

2.8.1 Identificación Macroscópica

- Materiales y Reactivos

Cajas petri con cepas de levadura que presenten crecimiento total, Lupa cuenta colonias, Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet, Alcohol de 70.0°GL

- Procedimiento para realizar identificación macroscópica

- Analizar las características de las colonias presentes en placa Petri con una lupa cuenta colonias. Luego de 96 horas de incubación de las mismas a condiciones de temperatura ambiente (18.0°C aproximadamente).
- Analizar el aspecto que presenta una colonia, una vez que ha alcanzado su crecimiento máximo en placa Petri.
- Observar las cepas de levadura a través de una lupa cuenta colonias, la cual posee una lente de poder óptico de 4 aumentos, con el cual se puede visualizar de forma más detallada las características morfológicas de cada cepa microbiana.

2.8.2 Identificación Microscópica

- Materiales y Reactivos

Asa de inoculación, Porta Objetos, Microscopio óptico Cajas Petri con microorganismo, Agua destilada, Azul de lactofenol 10.0% V/V, aceite de inmersión, Alcohol 70.0°GL, Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet, Campana de extracción de gases.

- Procedimiento para realizar la identificación microscópica

- Colocar 1 gota de agua destilada en un porta objetos previamente desinfectado

- Con el asa de inoculación tomar un inóculo de el microorganismo de interés (una ligera punción del asa de inoculación sobre una colonia pura perfectamente formada) y realizar un frotis de la misma sobre la gota de agua colocada en el porta objetos.
- Flamear el porta objetos con la muestra hasta retirar el exceso de agua y permitir que la muestra microbiana se fije.
- Colocar una gota de lactofenol 10.0% V/V sobre la muestra microbiana fijada,
- Flamear ligeramente la muestra microbiana para retirar el exceso de lactofenol de la muestra (este procedimiento debe ser realizado en campana de extracción de gases)
- Observar la muestra microbiana en un microscopio óptico con aumentos paulatinos de poder óptico desde 4 a 100 aumentos (4 a 100X), con el fin de determinar la forma y tamaño de la célula además del tipo de agrupación entre las células de levadura.

2.8.3 Identificación Bioquímica (Thermo Scientific 2014, pág.22)

- Materiales y Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 500 ml, micropipetas de 100 a 1000 µl, puntas de micropipeta, mechero de Bunsen, vaso de precipitación de 500 ml. marcador permanente, , fósforos, cooler, Pruebas Remel; Alcohol de 70.0°GL, agua destilada, Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.

- Procedimiento para realización de pruebas RapID Yeast Plus REMMEL (Thermo Scientific 2014, pág.22)

Se utilizó las cepas microbianas que presentaron resistencia a altas concentraciones de etanol; las cuales fueron resembradas previamente en Sabouraud Dextrose Agar (SDA) para obtener resultados óptimos.

Se sembró los microorganismos en estudio en un medio de cultivo puro y se examinó con tinción de Gram antes de usarlos en el sistema con el fin de confirmar la pureza del mismo.

- Preparación del inóculo:

Suspender suficiente crecimiento de cultivo microbiano sembrado en SDA, en el tubo con líquido de inoculación RapID™ hasta conseguir una turbidez del líquido que impida visualizar las líneas de la tarjeta de inoculación RapID™ Yeast Plus a través del tubo.

- Inoculación de los paneles RapID™ Yeast Plus (Thermo Scientific, 2014, pág. 22):
 - Abrir la tapa del panel sobre el acceso de inoculación, tirando de la pestaña marcada hacia arriba y hacia la izquierda.
 - Transferir con una pipeta suavemente el contenido de todo el tubo de líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel. Tener en cuenta en el momento de la colocación de la muestra, se debe inclinar el panel ligeramente de forma lateral, para conseguir una distribución adecuada del líquido, evitando se acumule la muestra en el pocillo inicial.
 - Sellar nuevamente el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición original.
 - Agitar el panel suavemente de lado a lado para distribuir homogéneamente el inóculo a lo largo de las depresiones en la parte posterior del panel.
 - Regresar el panel a su posición horizontal e inclinar lentamente hacia delante, hacia los pocillos de reacción, con el fin de que el inóculo fluya a lo largo de las depresiones de los pocillos para distribuirlo de forma equitativa en cada pocillo de reacción.
 - Colocar de nuevo el panel a su posición nivelada. Si es necesario dar unos golpes suaves con el panel sobre la mesa para eliminar el aire atrapado en los pocillos (ver anexo 8)

- Incubación de los paneles RapID™ Yeast Plus: (Thermo Scientific, 2014, pág.22)

Incubar los paneles inoculados a una temperatura de 30.0°C en una incubadora sin CO₂ durante 4 horas. En caso de no contar con una incubadora sin CO₂, incubar el panel a temperatura ambiente.

- Puntuación de los paneles RapID™ Yeast Plus (Thermo Scientific, 2014, pág.23):

Los paneles RapID™ Yeast Plus contienen 18 pocillos de reacción que desarrollan 18 puntuaciones de prueba. Las pruebas que requieren un reactivo (pocillos del 7 al 14 y del 16 al 18) aparecen designados mediante un recuadro que los rodea. La puntuación se realiza siguiendo el siguiente procedimiento:

- Sujetar firmemente el panel RapID™ Yeast Plus sobre la mesa, retirar la cinta que cubre los pocillos de reacción. Para ello, tirar de la pestaña inferior derecha hacia arriba y hacia la izquierda.
- Añadir los reactivos siguientes a los pocillos que se indican:
 - Añadir una gota de reactivo RapID™ Yeast Plus A a los pocillos del 7 (NAGA) al 14 (PCHO).
 - Añadir una gota de reactivo RapID™ Yeast Plus B a los pocillos del 16 (PRO) al 18 (LGY).
- Esperar al menos 30 segundos pero no más de un minuto después de añadir el reactivo RapID™ Yeast Plus B, para que se desarrolle el color.
- Leer y puntuar los pocillos de prueba de izquierda a derecha usando la guía de interpretación. La puntuación se realizará por análisis colorimétrico comparativo con las muestras de la guía interpretativa (ver anexo 10)
- Ingresar los resultados obtenidos en el software ERIC® para la identificación.

2.9 Siembra en medio YPD adicionando diversas concentraciones de alcohol

- Materiales, Reactivos y Métodos

Asas de inoculación, cajas Petri, toallas desechables, parafilm, , marcador permanente, fósforos, cooler, guantes de calor; Alcohol de 70.0°GL; Alcohol al

96.0%; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.

- Re-Siembra de cepas puras de levadura en medio alcoholizado
- Desinfectar y sanitizar el área de trabajo
- Seleccionar las cepas de levadura que no muestran crecimiento en medio Lisina e identificar su Placa madre sembrada medio YPD
- Tomar una muestra de levadura aislada en medio YPD (una ligera punción del asa de inoculación sobre una colonia pura perfectamente formada).
- Sembrar el inóculo microbiano en una placa Petri mediante estría escocesa en medio alcoholizado de 6, 8 y 10°GL de acuerdo a necesidad.
- Cerrar de forma inmediata la placa Petri, codificarla y sellarla con cinta Parafilm
- Guardar las placas Petri inoculadas a temperatura ambiente y controlar el crecimiento microbiano cada 24 horas, hasta máximo 96 horas, tiempo en el cual las levaduras muestran su desarrollo completo.

2.10 Establecimiento del banco de levaduras (COPAN, 2012, pág.2)

- Materiales, Reactivos y Métodos
Toallas desechables, parafilm, micropipetas de 100 a 1000 µl, puntas de micropipeta, mechero de Bunsen, marcador permanente, fósforos, papel absorbente, caja de tubos Criobank®, vaso de precipitación de 500 ml, azas de microbiología; Alcohol de 70.0°GL, cultivos de levaduras establecidos en cajas Petri; Cámara de flujo laminar, Crioconservador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC C340 – 86
- Procedimiento para el almacenamiento los microorganismos.
Partir de una Placa Petri que contenga un cultivo fresco de levadura.
- Retirar una muestra concentrada y disolverla en el medio crio conservador que contiene el tubo de CRYOBANK®, hasta llegar a una turbidez equivalente a 3.0 o 4.0 estándares McFarland. (ver anexo 11)

- Cerrar el tubo y agitar vigorosamente para permitir una distribución adecuada del microorganismo en las perlas sumergidas en el líquido crio conservador de Cryobank.
- Extraer con ayuda de una micropipeta con puntas estériles, tanto fluido criopreservativo como sea posible y volver a cerrar el tubo.
- Codificar adecuadamente cada tubo y devolver a la caja contenedora (ver anexo 11).
- Almacenar la caja de tubos de Cryobank inoculados en un congelador entre -60 y -80°C.
- Realizar la conservación de cada cepa de levadura por cuadruplicado para asegurar la viabilidad de los tubos Criobank (Báez, 2013)

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Aislamiento y Selección de Taxa de levaduras

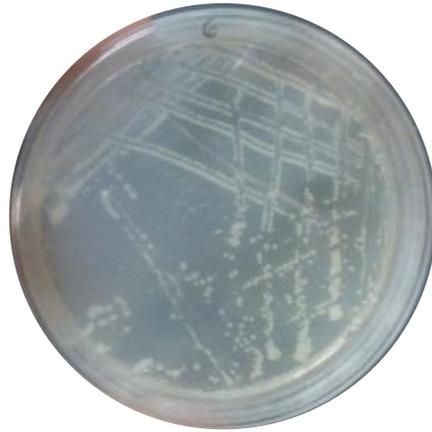
Tabla 11

Principales cepas de levadura Aisladas del fruto de *Solanum betaceum*

<p>Código: TA3 D12 R21-2-5</p> <ul style="list-style-type: none">- Color: Blanco- Forma: Circular- Díámetro: 3-6 mm- Borde: Entero	
<p>Código: TA1 F6 R2-3 (1Y2)</p> <ul style="list-style-type: none">- Color: Blanco- Forma: Circular- Díámetro: 4-6 mm- Borde: Ligeramente Irregular	
<p>Código: TA1 FE4 R1-2-5</p> <ul style="list-style-type: none">- Color: Blanco- Forma: Circular- Díámetro: 3-5 mm- Borde: Irregular	

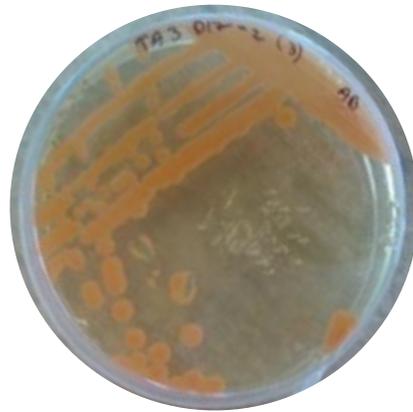
Código: TA6 D1 R7 -6-3

- **Color:** Blanco
- **Forma:** Circular
- **Diámetro:** 1-2 mm
- **Borde:** Entero



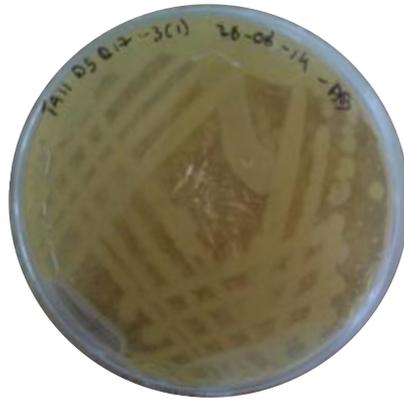
Código: TA3 D17 -2-3

- **Color:** Rosado intenso
- **Forma:** Circular
- **Diámetro:** 3 - 4 mm
- **Borde:** Semi- Ondulado



Código: TA11 D5 R17-3-1

- **Color:** Incolora
- **Forma:** Sin forma
- **Borde:** Sin borde definido
- **Nota:** No forma colonias Definidas, estructura mucosa sin forma

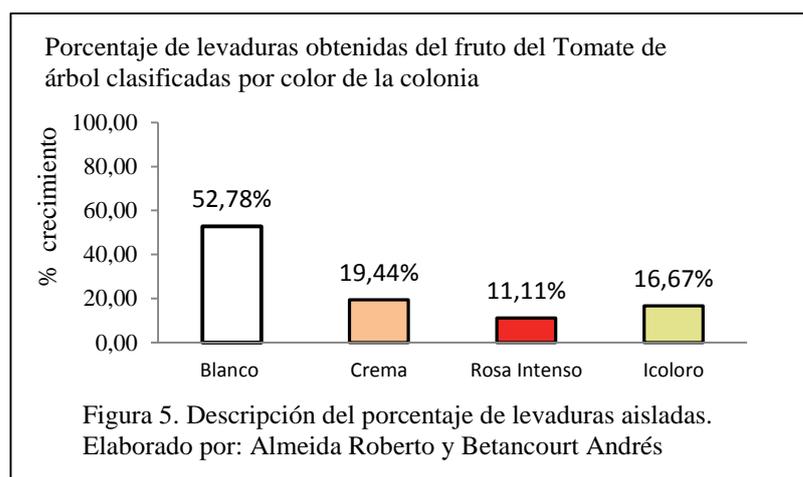


Notas: Descripción e imagen de cepas de levadura aisladas

Elaborado por : Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Se aislaron 36 cepas de levadura del fruto de *Solanum betaceum* en medio YPD + Cloranfenicol (ver anexo 6), seis de las cuales detallan sus características en la tabla 11, donde se indica color, forma, borde y otros detalles macroscópicos de las colonias microbianas.

Las levaduras se agruparon de acuerdo al color en 4 tonalidades diferentes entre las cuales se obtuvo: blanco, crema, rosa y trasparente. El color blanco fue el predominante con 19 cepas correspondiente al 57.0% del total de levaduras aisladas, seguido por el color crema con 7 cepas correspondiente al 19,44% del total, 6 cepas incoloras amorfas con aspecto mucoso correspondientes al 16,67% y 4 cepas de color rosa intenso o llamado también “Color Salmón”, correspondiente al 11,11% del total de levaduras aisladas como se muestra en la figura 5:



Las 36 cepas de levaduras obtenidas a partir de la corteza y pulpa expuestas de la fruta, coinciden con las condiciones de crecimiento que describen Carillo y Audisio (2001), quienes, afirman que, las levaduras se desarrollan sobre la epidermis de las frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes en el caso que se produzca un daño mecánico, tal como el generado en la presente investigación al momento de perforar los tomates de árbol con la cuchilla o romperlos con presión (pág. 40).

La mejor forma de aislar las colonias de levadura de acuerdo con Ortíz et al.(2014), es el vertido en placa, procedimiento en el cual se siembra un inóculo microbiano en placa Petri con medio de cultivo, sea sólido o líquido, esto para permitir un

crecimiento óptimo en un medio adecuado (pág.56). Ortíz, Miranda, Aldrete, Arvizu, Hernández, Pacheco y Martínez .(2014), realizaron su experimentación vertiendo en el medio de cultivo, inóculos microbianos de la levadura obtenida tanto del mosto como del producto de la fermentación espontánea de la uva (pág.67). Así también, Lucio et al. (2009), en su trabajo con levaduras vínicas, sembró las cepas de levadura en medio de cultivo YPD adicionado con antibióticos, procedimiento el cual, fue replicado por los autores de la presente investigación mediante la siembra de las cepas microbianas de mosto y producto de la fermentación del *Solanum betaceum* en placa Petri con medio de Cultivo YPD Agar o fundas con medio de cultivo YPD Broth (ver anexo 1), medios que contenían como nutriente principal la peptona de carne, óptima para crecimiento de levaduras en un pH de 5,5 y una temperatura de 25 a 30 °C, la cual no pudo alcanzarse por las condiciones de conservación de las levaduras llegando a valores de temperatura 16 a 18 °C y humedad de 83.0% aproximadamente de acuerdo al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador (pág.254).

Tras el aislamiento, se seleccionó las cepas de levadura con una alta capacidad fermentativa y resistencia alcohólica (Cepas del género *Saccharomyces*) mediante el medio de cultivo Lisina, lo que se indica en la tabla 12 presentada a continuación.

Tabla 12.

Análisis de crecimiento de levaduras de *Solanum betaceum* en medio Lysine médium

No.	Código	Tiempo de incubación en Horas				Género propuesto por medio Lisina
		24	48	72	96	
1	TA1 F6 R2-3 (1Y2)	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
2	TA3 D12 R21-2-5	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
3	TA1 FE4 R2 - 17-4	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
4	TA3 D12 R21-2-5	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
5	TA7 D14 R7 -4-5	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
6	TA1 FE4 R1-2-5	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
7	TA2 F3 R3-3	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
8	TA5 D2-2	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
9	TA1 FE4 R1 -4	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
10	TA11 D3 R18-3-1	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
11	TA5 D2 R22-3	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
12	TA7 D14 R6-9-3	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
13	TA7 D14 R7 -5-5	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
14	TA3 D11 R4 -4-2	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
15	TA7 D14 R6-9-3	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
16	TA1 F5 R4 -13	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
17	TA3 D12 R21 -1 -5	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
18	TA F2 R1 -20-5	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
19	TA7 D13 R23 -19-4	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
20	TA3 D17 -2-3	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
21	TA7 D14 R8-3	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
22	TA1 F4 R2-17-4	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
23	TA6 D1 R7 -6-3	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
24	TA3 D17 -2 -1	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
25	TA11 D5 R17-3-3	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
26	TA1 F5 R3 -14-5	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
27	TA3 D17 -2-3	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
28	TA6 D1 R7 -6-3	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
29	TA11 D5 R17-3-2	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
30	TA2 F3 R11 -3-3	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
31	TA2 F3 R11-3-1	-	-	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
32	TA2 F3 R11 -3-4	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
33	TA3 D17 -2 -2	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
34	TA2 F3 R11-3-2	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
35	TA11 D5 R17-3-1	-	-	-	+	No <i>Saccharomyces</i>
26	TA2 F3 R11-3-1	-	+	+	+	No <i>Saccharomyces</i>
% de cepas de levadura con Crecimiento		0%	27.7%	69,44	94%	
1R: Primer Repique 2R: Segundo Repique + :Crecimiento microbiano y formación de colonias -: Ausencia de Crecimiento microbiano						

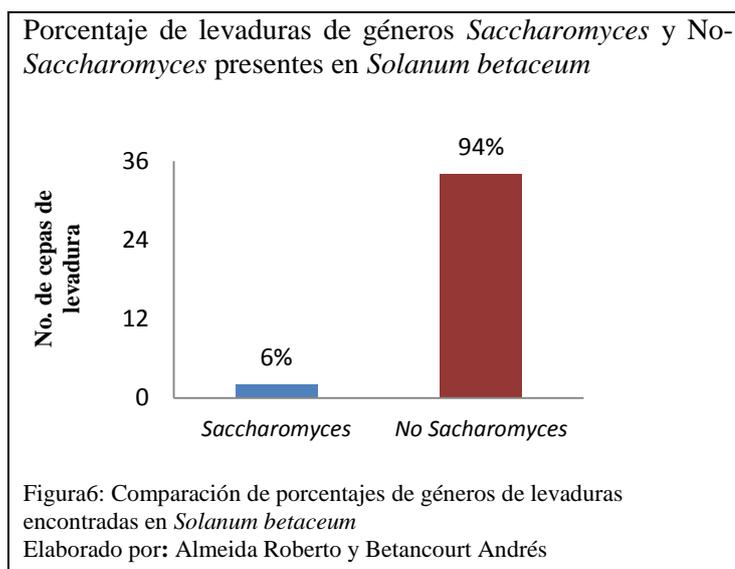
Notas: Control de presencia/ausencia de crecimiento de colonias en medio Lisina

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

La tabla 12, muestra que, el crecimiento de las levaduras de géneros diferentes a *Saccharomyces* en medio de cultivo Lisina culmina a las 96 horas. En las 24 primeras horas de incubación no se presentó crecimiento de levaduras en ninguna de las placas Petri analizadas. Este resultado cambia a las 48 horas de incubación, con un 27,7% de crecimiento de cepas de levadura correspondiente a 10 de las 36 colonias estudiadas. Al respecto Ortíz et al. (2014), sugieren que, a mayor tiempo de

incubación mayor será el desarrollo de las levaduras en el medio, hasta alcanzar un tiempo determinado en el cual se detendrá la reproducción celular. (pág. 99).

Tras 72 horas de incubación, tiempo al cual Formento et al. (2007), sugieren finalizar de la incubación, se presentó crecimiento en 26 de las 36 cepas de levadura estudiadas, lo que, corresponde a un crecimiento del 69.44% de las cepas totales (pág. 3). Por último, y debido a que la temperatura de incubación a la cual los microorganismos de la presente investigación fueron expuestos (18.0°C) no fue igual a la que Formento et al. (2007) y Ortiz, Miranda, Aldrete, Arvizu, Hernandez, Pacheco y Martinez . (2014), plantearon (25.0 - 30.0°C), se estableció un tiempo de 96 horas de incubación en total, en el cual se presentó el crecimiento final de 34 de las 36 cepas de levadura estudiadas, esto debido a que las levaduras al no tener las mismas condiciones de temperatura que las presentadas en la bibliografía tardaron 24 horas más en mostrar los resultados totales, los cuales se mantuvieron inmutables en días posteriores. (pág. 2)



La Figura 6, muestra que, 34 de las cepas analizadas son levaduras de género No-*Saccharomyces*, lo cual corresponde al 94,0% de las cepas de levaduras estudiadas, mientras que las dos únicas cepas de levadura que no presentaron crecimiento, corresponden al género *Saccharomyces*, y representan al 6,0% del total de levaduras de la presente investigación. Estas dos cepas de acuerdo con Morriss y Eddy (1957), no pueden asimilar la Lisina como única fuente de Nitrógeno, lo cual impide su crecimiento y formación de colonias en este medio de cultivo (pág.63). Morriss y

Eddy (1957), sugieren se realice un segundo repique de las levaduras que presentaron crecimiento de colonias microbianas con el fin de evitar que exista crecimiento provocado por los azúcares residuales del medio de cultivo previamente utilizado, en la tabla 12 se muestra los resultados del segundo repique realizado a las 96 horas de incubación, el cual entregó la misma respuesta microbiana de la previamente obtenida con un 94,0% de cepas de levadura No *Saccharomyces* a las 96 horas de incubación, 69.44% a las 72 horas, 27.7% de crecimiento a las 48 horas y ausencia total de crecimiento a las 24 horas de incubación. (pág. 63).

3.2 Identificación de levaduras

Se arupó las cepas de levaduras de acuerdo a sus características macroscópicas, con el fin de seleccionar representantes para someterlas a pruebas de identificación, mediante este procedimiento se obtuvo 6 grupos de levadura con características similares entre las cepas de cada grupo, pero diferentes entre los grupos.

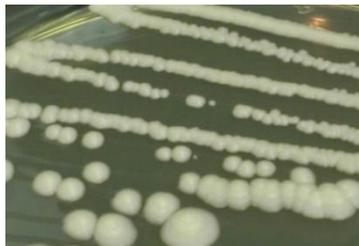
La identificación de las cepas de levadura se realizó mediante técnicas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, además se las sometió a una prueba de selección mediante la utilización de medio de cultivo Lisina, lo que entrega los resultados que se detallan de forma individual en los literales presentados a continuación.

3.2.1 Identificación Macroscópica:

3.2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 13

Descripción macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

Colonias de levaduras asiladas en agar YPD.	Descripción	Fotos comparativas bibliográficas
<p>Código: TA1 F6 R2-3 (1Y2)</p>  <p>Elaborado por: Almeida y Betancourt (2014)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Superficie: Plana - Borde: Ondulado - Forma: Ovalada - Textura: Suave/pastosa - Color: Blanco 	 <p>Fuente: Watson, (2012)</p>
<p>Código: TA3 D12 R 21- 2- 5</p>  <p>Elaborado por :Almeida Roberto y Betancourt Andrés</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Superficie: Plana - Borde: Ondulado - Forma: Ovalada - Textura: Suave/pastosa - Color: Blanco 	 <p>Fuente: Watson, (2012)</p>

Notas: Comparación fotográfica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

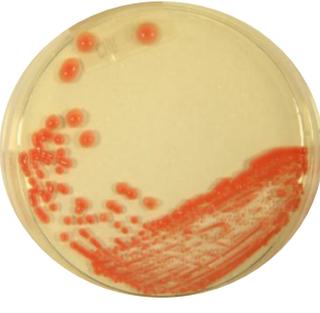
La tabla 13, muestra la comparación morfológica entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas en laboratorio y las cepas estudiadas por Watson (2012), en estas gráficas se puede observar que las cepas obtenidas en laboratorio presentan, forma circular, borde ondulado, textura suave, superficie plana que se distingue por el apareamiento de un pequeño punto protuberante en el centro de la colonia, son pastosas y su color posee distintas tonalidades que van desde el blanco hasta el color crema. Estas características coinciden en las reportadas por Garzón y Hernandez (2009), quienes afirman que, *Saccharomyces cerevisiae* forma colonias de color ligeramente crema, apariencia húmeda y brillante de bordes ligeramente irregulares. (pág. 132).

Las características descritas tanto gráfica como bibliográficamente por los distintos autores y en comparación con las colonias obtenidas en el presente estudio describen a esta levadura como *Saccharomyces cerevisiae*, ya que, todas sus características morfológicas son similares, tanto su color, su borde y la forma de las colonias se asemejan, por lo tanto se presume que las cepas aisladas en el presente estudio pertenecen a la especie de las *Saccharomyces cerevisiae*, además olfativamente presentan una cualidad particular que es su olor dulce.

3.2.1.2 *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabla 14.

Descripción macroscópica de *Rhodotorula mucilaginosa*

Colonias de levaduras asiladas en agar YPD.	Descripción	Fotos bibliográficas comparativas
 <p data-bbox="331 1256 671 1323">Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="715 1010 975 1037">– Superficie: Convexa <li data-bbox="715 1055 975 1122">– Borde: Entero/ ondulado <li data-bbox="715 1140 975 1167">– Forma: Circular <li data-bbox="715 1184 975 1211">– Textura: Cremosa <li data-bbox="715 1229 975 1256">– Color: Naranja 	 <p data-bbox="1118 1256 1326 1283">Fuente: LIFE (2014)</p>

Notas: Comparación fotográfica de la bibliografía obtenida para *Rhodotorula mucilaginosa*.
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés.

En la tabla 14, se pueden observar la gráficas de la especie *Rhodotorula mucilaginosa* estudiada por LIFE (2014) y la foto descriptiva de la especie aislada en el presente estudio, en esta resaltan las características morfológicas, las cuales describen el color de esta especie que es el rojo salmón o anaranjado, su mucosidad característica, borde entero, textura pastosa y superficie convexa. Las características antes mencionadas coinciden con los datos bibliográficos expuestos por Russo, Libkind, Sampaio, y Van Broock (2006), quienes mencionan a la especie *Rhodotorula mucilaginosa*, como levaduras que tienen las siguientes características morfológicas (párr.10): colonias mucosas, textura cremosa, borde entero, superficie convexa y principalmente se diferencian del resto de levaduras por su coloración

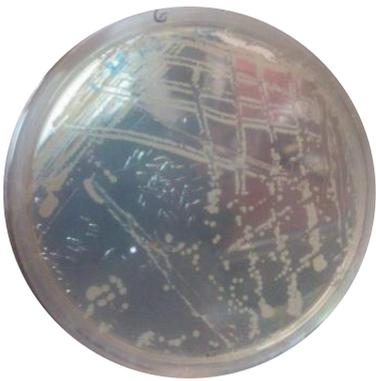
rosado intenso o Rojo Salmón, que Libkind y Van Broock (2007), afirman, es el resultado de la acumulación de pigmentos carotenoides de interés industrial, tales como torularodina, toruleno y b-caroteno. (pág. 170-171).

Por todas las características morfológicas antes mencionadas se presume que esta levadura pertenece al género *Rhodotorula*, especie de *R. mucilaginosa*.

3.2.1.3 *Cryptococcus neoformans*

Tabla 15.

Descripción macroscópica de *Cryptococcus neoformans*

Colonias de levaduras aisladas en agar YPD.	Descripción	Fotos bibliográficas comparativas
 <p data-bbox="290 1352 673 1422">Elaborado por: (Almeida y Betancourt, 2014)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="708 994 991 1025">– Superficie: Convexa <li data-bbox="708 1037 970 1068">– Borde: Entero <li data-bbox="708 1079 986 1111">– Forma: Circular <li data-bbox="708 1122 986 1153">– Textura: Pastosa <li data-bbox="708 1164 1023 1196">– Color: Blanquecino 	 <p data-bbox="1059 1352 1417 1411">Fuente: (Gil , Foster, y Neira, 2006, parr.16)</p>

Notas: Comparación fotográfica de cepas de *Cryptococcus neoformans*.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

En la tabla 15, se observan las levaduras aisladas en el presente estudio y las fotografías bibliográficas obtenidas de *Cryptococcus neoformans*. Las levaduras aisladas en el laboratorio presentan forma circular, superficie convexa, color blanquecino que al paso del tiempo se vuelven de color terracota, textura pastosa y borde casi circular, características similares sobre estas levaduras son descritas por Gil , Foster, y Neira (2006), estos autores describen a las colonias de *Cryptococcus neoformans*, como levaduras que se caracterizan por tener aspecto cremoso y color blanquecino, que van cambiando a color amarillo y otro canela con el pasar de los días, tienen una textura pastosa, forma esférica, ovoide o a veces de forma alargada

(pág. 10). El Instituto Nacional de Salud de Lima, (2007), agrega a esta descripción otras características como: colores de colonia brillante, poco elevada y de bordes continuos. (pág. 96).

Las imágenes de la presente tabla describen colonias pequeñas que no poseen mucha separación, su color característico como se puede apreciar es el blanco y su forma se asemeja a la de un coco, su borde no presenta irregularidades, por lo tanto es entero y se puede observar una tonalidad blanca cremosa. Por todas estas características morfológicas se presume que las cepas aisladas pertenecen a la especie *Cryptococcus neoformans*.

3.2.1.4 *Candida krusei*

Tabla 16

Descripción macroscópica de *Candida krusei*

Colonias de levaduras asiladas en agar YPD.	Descripción	Fotos bibliográficas comparativas
 <p data-bbox="352 1541 616 1608">Elaborado por: (Almeida y Betancourt, 2014).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="699 1256 932 1285">– Superficie: Plano <li data-bbox="699 1301 963 1330">– Borde: Irregular <li data-bbox="699 1346 963 1375">– Forma: Ovalada <li data-bbox="699 1391 963 1420">– Textura: Pastosa <li data-bbox="699 1435 1007 1464">– Color: Blanquecino 	 <p data-bbox="1043 1529 1406 1559">Fuente: (Tangarife , 2011a, párr. 5)</p>

Notas: Fotografía comparativa de *Candida krusei*.

Elaborado por :Almeida Roberto y Betancourt Andrés

En la tabla 16, se puede apreciar la gráfica de la cepa en estudio, la cual describe a colonias de color blanco, que poseen una elevación del mismo color, la cual resalta en el centro de la colonia, este se encuentra acompañado de una semicircunferencia de color blanquecino, a medida que esta se va alejando de este punto va reduciendo su tonalidad, poseen una textura pastosa, borde irregular, ya que, no llegan a ser

redondas, sus colonias son grandes, alargadas y presentan una superficie plana. En la fotografía realizada por Tangarife (2011 a), muestra características morfológicas de las colonias aisladas de *Candida krusei*, las cuales según este autor presentan textura pastosa, borde irregular, tamaño de colonia grande, color blanquecino y relieve plano (pág. 20). En otra investigación propuesta por él, se describen a las colonias que pertenecen al género de las *Candida krusei* como colonias cremosas, de color blanco amarillento, brillantes, poco elevadas y de bordes bien definidos.

Estas descripciones coinciden con las características morfológicas que presentan las levaduras pertenecientes a *Candida krusei*, según el presente estudio ya que, son colonias con bordes bastantes irregulares, de color blanquecino, que se agrupan una junto a otra formando colonias alargadas. La característica distintiva de esta levadura es la formación de un punto blanquecino central, por estas características y las anteriormente mencionadas por los distintos autores, se presume que las colonias de levaduras aisladas en la presente investigación, pertenecen a la especie de *Candida krusei*.

3.2.1.5 *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus*

Tabla 17.

Descripción macroscópica de *Cryptococcus neoformans* var. *Uniguttulatus*

Colonias de levaduras asiladas en agar YPD.	Descripción	Fotos bibliográficas comparativas
 <p>Fuente: (Almeida y Betancourt, 2014).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Superficie: Plano - Borde: Sin borde definido - Forma: Amorfa - Textura: Pastosa - Color: Blanquecino 	 <p>Fuente: (Tangarife, b , 2011).</p>

Notas: Comparación fotográfica de *Cryptococcus neoformans* var. *Uniguttulatus*.
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

En la tabla 17, se puede observar la cepa de levadura aislada en la presente investigación, la cual cumple con las siguientes características: son amorfas, crecen en una sola pasta de color blanquecino, textura mucosa, sin borde definido y de

superficie plana, además se distinguen por la ausencia de colonias aisladas. La imagen descrita por Tangarife (2011 b), demuestra la similitud morfológica entre la cepa de levadura aislada en la presente investigación y la cepa de levadura estudiada por el autor, quien considera a esta levadura como una *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus*. Además afirma que las levaduras que pertenecen a esta especie no presentan una forma específica, tampoco muestran la presencia de colonias completamente aisladas, y en general se presentan como colonias mucoides y sin coloración o con coloración blanquecina. Por estas características morfológicas analizadas se puede presumir que la levadura aislada pertenece a la especie *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus*.

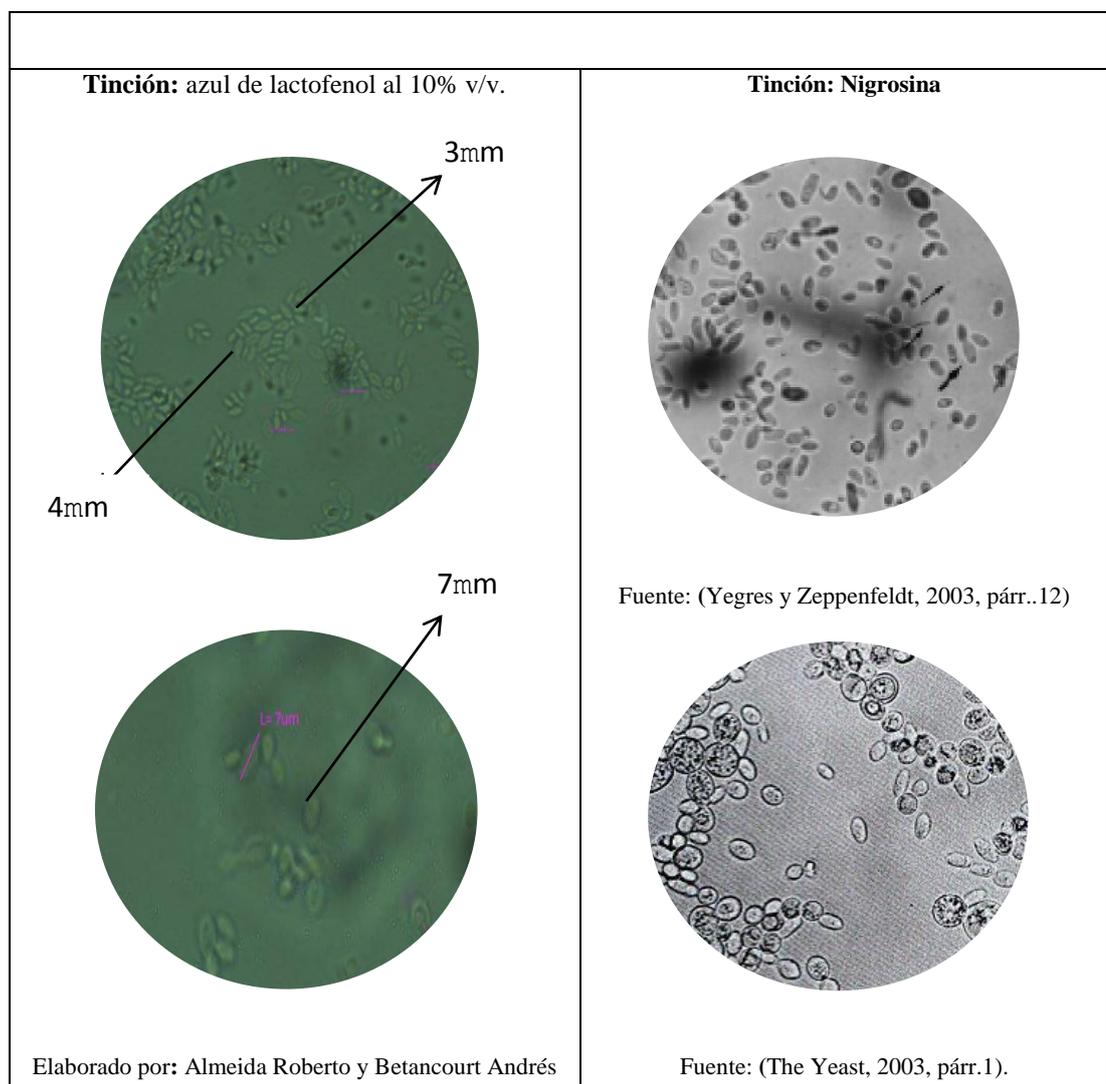
3.3.2 Identificación Microscópica:

Se comprobó la presencia de levaduras de géneros como *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Criptomococcus*, las cuales se describen detalladamente en los cuatro literales presentados a continuación

3.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 18.

Imagen microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* con lente de 100 aumentos (100X)



Notas: Comparación microscópica de *S. cerevisiae*
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

La tabla 18, muestra las fotografías microscópicas de las cepas que tienen los siguientes códigos: TA1 F6 R2 -3 (1Y2) y TA3 D12 R21-2-5, tal y como se muestra en la imagen tomada por (Yegres y Zeppendfeldt, 2003, párr.12) y (The Yeast, 2003, párr.1).

Como se puede observar, en las dos microfotografías microscópicas de las levaduras propuestas por los autores en la tabla 18 de la presente investigación, las levaduras del género *Saccharomyces*, son organismos unicelulares, con diámetro variable entre 3 y 9µm, rango el cual es aceptado por Yamamoto y Orsanai (2002), quienes afirman que las levaduras de este género pueden presentar dimensiones entre 2 a 8µm de diámetro y longitud de 2 a 25µm. (pág. 8).

Las fotografías de la tabla 18, corresponden a una cepa de levadura de forma celular alargada (fotografía de la parte superior izquierda), de dimensiones entre 3 y 5µm, y la segunda (fotografía de la parte inferior izquierda), corresponde a una cepa de levadura con forma celular oval, ligeramente alargada, de mayor dimensión promediando los 7µm. Ambas cepas de levaduras mostraron formación de agrupaciones celulares y ausencia de hifas, características que The Yeast (2003), afirma son tradicionales de este género (párr. 1).

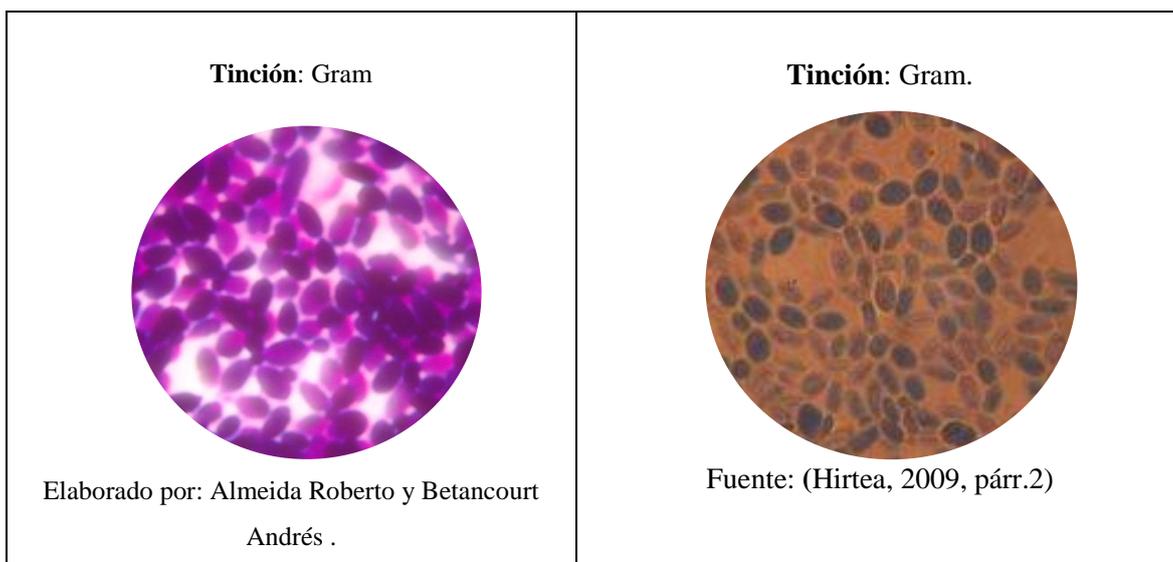
Petrenko (2005), propone la existencia de una considerable variedad de formas celulares para levaduras del género *Saccharomyces*, pudiendo presentarse desde la forma alargada, pasando por una forma oval más específicamente similar a un huevo, y pudiendo llegar incluso a formas celulares completamente circulares como se muestra en la tanto en la imagen superior como inferior derecha, formas que coinciden con las imágenes obtenidas en laboratorio, por lo tanto se confirma que la cepa aislada pertenece microscópicamente a la especie de las *Saccharomyces cerevisiae* (pág.15).

3.3.2.2 *Rhodotorula mucilaginosa*

Las fotografías microscópicas de las levaduras presentadas en la tabla 19, identifican la cepa de levadura TA3 D17-2(3) aislada en la presente investigación, como *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tabla 19.

Imagen microscópica de *Rhodotorula mucilaginosa* con lente de 100 aumentos (100X).



Notas: Comparación microscópica de *R. mucilaginosa*.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Las células de *Rhodotorula* propuestas por los autores de la presente investigación, son células ovoides o circulares alargadas, gram positivas, poseen diámetro aproximado de 6 mm, características básicas que son confirmadas en descripciones realizadas por la UNAM (2007), que proponen al género *Rhodotorula*, como células redondas u ovoides que se presentan en grupos celulares no muy densos. (pág. 233).

Las dimensiones celulares de este género de acuerdo con Hirtea (2009), son variables, van desde los 2 hasta los 6.5 mm, según los estudios realizados por Prieto et al. (2004), en levaduras de manzana, más específicamente dimensiones entre 5 a 6 mm para células de *Rhodotorula mucilaginosa* recolectadas de especies frutales, lo cual se puede corroborar ya que, la dimensión obtenida en el presente estudio es de 6 mm. (pág.226).

Luego de analizar todas las similitudes microscópicas, de tamaño, forma y color tras la tinción gram, encontradas entre la levadura aislada en el presente estudio con la

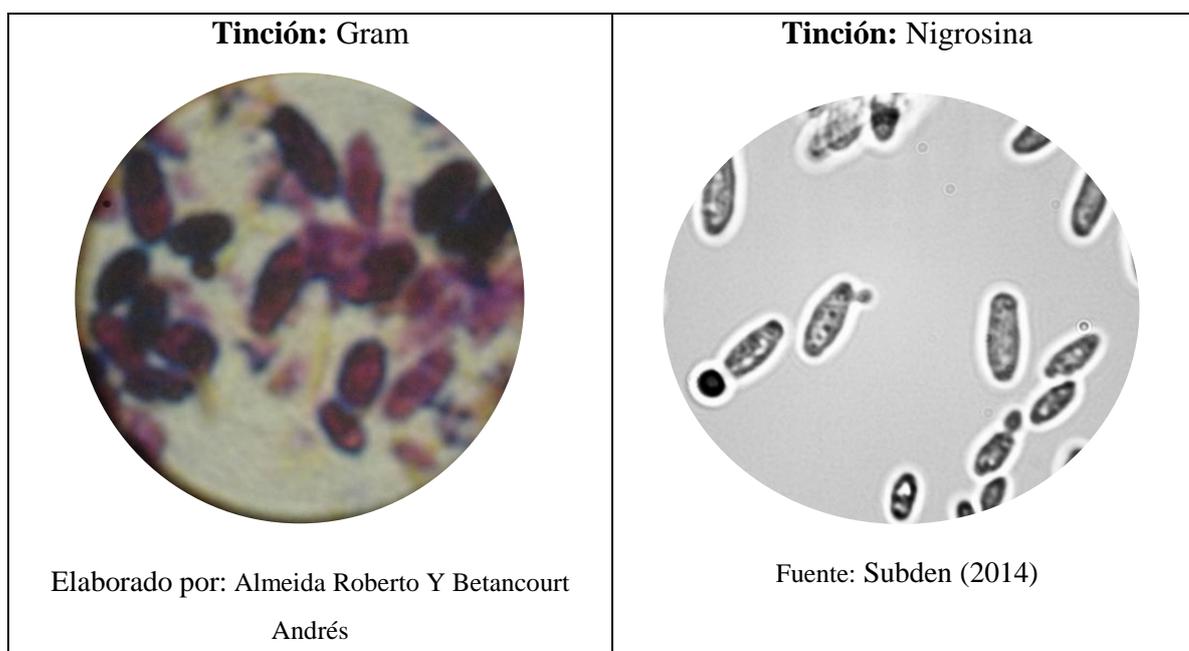
imagen bibliográfica, y confirmado por su análisis de características macroscópicas detalladas en puntos anteriores, se presume que la levadura en estudio pertenece a la especie de las *Rhodotorula mucilaginosa*.

3.3.2.3 *Candida krusei*

Las características y detalle fotográfico de las microscopías del microorganismo correspondiente a la cepa de levadura con código TA3 D12 R21-2-5 obtenido en la presente investigación, se muestra en en la tabla 20 detallada a continuación

Tabla 20.

Imagen microscópica de *Candida krusei* con lente de 100 aumentos (100X)



Notas: Comparación microscópica de *Candida krusei*.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

La tabla 20, muestra que la microscopía con 100 aumentos de la cepa de levadura aislada en la presente investigación tiene pequeñas agrupaciones de células, o células aisladas, con forma ovoide, ausencia de hifas, alargadas, de dimensiones entre 6 y 10 mm, tamaño que es confirmado por (Subden, 2014, párr.1), quien propone dimensiones comunes entre 2 a 15 mm para el género *Candida*, rango que es

reducido a diámetros entre 3.2 a 9.3 mm según la Universidad de California (2014) para *Candida krusei*. (pág.1).

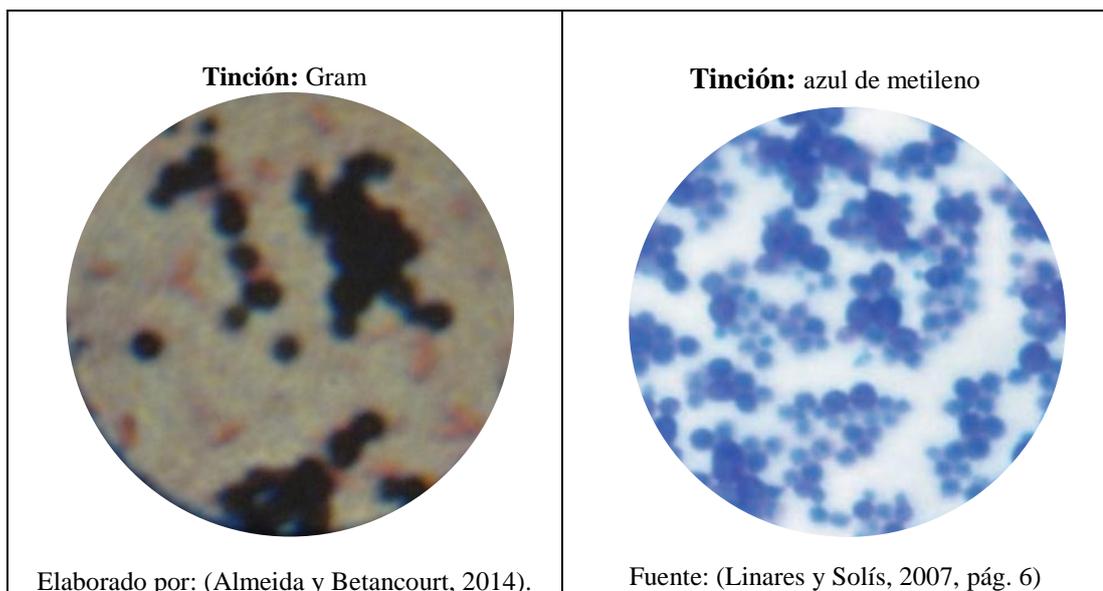
La descripción de la cepa de levadura analizada, al igual que la descripción planteada por la Universidad de California (2014), determina que esta levadura muestra células generalmente aisladas, con muy poca formación de pequeñas agrupaciones, que además, según Castañón (2013), responden a la tinción como gram positiva (párr.24). Estas descripciones sumadas al análisis de las características macroscópicas presentadas con anterioridad, permiten presumir que dicha levadura pertenece al género *Candida* y específicamente a la especie *Candida krusei*.

3.2.2.4 *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus*

Los criterios para la identificación microscópica de *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus* propuesta para la cepa de investigación con código TA11 D5 R17 -3(1) se muestra en la tabla 21 detallada a continuación

Tabla 21.

Imagen microscópica de *Cryptococcus neoformans* var. *uniguttulatus* con lente de 100 aumentos (100X)



Notas: Comparación microscópica de *Cryptococcus neoformans* var. *Unniguttulatus*.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Como se puede observar en la fotografía microscópica de la cepa de levadura de código TA11 D5 R17-3(1), esta presenta células redondeadas u ovaladas, agrupadas en racimos al estilo de Estreptococos y teñidas de color azul o negro debido a la tonalidad que brinda la tinción Gram, tinción que permitió una mejor visualización de estas células bajo microscopio a comparación de las imágenes obtenidas con el azul de lactofenol y el azul de metileno. Esta descripción coincide con la de la fotografía propuesta por Linares y Solís (2007), quienes a pesar de utilizar una diferente tintura para la microscopía, muestran células con las mismas características, en forma y agrupación que las propuestas por los autores de la presente investigación.(pág. 6)

Las dimensiones de las células de levadura en la fotografía propuesta en este estudio, se encuentra entre 3 a 5 mm, tamaño que resultaría relativamente aceptable por (Arango y Castañeda, 2003, parr.22), y confirmado por Castañon (2013) quienes plantean agrupaciones celulares densas con dimensiones entre 4 a 7 mm y de 4 a 6 mm respectivamente, medidas que son clásicas del género *Cryptococcus* (párr.5).

La similitud entre las descripciones otorgadas por los autores del presente estudio con las investigaciones de (Linares y Solis, 200, pág.2) además de Arango y Castañeda (2003) en sus registros fotográficos y bibliográficos, acompañados de la descripción macroscópica previamente realizada, nos permiten suponer que la cepa de levadura de código TA11 D5 R17-3(1) analizada, corresponde a la especie *Cryptococcus neoformans var. uninguttulatus*. (pág.6)

3.4 Pruebas de Identificación Bioquímica (Remmel RapID Yeast Plus System)

Tabla 22

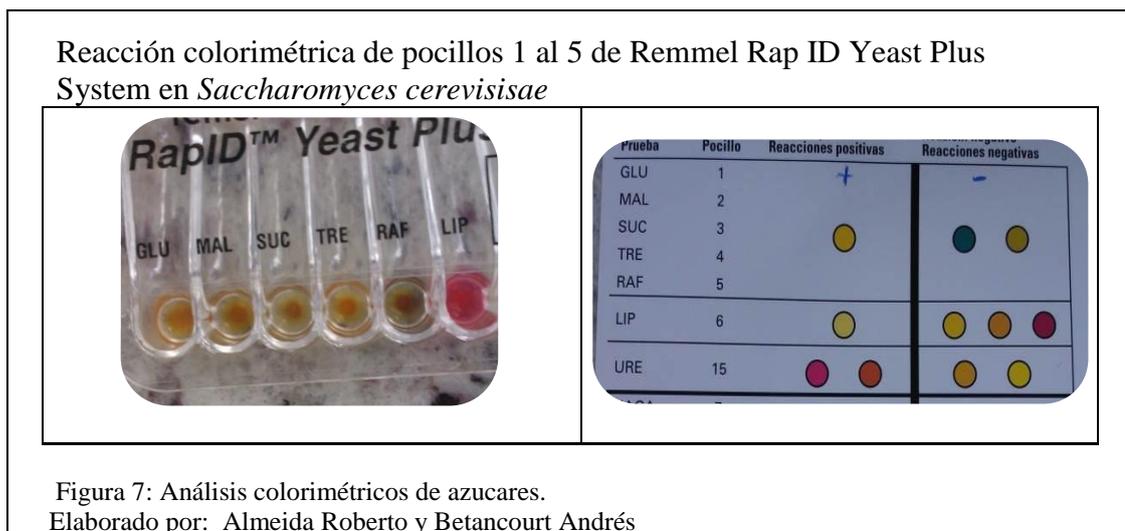
Resultados colorimétricos de pocillos de reacción e identificación de levaduras en software Eric®

REACTIVO	CODIFICACIÓN					
	TA1 F6 R2-3 (1Y2)	TA3 D12 R21-2-5	TA11 D5 R17-3-1	TA3 D17 -2-3	TA6 D1 R7-6-3	TA1 FE4 R1-2-5
Glucosa	+	+	-	+	+	+
Maltosa	+	+	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	-	-	-	-
Éster de ácido Graso	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-N-acetil-β, D-galactosamide	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-α, D-glucósido	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-β, D-glucósido	+	+	+	-	-	-
α-nitrofenil-β, D-galactósido	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil, α, D-galactósido	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-β, D-frucósido	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil fosfato	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil fosforilcolina	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	+	+	+	+
Prolina-β-naftilamida	-	-	+	+	-	-
Histidina β-naftilamida	+	+	-	-	-	-
Leucil-glicina β-naftilamida	-	-	+	+	-	+
IDENTIFICACIÓN SOFTWARE ERIC®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cryptococcus neoformans var. uniguttulatus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Candida krusei</i>

Notas: Resultado de pruebas de reativos Remmel RapId Yeast Plus System.
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

En la tabla previamente presentada, se puede observar que, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de asimilar los cinco primeros azúcares propuestos en prueba Remmel (Glucosa, Maltosa, Sucrosa, Trehalosa y Rafinosa),

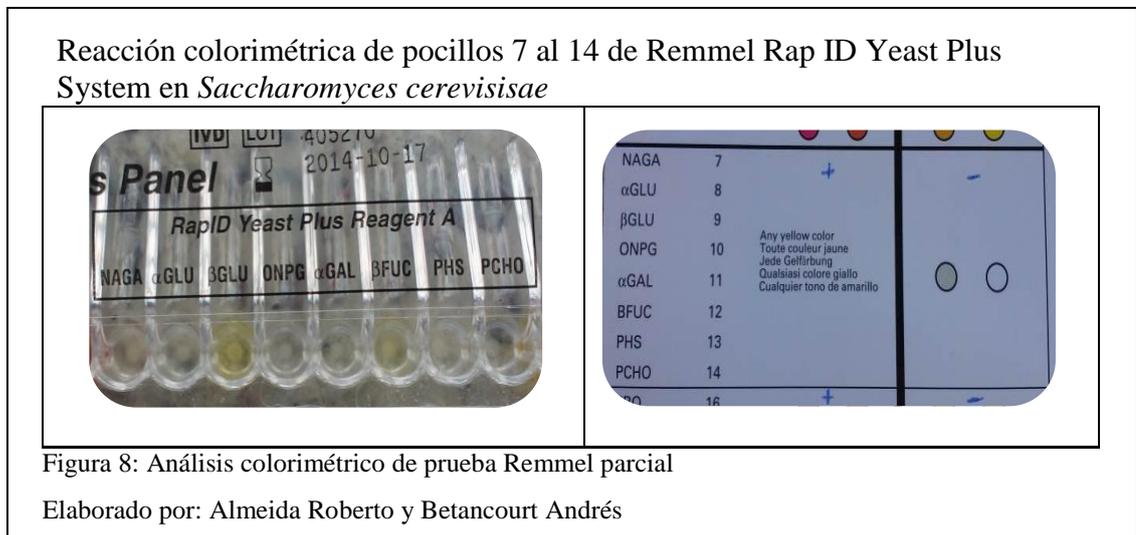
mostrando resultado positivo, generando un cambio de color en los pocillos de transparente a amarillo (Ver figura 7), que Balows, Hauster, y Herrmann, (2003) afirman ocurre por el descenso del pH del medio debido a la generación de productos ácidos lo que induce el cambio de color del indicador. Esto mientras que solamente 3 de las 4 levaduras *No-Saccharomyces* asimilaron el primer azúcar que es la glucosa, generando cambio de color de los pocillos de transparente a tonalidades verdosas (pág.69).



En el kit Remmel RapId Yeast Plus System, el pocillo contenedor del compuesto Ester de ácido graso (pocillo 6), no muestra reacción positiva en ninguna de las cepas de levadura analizadas. Al respecto Lodder (1970), sugiere que, hubo liberación de compuestos básicos lo cual no permitió la hidrolización de los ácidos grasos, impidiendo el descenso en el pH, lo que entrega colores naranjas en el indicador del pocillo de reacción que indica un resultado negativo (pág.5).

Los siguientes compuestos del grupo p-nitrofenil (p-nitrofenil-N-acetil- β , D-galactosamide; p-nitrofenil- α ,D-glucósido; β -nitrofenil- β , D-galacósido; p-nitrofenil, α , D-galactósido; p-nitrofenil- β ,D-frucósido; p-nitrofenil fosfato y p-nitrofenil fosforilcolina), tras la adición del reactivo RapID™ Yeast Plus A, no presentaron resultados positivos, esto al mantener su coloración translúcida inicial (Ver figura 8). Mientras que, el compuesto p-nitrofenil- β ,D-glucósido (pocillo 9), fue el único que mostró reacción positiva al ser hidrolizado por *Saccharomyces cerevisiae* y *Criptomococcus neoformans*, presentando como resultado la generación de color amarillo en los tres casos. Según Bobey y Ederer (2003), la hidrólisis

enzimática del glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera o- o p-nitrofenol amarillo, es detectado con ayuda del reactivo RapID™ Yeast Plus A generando el cambio de color (pág. 393).



El pocillo contenedor de Urea (pocillo 15), mostró reacción positiva para todas las levaduras No-*Saccharomyces* estudiadas, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* no presenta cambio de color, o generó colores correspondientes al indicador negativo. Por lo tanto se asume que *Saccharomyces cerevisiae* no realizó hidrólisis de la urea, lo cual, no da lugar a productos alcalinos que aumenten el pH y esto impidió el cambio de color del indicador. (Roberts, Horsmeir, y Foxworth, 1978, pág.586).

Para los tres últimos pocillos de reacción, *Saccharomyces cerevisiae*, fue capaz de hidrolizar solamente Histidina β-naftilamida, la cual sintetizó arilamida que generó la liberación de β-naftilamina, compuesto que se detectó mediante el reactivo RapID™ Yeast Plus B, produciendo cambio de color a cualquier tonalidad de rojo intenso o púrpura como se puede ver en la figura 9.

Reacción colorimétrica pocillos 16 al 18 de prueba Remmel Rap ID Yeast Plus System en *Saccharomyces cerevisiae*



Figura 9. Análisis colorimétrico de prueba Remmel
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Saccharomyces cerevisiae, no tuvo la capacidad de hidrolizar Prolina- β -naftilamida y Leucil-glicina β -naftilamida, mostrando como resultado una reacción negativa presentando cambio de tonalidad de trasnlúcida a tonos de crema-rosado debido a que de acuerdo con Norris, J. y D. Ribbons (1976), la hidrólisis enzimática del sustrato de arilamida libera β -naftilamina que se detecta con el reactivo RapID Yeast Plus B generando una reacción que cambia el color del sustrato a tonos purpuras o rojos como se muestra en la figura 9 previamente indicado (pág.9).

Tras el ingreso de los datos obtenidos de los pocillos de reacción Remmel en el Software de identificación Remmel Eric® (ver anexo 8), se pudo confirmar los resultados de los análisis macro y microscópicos previamente realizados, indicando la presencia de 5 especies de levadura diferentes, entre las cuales se obtuvo dos especies correspondientes a *Saccharomyces cerevisiae* (ver anexo 9), una *Rhodotorula mucilaginosa*, una especie de *Candida krusei*, una cepa correspondiente a *Cryptococcus neoformans* y por último, la variedad *Cryptococcus neoformans var. uniguttutulatus*.

3.5 Tolerancia al etanol

Tabla 23.

Porcentaje de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa TA3 D12 R 21- 2- 5) y (cepa TA1 F6 R2-3 (1y2)) en medio Etanolizado

		Concentración de Etanol (°GL)			
Cepa de levadura	Tiempo de incubación	0°	6°	8°	10°
TA3 D12 R 21- 2- 5	24 horas	10%	10%	0%	0%
	48 horas	100%	75%	25%	0%
	72 horas	100%	100%	75%	50%
	96 horas	100%	100%	90%	60%
TA1 F6 R2-3 (1y2)	24 horas	25%	25%	0%	0%
	48 horas	100%	50%	20%	0%
	72 horas	100%	100%	60%	50%
	96 horas	100%	100%	90%	50%
		Porcentaje de Crecimiento (%)			

Notas: Tablas de porcentaje de crecimiento de levadura en medio YPD con etanol

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Porcentaje de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* cepa TA3 D12 R 21- 2-5 a diferentes concentraciones de alcohol en un periodo de incubación determinado

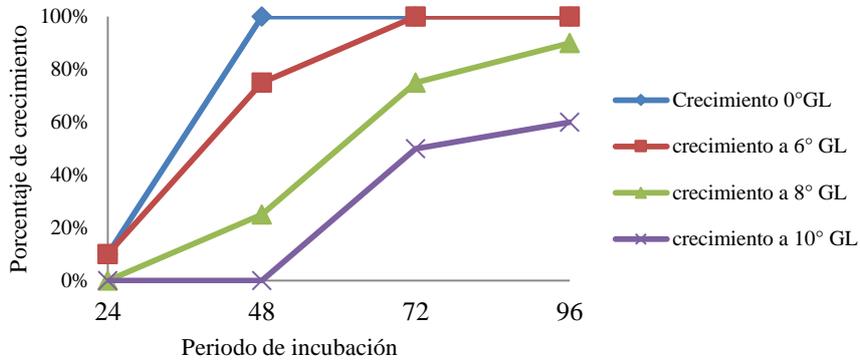


Figura 10. Comparacion de crecimiento en tiempos determinados
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Porcentaje de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* cepa TA1 F6 R2-3 (1y2) a diferentes concentraciones de alcohol en un periodo de incubación determinado

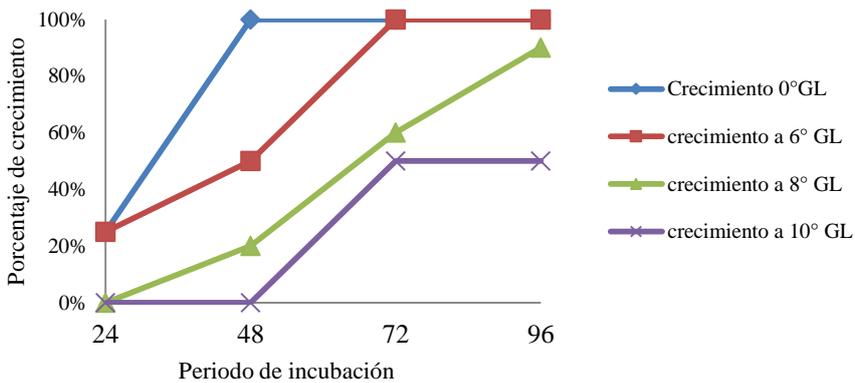


Figura 11. Comparacion de crecimiento a tiempos determinados
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Imágenes testigo de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* Cepa (TA3 D12 R 21- 2- 5) a diferentes concentraciones de etanol

Cepa madre y siembra de *Saccharomyces cerevisiae* en medios con etanol a 6, 8 y 10 °GL, tiempo 48 horas

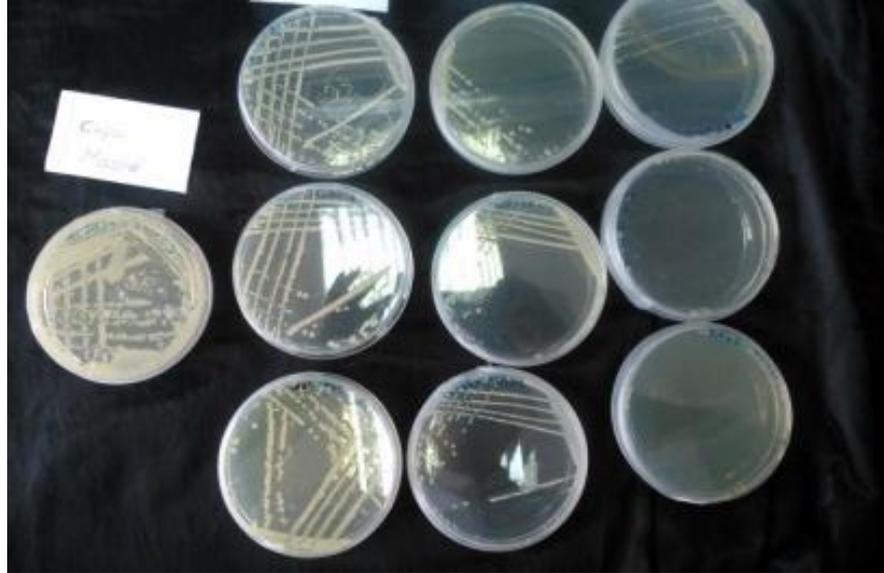


Imagen de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 6 °GL y cepa madre en tiempo 48 horas



Imagen de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 8 °GL y cepa madre en tiempo 72 horas

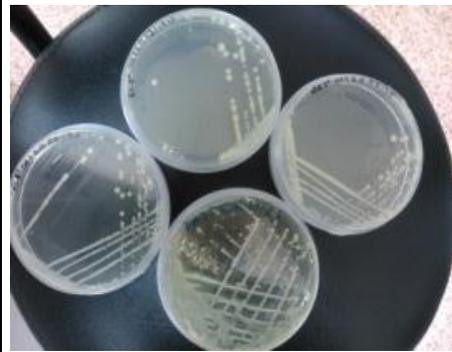


Imagen de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 10 °GL y cepas madre en tiempo 96 horas

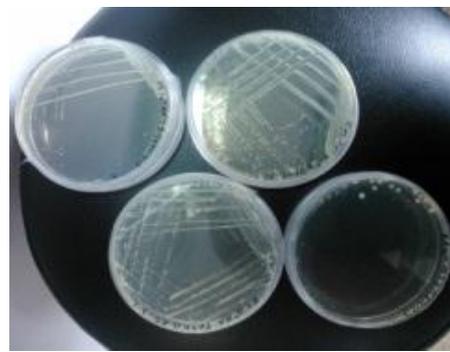
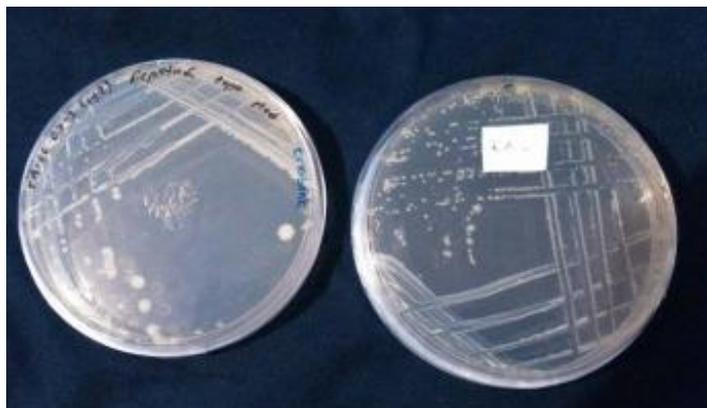


Figura 12. Comparación de crecimiento a diferentes concentraciones alcoholicas
Elaborado por: Almeida y Betancourt, 2014

Imágenes testigo de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* cepa (TA1 F6 R2-3 (1y2)) a diferentes concentraciones de etanol

Siembra de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 6 °GL y cepa madre en tiempo 72 horas



Siembra de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 8 °GL y cepa madre en tiempo 72 horas



Siembra de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con etanol 10 °GL y cepa madre en tiempo 96 horas



Figura 13. Comparación de crecimiento de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones alcohólicas

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

La tabla 23, figura 10, 11, 12 y 13 indican que la cepa madre de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa sembrada en medio YPD a 0°GL) de código TA3 D12 R 21- 2- 5 tras 24 horas de incubación presenta 10 % de crecimiento; mientras que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* con código TA1 F6 R2-3 (1y2) muestra 25% de crecimiento, porcentajes que aumentan al 100% tras 48 horas de exposición a temperaturas entre 16-18°C y humedad aproximada al 83%.

En las cepas de levadura en medio de cultivo con etanol a 6°GL, se presencié considerable resistencia alcohólica, esto se evidencia al obtener entre el 40 y 75% de crecimiento tras 48 horas de incubación. Se comprobó además que, mientras a mayor tiempo de incubación, mayor será el crecimiento del microorganismo en el medio, afirmación que se aplica hasta un tiempo de incubación de 96 horas. A las 72 horas de incubación, se evidenció un crecimiento del 100%, valor porcentual que fue obtenido por comparación de la placa analizada con la placa de la cepa madre inicial (medio YPD 0°GL).

El medio de cultivo con etanol a concentración de 8°GL, no mostró crecimiento en un tiempo menor a 24 horas; mientras que a las 48 horas se observó un aumento de las colonias de levaduras hasta llegar a un 20% de crecimiento para la cepa TA1 F6 R2-3 (1y2) y 25% para la cepa de levadura TA3 D12 R 21- 2- 5, estos valores comparados con el crecimiento de colonias de la cepa madre inicial. A las 72 horas de incubación, el desarrollo de las colonias alcanzaron valores de crecimiento del 60% para la cepa TA1 F6 R2-3 (1y2) y 75% de crecimiento para la otra cepa de *Saccharomyces cerevisiae* estudiada. El crecimiento total de ambas cepas se evidenció tras 96 horas de la siembra, tiempo en el cual se obtuvo un crecimiento final del 90% de las cepas de levadura en placa Petri.

La levadura expuesta a una concentración de etanol al 10°GL, como se indica en la tabla 24, no presenta crecimiento a las 48 horas, mientras que a las 72 horas de incubación, se puede evidenciar crecimiento de 50 % para ambas cepas de levadura. El crecimiento total a esta concentración alcohólica, se presentó transcurridas las 96 horas de incubación, tiempo en el cual la cepa TA3 D12 R 21- 2- 5, presentó crecimiento del 60%; mientras que la cepa TA1 F6 R2-3 (1y2), creció en un 50 %, estos porcentajes en comparación con los de las cepas madre la cepa madre.

Ambas cepas de levadura de especie *Saccharomyces cerevisiae*, muestran excelente resistencia alcohólica al exponerla a concentraciones de 6 °GL, buena resistencia a 8°GL y mediana resistencia a 10°GL. Estos resultados son confirmados por autores como Gonzales y Valenzuela (1998), quienes afirman que, *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de levadura excelente para la industria fermentativa, muy utilizada en la actualidad con estos fines, principalmente por su alta capacidad para resistir

elevadas concentraciones de etanol, tal como se demuestra en la presente investigación. (párr. 1).

Esta especie de levadura es considerada fermentativa por excelencia, y generalmente toleran altas concentraciones de etanol, esto se puede evidenciar en vinos comerciales, los cuales tienen una media de 12°GL, incluso según Regodón (2005), se han reportado varios casos donde *Saccharomyces cerevisiae* ha logrado producir concentraciones de alcohol superiores a 18° v/v. (pág.5)

Las pruebas de resistencia alcohólica a las que se sometió *Saccharomyces cerevisiae*, comprueban la teoría expuesta por Medina et al. (1999), quienes describen que en el momento en que la pared de las levaduras presenta mayor longitud en la cadena de ácidos grasos, muestra un mayor contenido de grupos CH₂, estos a su vez provocan el engrosamiento de la membrana, lo cual ayuda al aumento de su hidrofobicidad, provocando que la solubilidad de las moléculas polares disminuya. Todas estas características contribuyen al comportamiento de barrera que posee la membrana, al mismo tiempo contrarresta la desorganización membranal que provoca el etanol. Por lo tanto *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que cuenta con mayor cantidad de grupos CH ya que tuvo un alto porcentaje de crecimiento en todas las concentraciones de alcohol experimentadas (pág.47).

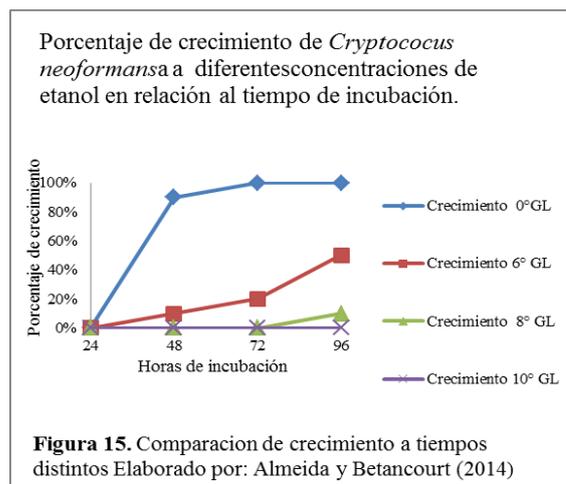
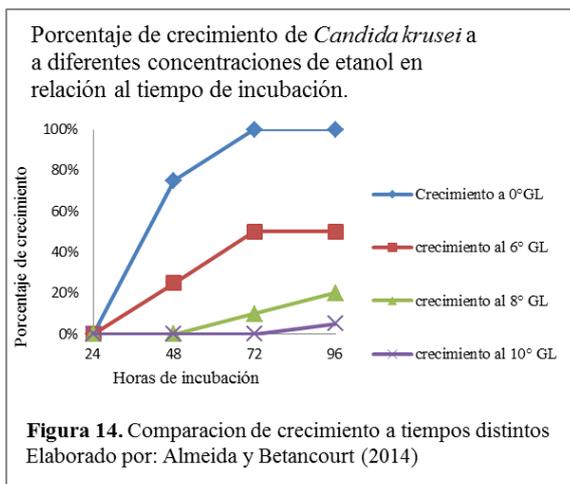
De acuerdo con Villamar (1992), varios géneros de levadura además de *Saccharomyces*, pueden presentarse en las diferentes etapas de los procesos fermentativos, los cuales pueden también mostrar considerable resistencia a ciertas concentraciones de etanol. Géneros como *Candida* y *Cryptococcus* entre otros, intervienen generalmente en procesos fermentativos referentes a la degradación de los azúcares con fines industriales y alimenticios; pero de estas, solamente *Saccharomyces cerevisiae* entrega las mejores cualidades fermentativas, es especial para la industria alimenticia, donde genera productos y sub-productos con características organolépticas superiores que las obtenidas de los demás géneros de levadura indicados.

Tabla 24: Porcentaje de crecimiento de cepas de levadura No- *Saccharomyces* en medio con diferentes concentraciones de etanol.

				Concentración de Etanol (°GL)			
Código	Identificación	Color	Tiempo de Incubación	0° (Cepa madre)	6°	8°	10°
TA1 FE4 R1-2-5	<i>Candida krusei</i>	Blanco	24 h	0%	0%	0%	0%
			48 h	75%	25%	0%	0%
			72 h	100%	50%	10%	0%
			96 h	100%	50%	20%	5%
TA6 D1 R7- 6-3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Crema	24 h	0%	0%	0%	0%
			48 h	90%	10%	0%	0%
			72 h	100%	20%	0%	0%
			96 h	100%	50%	10%	0%
TA3 D17 -2-3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Rosado Intenso	24 h	0%	0%	0%	0%
			48 h	60%	0%	0%	0%
			72 h	100%	30%	20%	0%
			96 h	100%	50%	30%	0%
TA11 D5 R17-3-1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>uniguttutulatus</i>	Incoloro	24 h	0%	0%	0%	0%
			48 h	50%	20%	10%	0%
			72 h	90%	20%	20%	0%
			96 h	100%	30%	25%	0%
				Porcentaje de crecimiento en placa			

Notas: Tabla de porcentaje de crecimiento de levaduras No- *Saccharomyces* en medio etanolizado

Elaborado por: Almeida y Betancourt (2014)



En la tabla 24 se puede evidenciar que, las cuatro cepas de levaduras No-*Saccharomyces*, presentaron diferentes niveles de tolerancia que van desde baja hasta moderada resistencia alcohólica a concentraciones de 6 y 8 °GL. Mientras que a 10°GL, el crecimiento de colonias microbianas fue casi inexistente, esto sugiere que las cepas de levaduras analizadas no resisten concentraciones de etanol iguales o superiores a los 8°GL.

La tabla 24 y figura 14 indican que, *Candida krusei* no presenta desarrollo de colonias a las 24 horas, en ninguna de las concentraciones alcohólicas analizadas, el mismo que comienza a evidenciarse tras 48 horas de incubación, con el crecimiento del 75% de la cepa madre y 25% de la cepa expuesta a 6°GL. Además se muestra ausencia de crecimiento para las cepas expuestas a 8 y 10°GL. A las 72 horas de incubación, tres de las cuatro cepas de levadura muestran crecimiento, la cepa madre alcanza su máximo crecimiento 100%, la cepa expuesta a 6°GL, muestra un crecimiento del 50 % y la cepa que se encontró en condiciones de crecimiento de 8°GL, apenas presento el 10 % de crecimiento. Al finalizar el crecimiento (96 horas), todas las cepas de levadura muestran crecimiento, tanto en presencia de 8 °GL, donde su crecimiento es del 20%, como cepa expuesta a concentraciones de 10°GL que muestra un crecimiento del 0 al 5%.

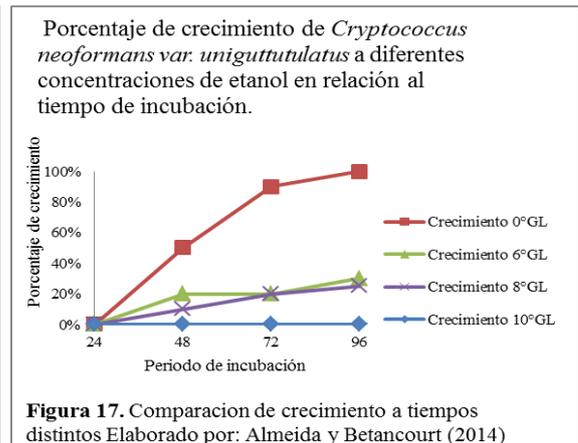
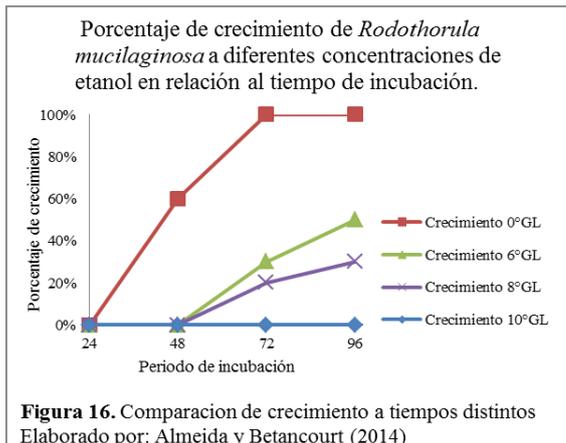
Pese a que *Candida krusei* resulto tener una resistencia media a concentraciones de alcohol de 6°GL, no se la considera una levadura con importancia en procesos fermentativos, y mucho menos se la considera como una especie resistente a grandes

concentraciones alcohólicas. Es por esto que Regodón (2007), afirma que esta especie produce gran cantidad de problemas en la producción de bebidas fermentadas, en especial cuando se presenta en estados avanzados de la fermentación, debido a que oxida al etanol produciendo gran cantidad de sabores indeseables y solamente aportan buenas características organolépticas al inicio del proceso y a muy bajas concentraciones de alcohol (pág.3).

La tabla 24 y figura 15 indican que, *Cryptococcus neoformans* a las 24 horas de incubación, no muestra crecimiento a ninguna de las concentraciones de etanol analizadas, mientras que a las 48 horas, solamente las concentraciones de 0°GL y 6°GL presentaron crecimiento de colonias microbianas correspondiente a 90% y 10% de desarrollo respectivamente. Luego de incubar durante 72 horas de las cepas, la tendencia de crecimiento se mantiene, mostrando crecimiento de solamente la cepa madre que llega a 100% de desarrollo, y de la cepa expuesta a 6°GL que logra un 20% de desarrollo.

Luego de 96 horas de incubación en diferentes concentraciones de alcohol, *Cryptococcus neoformans*, mostro finalmente crecimiento en tres de las 4 concentraciones a las que permaneció expuesta. La primera fue la cepa madre con un desarrollo final del 100%, la segunda fue la cepa expuesta a 6°GL con un crecimiento del 50% y por último la cepa expuesta a 8°GL, que mostro un 10 % de crecimiento, representado por la aparición de 5 pequeñas colonias de levadura de color crema.

La especie *Cryptococcus neoformans* no tiene interés en ninguna de las fases de la fermentación alcohólica, es por este motivo que Regodón (2007), la considera un contaminante sin beneficio alguno en los procesos fermentativos, esta levadura tampoco presenta elevada resistencia alcohólica, lo cual se corrobora con el estudio en progreso debido a que mostro una baja resistencia para todas las concentraciones alcohólicas a las que fue expuesta. (pág.4).



Como se observa tanto en la tabla 24 y en la figura 16, *Rhodotorula mucilaginosa*, es una especie de levadura con resistencia alcohólica baja. Esta especie de levadura no presentó crecimiento a las 24 horas de incubación bajo ninguna concentración de etanol analizada, mientras que, a las 48 horas se evidenció un crecimiento correspondiente al 60% a 6 °GL, en comparación con la cepa madre. A las 72 horas de incubación se presentó crecimiento microbiano en tres de las cuatro concentraciones alcohólicas analizadas, la cepa sin exposición a alcohol, mostró crecimiento total en la placa, esto mientras que las cepas expuestas a 6 y 8 °GL alcanzaron un desarrollo del 30 y 20% de colonias de levaduras respectivamente, en comparación con la cepa madre inicial. Tras 96 horas de incubación los resultados no se modificaron de gran forma en comparación de las 72 horas, solamente tres de las cuatro cepas de levadura presentaron crecimiento, la cepa madre con un 100% de crecimiento, las otras dos expuestas a 6 y 8 °GL, crecieron un 50 y 30% respectivamente. La cepa de levadura expuesta a 10°GL no presentó crecimiento de colonias de levaduras en ninguno de los tiempos analizados.

La cepa de *Cryptococcus neoformans* var. *uninguttulatus* indicada en la tabla 24 y figura 17, tiene baja resistencia alcohólica; ya que, a las 24 horas de incubación, no mostró crecimiento a ninguna concentración de etanol analizada. Mientras que, a las 48 horas presentó un 50% de crecimiento de la cepa madre, 20 y 10% de crecimiento para las cepas expuestas a medios con concentraciones de etanol de 6 y 8 °GL respectivamente. En cambio a las 96 horas, la cepa madre presenta un 100% de crecimiento, mientras tanto, a concentraciones de 6 y 8 °GL muestran valores de 30 y

25% de crecimiento respectivamente, comparado con la cepa madre inicial. Por último la cepa expuesta a 10°GL no presento crecimiento.

Levaduras del género *Cryptococcus* de acuerdo con Regodón (2007), se las puede encontrar en el aire de las áreas de procesamiento de frutas, o en áreas de bodegas de insumos de plantas productoras de bebidas fermentadas. Además estas levaduras pueden aportar de gran forma a la formación de sabores fenólicos en las bebidas, y es por esto que se las considera dentro del inóculo inicial de las bebidas fermentadas, pero debido a su baja capacidad para resistir al etanol, son rápidamente descartadas en los procesos fermentativos. (pág.5)

3.6 Banco de cepas de levadura útiles en procesos fermentativos

Cada cepa de levadura estudiada fue conservada en cuatro tubos Crioviales, los cuales fueron ubicados en el orden determinado en la tabla 28 (ver anexo11).

Tabla 25:
Ubicación de tubos CRIOBANK® en contenedor.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	X	X	X	X	X	X	X
C					X	X	X	X
D					X	X	X	X
E					X	X	X	X
F					X	X	X	X
G					X	X	X	X
H					X	X	X	X

SIMBOLOGÍA

Color	Especie	Espacios Utilizados
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H 1:4
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G 1:4
	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Uniguttutulatus</i>	F 1:4
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	E 1:4
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	D 1:4
	<i>Candida krusei</i>	C 1:4
X	TUBO CRIOBANK VACÍO	Restantes

Notas: Disposición de los viales de conservación en la caja portadora, congelados a -80°C en el laboratorio de microbiología del CIVABI.

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés.

Las cepas de levadura tras su identificación y sometimiento a resistencia alcohólica, fueron colocadas en crioviales CRIOBANK® para su conservación y congelación a -80°C en el criocongelador del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI, de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Girón, Quito-Ecuador.

Como se observa en la tabla 28, fueron las 6 especies de levaduras, las seleccionadas para ser crioconservadas, varias de las cuales se muestran en la figura 14 presentada a continuación.



Todas las especies conservadas de la presente investigación se encuentran a disposición del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI, con el fin de continuar las investigaciones de estos microorganismos.

CONCLUSIONES

- De 36 cepas de levaduras aisladas del fruto del tomate de árbol (*Solanum betaceum*), colectados en tres localidades distintas, se obtuvo 2 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* correspondientes al 6% del total de levaduras obtenidas.
- El tiempo adecuado para el análisis de crecimiento final de levaduras en medio selectivo Lisina, fue de 96 horas, periodo en el cual, finalizó el crecimiento microbiano, este permitió diferenciar levaduras de géneros *Saccharomyces* de las levadura No-*Saccharomyces* mediante la presencia de colonias en la superficie del medio de cultivo.
- Las pruebas de identificación Bioquímicas Remmel, permitieron evidenciar la presencia de levaduras con capacidad fermentativa como *Saccharomyces cerevisiae*, con un coeficiente de identificación del 99.9%. Además de otras especies sin interés fermentativo como *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorulla mucilaginosa* y *Cryptococcus neoformans* var. *Uninguttulatus* con un coeficiente de identificación igualmente aceptable.
- El fruto del tomate de árbol presenta predominancia de levaduras sin capacidad fermentativa ni resistencia alcohólica, identificadas mediante métodos macroscópicos, microscópicos y bioquímicos, como géneros de *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*.
- De las 6 cepas de levaduras expuestas a diversas concentraciones de etanol, solo el 33,33% corresponden a las cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, presentando considerable resistencia alcohólica en placa Petri a concentraciones de 6°GL, y mediana resistencia a concentraciones de 8 y 10°GL.
- La capacidad de tolerar concentraciones de etanol de 6, 8 y 10°GL por *Saccharomyces cerevisiae* fue superior al de las otras especies de levadura analizadas, expuestas a las mismas concentraciones alcohólicas y sometidas a similares condiciones de temperatura y humedad ambiental.
- La crioconservación de células de levaduras en un medio de preservación adecuado como CRYOBANK®, permitirá generar mayor viabilidad de las mismas al momento de su reactivación y siembra en medios de cultivos adecuados, permitiendo la posibilidad de generación de futuras investigaciones y aplicaciones industriales, tanto en la industria alimenticia como en la industria licorera.

RECOMENDACIONES

- Sembrar las muestras microbianas del fruto (dilución o fermentación), directamente en medio de cultivo Lisina, antes de su aislamiento, con el fin de seleccionar para el trabajo solamente las cepas de levadura con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica del género *Saccharomyces*.
- Realizar el aislamiento de la muestra microbiana de la funda Ziploc mediante diluciones, con el objetivo de obtener menor cantidad de UFC's por placa Petri, a fin de recuperar la mayor cantidad de colonias de levaduras viables del fruto.
- Utilizar prioritariamente azul de Lactofenol 10% como tintura para la observación al microscopio de la muestra microbiana fijada, debido a que esta tintura entregó mejores resultados que la tinción Gram y el azul de metileno
- Someter las muestras microbianas a pruebas de fermentación directa en mosto de *Solanum betaceum*, con el objetivo de conocer la adaptabilidad exacta de la levadura al contenido nutricional de la fruta.

LISTA DE REFERENCIAS

- Aleixandre, J. (1998). Factores que intervienen en la composición de un vino. *Revista alimentaria*.
- Alvarez, J. (1991). Efectos de la temperatura en la fermentación vinícola. *Revista vinícola: La viña, la vid y el vino.*, México D.F .
- Allen, S., Koneman, E., y Janda, W. (2007). Identificación de levaduras, Diagnóstico microbiológico.
- Agro Project. (10 de Noviembre de 2010). *Elaboración del vino*, documento no publicado disponible en <http://agroprojet.blogspot.com/2010/11/elaboracion-de-vinos.html>.
- Antonelli, C. (2011). Biotecnología de la industria vitinícola en Argentina. The microdynamics of technological change. London: *Journal of technology management and innovation*,
- Arango, L. y Castañeda, M. (2003). Criptococosis. Universidad de Antioquía, *Escuela de Microbiología*, Antioquia.
- Ausubel., Brent., Kingston., Moore. y Seidman. (1994). *Current protocols in molecular biology*, Difco Manual, Brooklyn .
- Ayala, P. (2011, 26 de Agosto). *La imortación y el consumo de vino en el Ecuador aumentó. Negocios*. El HOY. Quito.
- Balows, A., Hausler W. J., Hermann K. L., Isenberg H. D, ShadomyH. J. (1991). Manual of clinical microbiology, 5^a edición. *American society for microbiology*, USA.
- Baez, F. (23 marzo 2013). *Conservación de microorganismos*. INIAP-Santa Catalina, Quito- Ecuador.
- Beveridge, TJ. (1990). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Revista Investigación en discapacidad.
- Bobey, D. y Ederer G.M. (1981). *Journal of Clinic Microbiology*. 13:393-394

- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L. y Kunkee R. (2002). *Tolerancia al etanol*
Teoría práctica de la elaboración del vino . Zaragoza: Lacribia.
- Caicedo, C., Bolaños, V. y Cruz, M. (2008) (a). *Estudio de las posibilidades agroindustriales del tomate de árbol (Solanum Beteceum Cav.)*. INIAP Estacion Experimental Santa Catalina Administración Técnica,
- Caicedo, C., Bolaños, V. y Cruz, M. (2008) (b). *Estudio de las posibilidades agroindustriales del tomate de árbol (Solanum Beteceum Cav.)*, “Desarrollo de productos agroindustriales”. INIAP Estacion Experimental Santa Catalina Administración Técnica.
- Carlile, M. J. (2001). The Fungi. 2ª ed. Las Levaduras. *Manual de microbiología*, capítulo 4, Academic Press, San Diego.
- Carrillo, L. y Audisio, M. (2007). Levaduras. En Carrillo, L. y Audisio, M (Ed 1), *Manual de Microbiología de Alimentos*. (pp. 40-45). Documento publicado disponible en: http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim_2007/.Salta - Argentina.
- Castañón, L. (2013a). Candidiasis o Candidosis, Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, *Facultad de Medicina*, UNAM, México D.F.
- Castañón, L. (2013b). Cryptococosis, Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, *Facultad de Medicina*, UNAM, México D.F.
- Chalampunte, D. Priscila P. (2005). *Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendt) del banco de germoplasma del INIAP- Ecuador*, Tesis previa a la obtención del título de Ingenieras Agropecuarias. Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Ciencias Agrícolas y ambientales. Ibarra- Ecuador
- Claude, F. (2003). Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. *Levaduras fermentadoras*. Francia: QTK.

- COPAN INOVATION. (2012). *Cryobank conveniente sistema de perlas. How to Use Guide*. Documento no publicado disponible en: <http://www.medica-tec.com/arg/files/Copan-CryoBank.pdf>
- Davis, C.R., D. Wibowo, R. Eschenbruch , T. H. Lee. y G. H. Fleet (1985). *Practical implications of malolactic fermentation*. Enol Vitic, (California American Society for Enology and Viticulture), vol. 36 (4), 290-301. California.
- Déak, T. y Beauchat, L. (1996). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press. Boca Ratón. Florida
- De Rosa, T. (1998). *Tecnología de vinos blancos*. Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado. España
- Difco y BBL Manual. (2009). *Manual of Microbiological culture media*. Beckton, Dickinson and Company. 2da Ed.
- Empresa microsistemas. (2005). *Servicio de vinos*. Elaboración del vino . Unión Europea-Ideas Propias.Madrid.
- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E. Y Hatta, B. (2011). *Estudio de la actividad fermentativa de Hansenula anómala y producción de compuestos químicos de importancia sensorial*. Revista peruana de Biología. 18(3).
- Farfán, D. y Zambrano, M. (2010). *Plan de Negocios para comercializar tomate de árbol desde Ecuador a Estados Unidos de Norte América*. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniería en comercio Exterior y Negocios Internacionales. Universidad Laica Eloy Alfaro. Facultad de Comercio Exterior y Negocios Internacionales. Manabí- Ecuador.
- Fisher F, Cook NB. (1998). *Fundamental of Diagnostic Mycology*, WB Saunders Company, Pennsylvania; Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Caracas- Venezuela.
- Formento, J. C., Ercoli, E., Diaz, E., Sfredo, E., Nazarala, J., Galiotti, H. Sanchez, L., Luquez, C., Biere, C., Gómez, F., Pereira, C., Genovart, J. Riveros,

- R.(2007). Aislamiento, Selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones Vitivinícolas de la provincia de Mendoza. *Enología*, Revista Enología No.2 3ed. Mendoza- Argentina.
- Fowell, R. (1965). *The Identification of Wild Yeast Colonies on Lysine Agar*. *Journal Of Applied Bacteriology*, 28(3).
- Gallego, C. (2007). *Influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A*. Tesis previa a obtener el título de Química Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Tecnología Química. Pereira-Colombia
- García, E. (2010). *Prácticas de microbiología*. España: Microbiología. Artículo no publicado disponible en : <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- García, M. (2008). *Manual de manejo cosecha y poscosecha del tomate de árbol*. Corpoica, Bogotá- Colombia.
- Garzón, S. y Hernadez, C. (2009). *Estudio comparativo de la producción de etanol entre Saccharomyces serevisiae silvestre y Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Tesis previa a la obtención del título de Químicas Industriales. Escuela Tecnológica Química. Pereira- Colombia
- Gil, G., Foster, C., y Neira, O. (2006). *Cryptococcus neoformans*, arthritis in elderly adult: Case report and review. *Revista chilena de infectología*.
- Gonzales, A. y Valenzuela, L. (1998). *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México. Documento no publicado disponible en : <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>.
- Guerrero, C. (2012). *Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales y actividad Antioxidante en Fibra dietética extraída de cultivos ancestrales andinos para su utilización como suplemento alimenticio*. Tesis de Grado inédita previa a obtener el título de Ingeniero en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ecuador

- Hidalgo, J. (2003). *Tratado de Enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Hirtea, A. (2009). *Microscopie*. Documento no publicado obtenido de: <http://www.adelahirtea.home.ro/microbiologie.html>
- Instituto Nacional de Salud, (2007). *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*. Congreso de infectología Lima-Perú.
- Jaramillo M., Gutiérrez P., Cotés J., Gonzales P. y Marín M. (2011). *Detección de los Virus AMV, CMV, y PLRV en cultivos de Tomate de Árbol (Solanum Betaceum Cav.)*. Manuscrito publicado disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/26387/37119>.
- Jackson, D. y Lombard, P. (2008). *Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-a review*. ACE revista de enología, 1(1).
- Kyung, Claire. y Douglasque (2003). *Ethanol Tolerance in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content*. *Applied and Environmental Mycology*. vol. 69 no. 3 1499-1503. Manuscrito publicado disponible en línea: DOI doi: 10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003
- Laurent, D. y Palacios, A. (2001). *Levaduras seleccionadas para la vinicación en tinto. Estabilización del color de los vinos* Francia: Toulouse.
- Lavarello, P., Gutman, G. y Filipett, S. (2011). *Biotechnología en la Industria Vitivinícola en Argentina: ¿Nuevas Modalidades de Innovación en una Actividad Tradicional?*. *Journal of Technology Management & Innovation*, Pp. 188. Buenos aires.
- Libkind, D. y Van Broock, M. (2007). *Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de Rhodotorula mucilaginosa provenientes de la Patagonia noroccidental*. *Revista argentina de microbiología* vol.39.

- LIFE. (2014). *Fungal Infection- Rhodotorula mucilaginosa*, Leading internacional fungal education. Documento no publicado obtenido de: <http://www.lifeworldwide.org/fungal-diseases/rhodotorula-mucilaginosa/>.
- Linares, M. y Solis, F. (2007). *Identificación de Levaduras*. Revista Iberoamericana de Micología, volumen 1.
- Lodder, J. (1970). *The Yeasts A Taxonomic Study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam. London
- López, L., Hernández. M., Colín, C., Otrera, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014) *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Revista científica de Investigación en discapacidad vol.3.
- Lucas, K., Maggi, J., Yagual, M. (2010). *Creación de una empresa de Producción, comercialización y exportación de tomate de árbol en el área de Sangolquí, provincia de Pichincha*. Tesis previa a obtener el título de Ingeniero Comercial, Escuela Politécnica del Litoral. Facultad de Ciencias Sociales y Humanísticas, Guayaquil-Ecuador.
- Lucio, O., Polo, L., Pardo, I. y Ferrer, S. (2009). *Aislamiento e identificación de levaduras vínicas en viñedos Ecológicos*. Congreso Nacional de Investigación Enológica Durens, X (1).
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson Educación. Madrid
- Medina, C., Sánchez, M., Villar, V., Carrillo, M. y Carrillo P. (1999). Algunas consideraciones sobre la tolerancia alcohólica en levaduras. *Revista avanzada científica: IDICT*, 9
- Mena, S., Bernal, S., Rodríguez, J., Aguilera, A., Reis, T., Carrillo, M., Romero, B. (2007). *Empleo de cultivos de levaduras de Saccharomyces cerevisiae en raciones para corderos en crecimiento y engorda*. Documento no publicado disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/41_6UAQMenaSantiago.pdf. México

- Menocal, J, Ávila, E, López, C, García, A y García F. (2005). *Efecto de paredes celulares (Saccharomyces cerevisiae) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, vol. 43, núm. 2, mayo-agosto, 2005.
- MICROSISTEMAS. (2008). *Tipos de vinos*. Escuela de estudios de empresa microsistemas.
- Morales, R y Romero M. (2009). *Estudio fitoquímico preliminar del fruto de la especie vegetal cyphomandra betacea (tomate de palo) e identificación de alcaloides esteroideos*. Tesis previa a obtener el título de Licenciadas en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador-El Salvador
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, MC. (2005). *Winemarking Bichemestry and Microbiology*. Current Knowledge and Future Trends. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Madrid:
- Morris , E. y Eddy, A. (1957). *Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast*. Journal of the Institute of Brewing, 63(1).
- Navazcuéz, E. (2009). *Brettanomyces dekkera*, Revista Enología, Vol.1. Pp 5
- Norris, J. y D.W. Ribbons. (1976). *Methods in Microbiology*. Vol. 9, Academic Press, New York, .
- Nuria, B. (2009). *Competencia entre levaduras espontáneas y comerciales en vinificación: estudio de posibles factores implicados*. Tesis de Doctorado publicada. Universidad de Castilla la Mancha, España.
- Oficina Internacional de la Viña y del Viñedo . (2007). *Vitinícola (Mosto, Pasas de uva y Vino)*. París - Francia: OIV.
- Orberán, T. (2004). *Métodos moleculares de identificación de Levaduras de interés Biotecnológico*. Revista Iberoamericana de Micología, 21(1)

- Organización Panamericana de la Salud. (2002). Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington: División de desarrollo de sistemas y servicios de salud.
- Ortiz, E., Miranda, C., Aldrete, T., Arvízu, M., Hernández, I., Pacheco, A. y Martínez, P. (2014), *Selección de levaduras Saccharomyces spp nativas de viñedos querétanos con base en su inocuidad y potencial enológico*. Universidad Autónoma de Querétaro División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química,. México.
- Owen P. Ward (1991). *Principios, procesos y productos*. Biotecnología de la fermentación. Universidad de Waterloo, Canadá. Editorial Acribia. Zaragoza. España
- Palacios, A., Sibylle, K., Suárez, C., y Heras , J. (2006). *Fermentación malolácticamás allá de la conversión de málico en láctico*. Viticultura enología profesional.
- Pares, R., y Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Fermentaciones microbianas. Barcelona-España: Reverté S.A.
- Pérez, H. (2007). *Beneficio de las levaduras vivas en la obtención de productos con actividad probiótica*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar-Cuba, XLI(3).
- Perdomo, M., Vargas, R y Campos, J. (2004). *Valor nutritivo de la levadura de cervecería (Saccharomyces cerevisiae) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar*. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Cabudare Estado Lara, Venezuela
- Petrenko, O. (2005). *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo*. Universidad de Belgrano, Facultad de Exactas y Naturales, Buenos Aires- Argentina
- Piña, C. (2014). *Microbiología de Los Alimentos*. Universidad nacional abierta y a distancia, Escuela de Ciencias Básicas.

- Portilla, A. (2013). *Comportamiento agronómico y adaptabilidad de híbridos F1 de tomate de árbol Cyphomandra betacea (cav.) sendth en la región alto Andina de Nariño, Colombia*. Tesis previa a la obtención del título de Master en ciencias Agrarias con Énfasis en Fitomejoramiento. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. Colombia
- Prieto, V., Trevizo, M., Gardea, A., Figueroa, C., Chacón, A., Blanco, A. y Curry, A. (2004). *Identificación de Levaduras Epifitas Obtenidas de Manzana [Malus sylvestris (L.) Mill. var. Domestica (Borkh.) Mansf.] Para Control Biológico Poscosecha*, Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 22, núm. 2, Sociedad Mexicana de Fitopatología, México
- Pro-Chile. (2011). *Estudios de mercado de vino en Ecuador*. Mnsucrito no publicado disponible en: http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files_mf/documento_06_21_11131314.pdf
- Quinaluisa, E. (2006). *Caracterización morfológica y molecular de la colección de Tomate de árbol (Solanum Betaceum cav. Sent) del Banco nacional de germoplasma de la estacion experimental Santa Catalina- INIAP*. Tesis de grado previa a obtener el título de: Ingeniero Agronomo. Universidad Técnica de Cotopaxi. Facultad de Ciencias Agropecuarias Ambientales y Veterinarias. Quito- Ecuador
- Ramirez, G. y Pedroza, J. (2001). *Desarrollo de la fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema conjunto*. Tesis previa a obtener el título de: Ingeniero en producción industrial. Universidad de la Sabana. Facultad de ingeniería en Producción agroindustrial. Bogotá- Colombia.
- Regodon, J. (2000). *Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. Tesis previa a la obtención del título de Biólogo, Universidad de Extremadura. Departamento de Biología y Producción de los Vegetales. Mérida-España.
- Revelo, J., Pérez, E. y Maila, M. (2009) *El cultivo de tomate de árbol*. Texto de consulta del estudiante. Quito: INIAP

- Riofrio, L., Arias, S., Arahana, V., y Torres, M. (2009). *Regeneración de plantas de Tomate de Árbol a partir de Protoplasto*. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad San Francisco de Quito. Manuscrito publicado disponible en: http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documentos/volumen_1/Avances_2009_vol1_75-78.pdf.
- Roberts, G., Horstmeier, G., y Foxworth, J. (1978). *Yeasts*. Journal of Clinical Microbiology. 7.
- Rodríguez, L. (2004). *Mejora de Bodega en Valdefuentes*. Ingeniería de los procesos Universidad de Castilla-La Mancha.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J., y Van Broock, M. (2006). *Levaduras del Río Agrio y el lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico* (Neuquén, Argentina). Sociedad Biológica de Argentina.
- Sabino, B., Marquez, J. y Campos, J. (2011). *Segmentación de Células de la Levadura Saccharomyces cerevisiae*. Temas de Ciencia y Tecnología, Vol 15, Num. 45.
- Salcedo, M. (2004). *Aislamiento y selección de levaduras fermentadoras de Melaza de Caña de azúcar (Saccharum officinarum)*. Tesis previa a la obtención del título de Biólogo. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Facultad de Biología. Morelia Michoacán
- Souza, O., Rosa, M., Morgano, A., y Serra, G. (2004). *Fermentation characteristic as criteria for selection of Cachaca yeast*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(1) 1141-114.
- Suarez, J. e Iñigo, B. (1992). *“Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación”*. Revista enológica. Madrid. Editorial: Paraninfo S.A
- Subden, R. (2014). *Candida Krusei*. Viticulture & Enology, Department of Resources, BFTV Cluster. *Candida krusei*.

- Tangarife, V. (2011a). *Candida spp.* Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Documento no publicado obtenido de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100773>.
- Tangarife, V. (2011b). *Cryptococcus spp.* Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Documento no publicado obtenido de: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/743/fotos_oportunistas/CRY_-_C_001.jpg
- The Yeast. (2003). *Saccharomyces cerevisiae*. BiologyPages. Documento no publicado disponible en: <http://pvtridvs.net/pool/users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/Y/Yeast.html>.
- Thermo Scientific. (2014). *Thermo Scientific*. Manual de Usuario de Remel RapID Yeast Plus System, Manuscrito no publicado disponible en: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Instructions%20For%20Use/Identification%20&%20Susceptibility%20Tests/IFU8311007.pdf>
- Universidad Autónoma de Madrid. (2007) *La fracción nitrogenada del vino*. Facultad de ciencias departamento de química-física aplicada. Instituto de fermentaciones industriales. Madrid,
- Universidad Nacional de Cuyo. UNC. (2009). *Fermentación Alcohólica*. Informe Enológico del departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentaria.. Cuyo- Argentina.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización Fisiológica de levaduras aisladas de la Filósfera de la mora*. Tesis previa a obtener el grado de Microbiologo Industrial. Universidad Politécnica Javeriana, Facultad de ciencias, Bogotá- Colombia.
- Universidad de California (2014). *Candida krusei*, Documento no publicado obtenido en:http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/candida_krusei.html, California.
- Universidad Técnica de Ambato. (2007). *Los vinos de frutas*. “Elaboración de Vinos de frutas”. Ambato, Tungurahua, Ecuador .

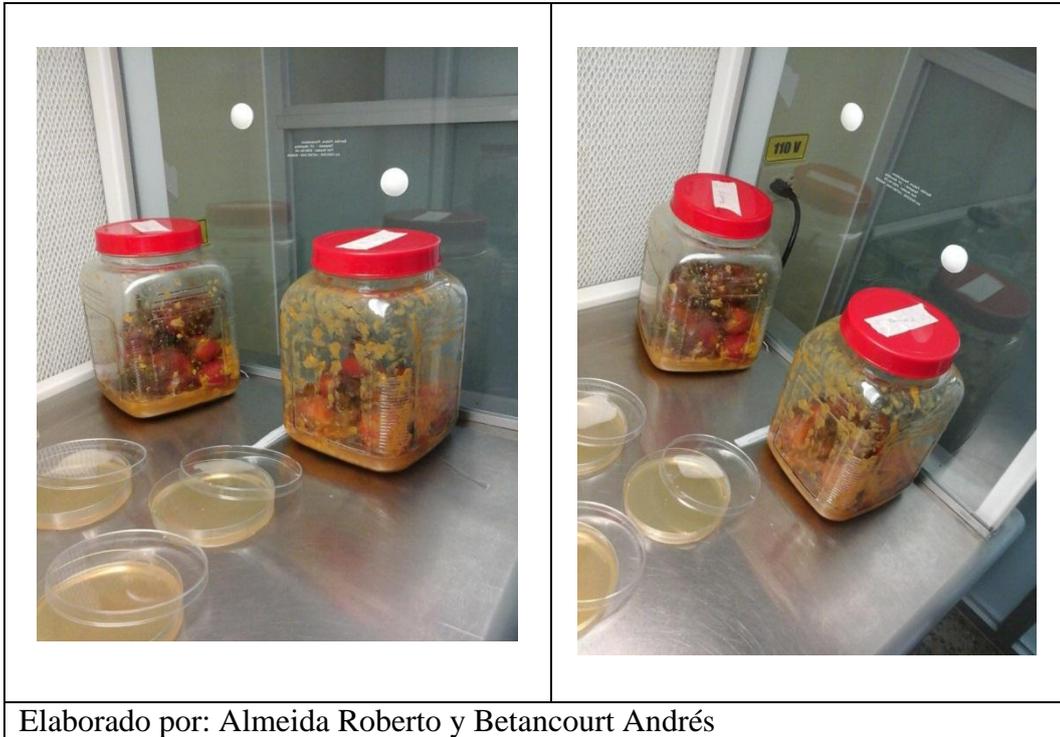
- Villacrés, G., Martínez, G., y Pozo, C. (2006). *Aislamiento, selección y adaptación de cultivos iniciadores locales (Saccharomyces), para la producción de vino blanco*. Informe de Microbiología de Alimentos. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Quito- Ecuador.
- Watson Rachel (2012). *Classification of fungi*, Virtual Edge: Laboratory 13 microorganisms, Documento no publicado disponible en: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/classification.htm
- Win, A., Janda, Koneman., Procop, Schreckenberger. y Woods. (2008). *Diagnostico microbiológico*, Texto y atlas en color. 6 ed. Buenos Aires.
- Yamada, Y. y Kondo, K. (1972) *Taxonomic significacne of coenzyme Q System in yeast, and yeast like fungi*. Yeast as Microorganism in Medical Science. Pp 63-69. University of Tokio press. Tokio..
- Yamamoto, C., y Orsanai, S. (2002). Saccharomyces-induced hyper sensitivity pneumonitis in a dairy farmer: a case report.
- Yegres, F., y Zeppenfeldt, F. (2003). *Saccharomyces cerevisiae*. La fabricación del licor cocuy. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol.5.
- Zumarraga, M. Y Barbero, F. (2009). *Zygosaccharomyces, una levadura discreta pero peligrosa en bodega*. Revista Enología. Documento no publicado disponible en : http://www.guserbiot.com/pdf/Guserbiot_Enologia_Zygossacharomyces.pdf

Anexo 2: Muestreo del fruto de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

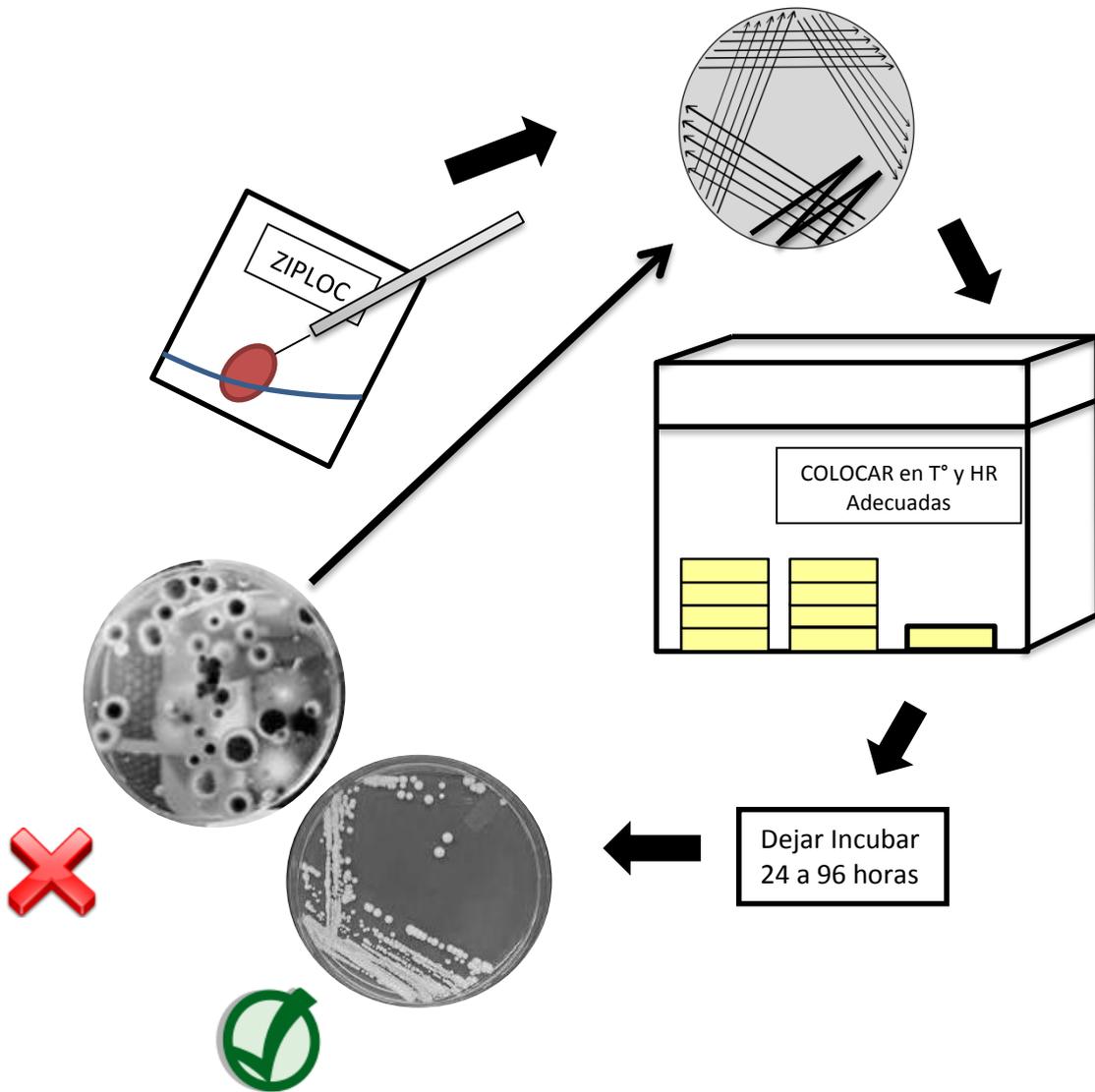


Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

Anexo 3: fermentación de 72 horas de muestras Tomate de árbol



Anexo 4. Aislamiento de levaduras a partir de muestras del fruto maduro de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

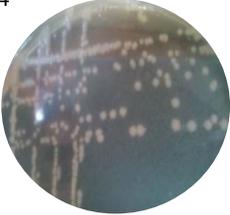


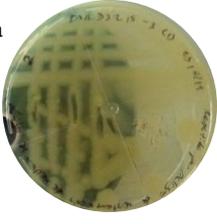
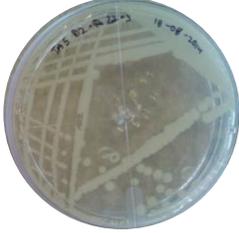
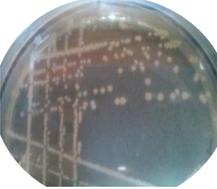
Anexo 5: Tabla de muestreo de fruto de tomate de árbol.

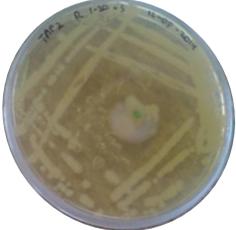
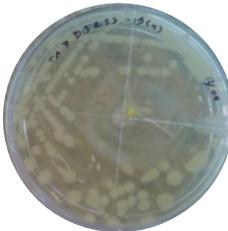
Tabla##: Muestreo de fruto de tomate de árbol						
Muestra de tomate de árbol en medio líquido			Crecimiento de levadura en agar YPD			
			Control	24H	48H	72H
Muestras Sector Oyacachi	1			-	+	+
	2			+	+	+
	3			+	+	+
	4			+	+	+
Muestras Sector Yaruquí	5			+	+	+
	6			+	+	+

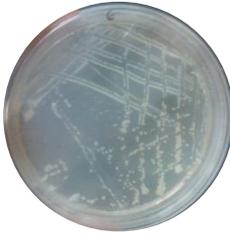
	7		+	+	+
	8		-	+	+
Muestra Sector Urbina	9		+	+	+
	10		-	+	+
	11		-	+	+
	12		-	+	+
<p>+: Crecimiento microbiano en placa Petri - : Ausencia de crecimiento microbiano en placa Petri</p>					
<p>Elaborado por : Almeida y Betancourt 2014</p>					

Anexo 6 : Descripción macroscópica de las 36 cepas de levaduras encontradas en el fruto de *Solanum betaceum*

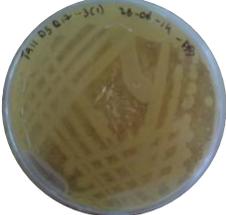
Descripción de la colonia celular		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma Circular - Diámetro: 1-2 mm - Borde: Entero. 	<p>Código: TA1 FE4 R2 – 17-4</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma : Circular - Diámetro: 3-7 mm - Borde: Ligeramente Ondulado 	<p>Código: TA3 D12 R21-2-5</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma : Circular - Diámetro: 4 mm - Borde: Ondulado 	<p>Código: TA7 D14 R7 -4-5</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 3-5 mm - Borde: Irregular 	<p>Código: TA1 FE4 R1-2-5</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Rosado intenso - Forma de colonia: Circular - Diámetro: 2-3 mm - Borde: Irregular/Ondulado 	<p>Código: TA2 F3 R3-3</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Crema - Forma: Circular - Diámetro: 2 a 7 mm - Borde: Irregular 	<p>Código: TA5 D2-2</p>	

<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco-Crema - Forma: Circular - Diámetro: 2-4 mm - Borde: Irregular 	<p>Código: TA1 FE4 R1 -4</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Incoloro/ligeramente amarilla - Forma: Sin forma definida - Diametro: No se puede medir - Borde: Sin borde definido - Nota: No forma colonias definidas, estructura mucosa sin forma 	<p>Código: TA11 D3 R18-3-1</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 5-7 mm - Borde: Entero. 	<p>Código: TA5 D2 R22-3</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Crema - Forma: Circular - Diámetro: 1-2 mm - Borde: Entero. 	<p>Código: TA7 D14 R6-9-3</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Crema - Forma de colonia: Circular - Diametro: 4-8 mm - Borde: Irregular 	<p>Código: TA7 D14 R7 -5-5</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diametro: 3-5 mm - Borde: Ligeramente Ondulado 	<p>Código: TA3 D11 R4 -4-2</p> 

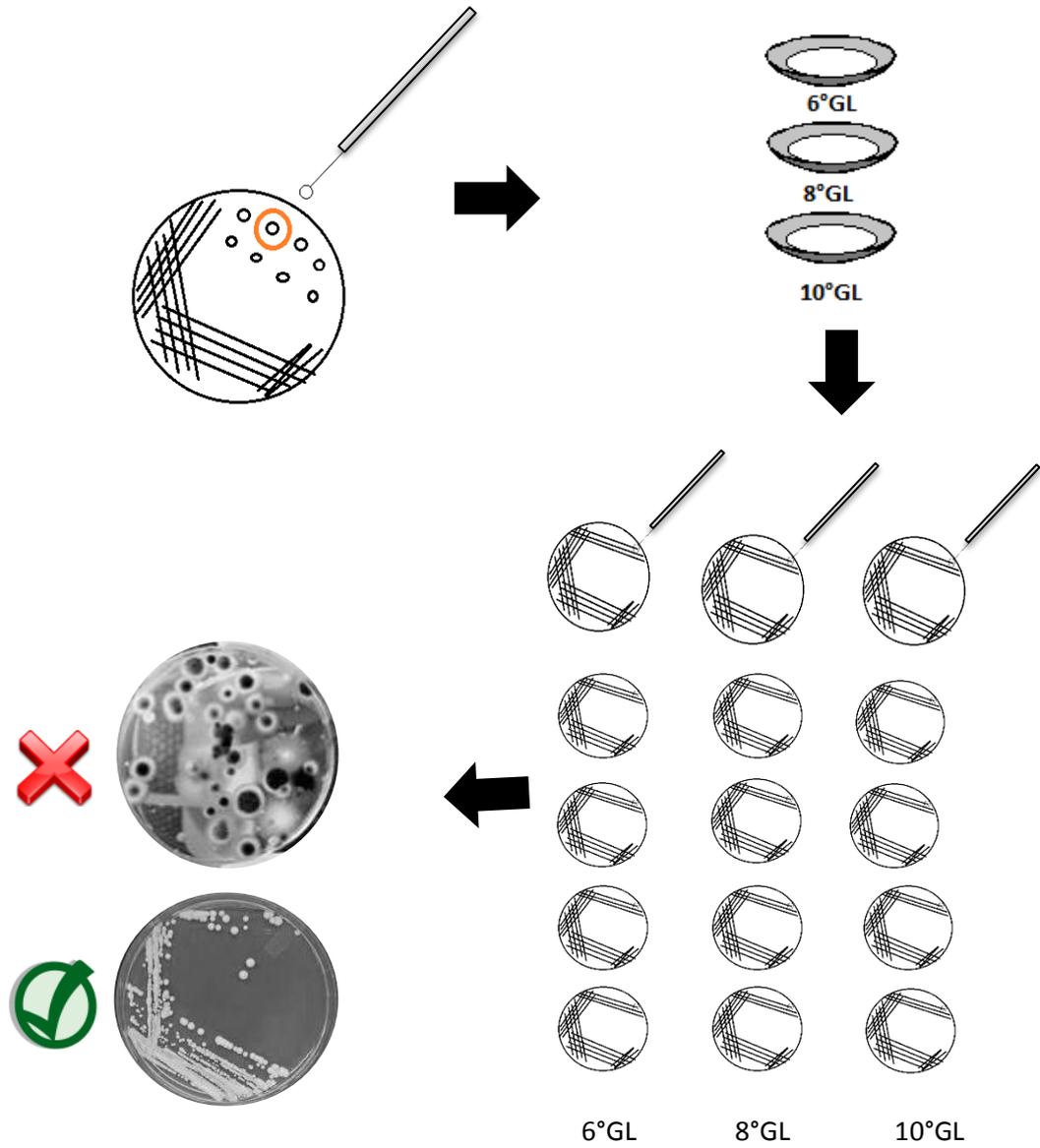
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 2 -7 mm - Borde: Ondulado 	<p>Código: TA7 D14 R6-9-3</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diametro: 1-3 mm - Borde: Entero - Nota: Colonia bien asiladas no se muestran agrupaciones 	<p>Código: TA1 F5 R4 -13</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 2-4 mm - Borde: Ondulado 	<p>Código: TA3 D12 R21 -1 -5</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 3-5 mm - Borde: Entero 	<p>Código: TA F2 R1 -20-5</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco, - Forma: Circular - Diametro: 4-6mm - Borde: Entero 	<p>Código: TA7 D13 R23 -19-4</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Rosado intenso - Forma: Circular - Diametro: 3mm aprox. - Borde: Ligeramente Ondulado 	<p>Código: TA3 D17 -2-3</p> 
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco/Crema - Forma: Circular - Diámetro: 3 - 8 mm - Borde: Entero/ ligeramente ondulado 	<p>Código: TA7 D14 R8-3</p> 

Código: TA1 F4 R2-17-4		
- Color:	Blanco,	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	2-4 mm	
- Borde:	Irregular	
Código: TA6 D1 R7 -6-3		
- Color:	Blanco	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	1-2 mm	
- Borde:	Entero	
Código: TA3 D17 -2 -1		
- Color:	Incoloro	
- Forma:	Sin forma	
- Borde:	Sin borde definido	
- Nota:	No forma colonias definidas estructura mucosa sin forma	
Código: TA11 D5 R17-3-3		
- Color:	Crema	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	1- 8 mm	
- Borde:	Irregular	
- Nota:	Colonias aisladas con aspecto pastoso	
Código: TA1 F5 R3 -14-5		
- Color:	Incolora	
- Forma:	Sin forma	
- Borde:	Sin borde definido	
- Nota:	No forma colonias definidas, estructura mucosa sin forma	
Código: TA3 D17 -2-3		
- Color:	Rosado intenso	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	3 - 4 mm	
- Borde:	Semi- Ondulado	

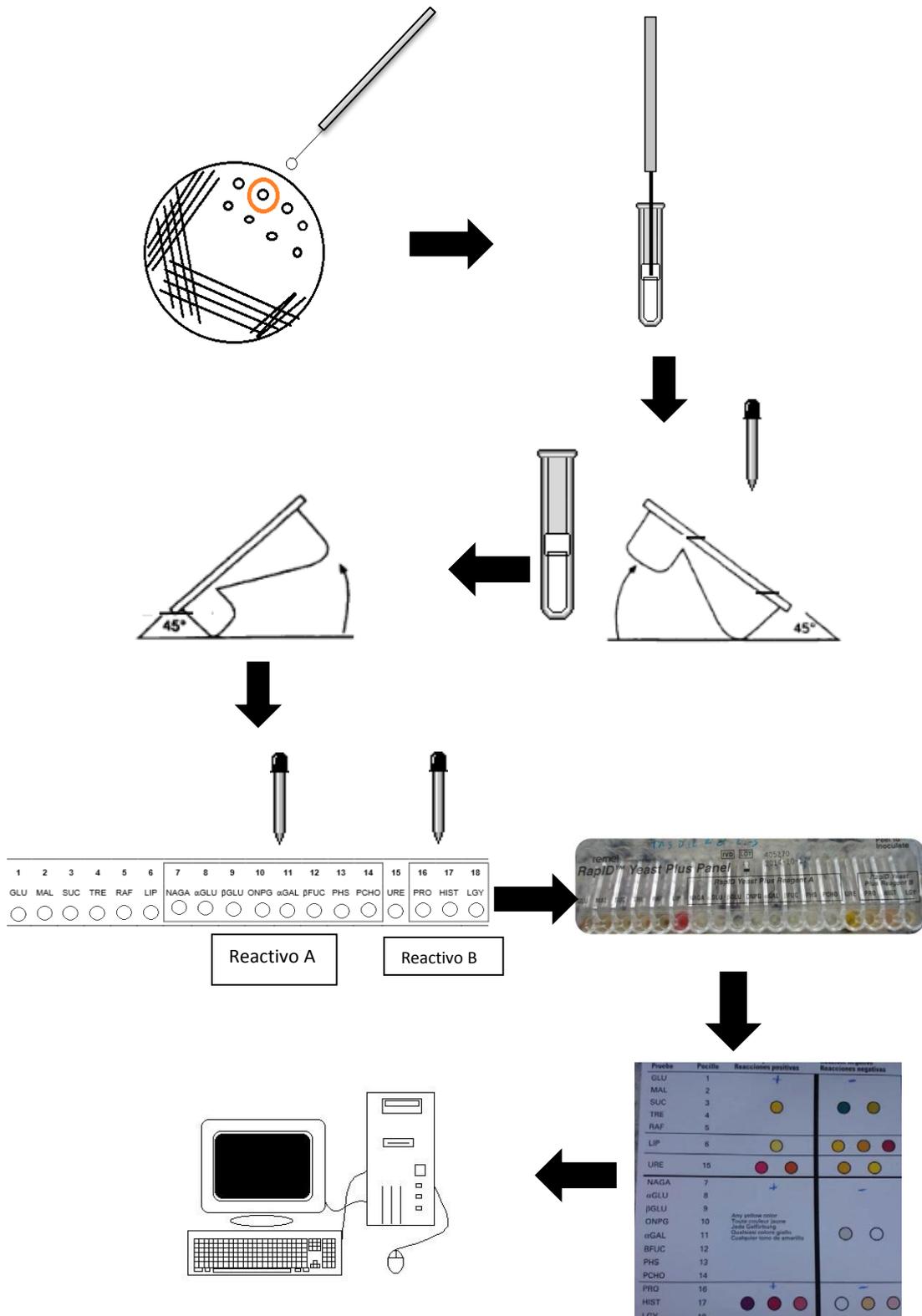
Código: TA6 D1 R7 -6-3		
- Color:	Blanco	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	3 a 4 mm	
- Borde:	Irregular	
Código: TA1 F6 R2-3 (1Y2)		
- Color:	Blanco	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	4-6 mm	
- Borde:	Ligeramente Irregular	
Código: TA3 D12 R21-2-5		
- Color:	Blanco	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	3-6 mm	
- Borde:	Entero	
Código: TA11 D5 R17-3-2		
- Color:	Crema	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	4-6 mm	
- Borde:	Entero	
Código: TA2 F3 R11 -3-3		
- Color:	Incolora	
- Forma:	Sin forma	
- Borde:	Sin borde definido	
- Nota:	No forma colonias definidas estructura mucosa sin forma	
Código: TA2 F3 R11-3-1		
- Color:	Rosado intenso	
- Forma:	Circular	
- Diámetro:	2 -3mm	
- Borde:	Ondulado	

Código: TA2 F3 R11 -3-4		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Blanco - Forma: Circular - Diámetro: 3-6 mm - Borde: Irregular - Nota: Presenta formación de estructuras semejantes a pilosidades en la superficie de la colonia 		
Código: TA3 D17 -2 -2		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Café-crema - Forma: Circular - Diámetro: 3 - 5 mm - Borde: Entero 		
Código: TA2 F3 R11-3-2		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Café-crema - Forma : Circular - Diámetro: 2 - 3 mm - Borde: Entero 		
Código: TA11 D5 R17-3-1		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Incolora - Forma: Sin forma - Borde: Sin borde definido - Nota: No forma colonias definidas estructura mucosa sin forma 		
Código: TA2 F3 R11-3-1		
<ul style="list-style-type: none"> - Color: Incolora - Forma: Sin forma - Borde: Sin borde definido - Nota: No forma colonias definidas estructura mucosa sin forma 		
Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés		

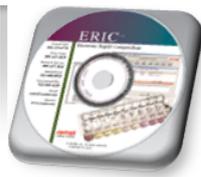
Anexo 7. Procedimiento de siembra de muestras microbianas provenientes del tomate de árbol en medio YPD+Etanol



Anexo 8. Procedimiento realización y lectura de pruebas Remmel Rap ID Yeast Plus System



Anexo 9: Fichas electrónicas de Identificación de Levadura en Software Eric®



[ERIC Web](#) > [Home](#) > [Rapid Systems](#) > [Identifications](#)

Rapid Identifications Entry

Welcome: **Roberto Almeida** > [Universidad Politecnica Salesiana \(LogOut\)](#)

Select a system and then enter the sample reference number (optional) and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

- ▣ **RAPID SYSTEMS**
- ▣ [Identifications](#)
- ▣ [Batch Identifications](#)
- ▣ [System Database](#)
- ▣ [Organism Abbr.](#)
- ▣ [Archived Test Results](#)
- ▣ [Profile Management](#)
- ▣ [Help](#)

Rapid System	Reference #	Microcode
Yeast Plus		734002

Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived

<input checked="" type="checkbox"/> GLU 98%	<input checked="" type="checkbox"/> TRE 00%	<input type="checkbox"/> NAGA 00%	<input type="checkbox"/> ONPG 05%	<input type="checkbox"/> PHS 03%	<input type="checkbox"/> PRO 00%
<input checked="" type="checkbox"/> MAL 24%	<input checked="" type="checkbox"/> RAF 92%	<input checked="" type="checkbox"/> αGLU 85%	<input type="checkbox"/> αGAL 09%	<input type="checkbox"/> PCHO 01%	<input checked="" type="checkbox"/> HIST 66%
<input checked="" type="checkbox"/> SUC 96%	<input type="checkbox"/> LIP 02%	<input checked="" type="checkbox"/> βGLU 82%	<input type="checkbox"/> βFUC 01%	<input type="checkbox"/> URE 01%	<input type="checkbox"/> LGY 44%

[CREATE REPORT >>](#)

QUESTIONABLE MICROCODE - Unreliable Probabilities

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Test Results
1 Sac. cerevisiae	> 99.9%	1 / 15025	MAL [24] TRE [1] αGLU[85]

Probability Level: **QUESTIONABLE!** Biofrequency: **VERY RARE**

QUESTIONABLE LEVEL... REISOLATION AND REPEAT TESTING RECOMMENDED !!

Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!

Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!

Accessory Test

[Show All Accessory Tests](#)

No accessory tests

Informe Proporcional de Software Eric:

ERIC Web		Identification Report	
Rapid Yeast Plus		Run Date: 12/7/2014	
Microcode: 734002		Facility: Universidad Politecnica Salesiana	
		Reference No:	
<i>System Tests</i>	+GLU 98%+TRE 00%-NAGA 00%-ONPG 05%-PHS 03%-PRO 00%		
	+MAL 24%+RAF 92%-αGLU 85%-αGAL 09%-PCHO 01%+HIST 66%		
	+SUC 96%-LIP 02%+βGLU 82%-βFUC 01%-URE 01%-LGY 44%		
QUESTIONABLE MICROCODE - Unreliable Probabilities			
Choice	Probability	Bioscore	Contraindications
Sac. cerevisiae	> 99.9%	1/15025	MAL [24] TRE [1] αGLU[85]
Probability Level: QUESTIONABLE!			
Biofrequency: VERY RARE			
QUESTIONABLE LEVEL... REISOLATION AND REPEAT TESTING RECOMMENDED !!			
Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!			
Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!			

Ficha electrónica de Identificación de Levadura (TA3 D12 R21-2-5) *Saccharomyces cerevisiae* en Software Eric®



ERIC Web > Home > RapID Systems > Identifications

RapID Identifications Entry

Welcome: Roberto Almeida > Universidad Politecnica Salesiana (LogOut)

Select a system and then enter the sample reference number (optional) and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

RapID System **Reference #** **Microcode**

Yeast Plus [v] 734002 6 digits **SUBMIT REQUEST >>** **RESET**

Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived

<input checked="" type="checkbox"/> GLU 98%	<input checked="" type="checkbox"/> TRE 00%	<input checked="" type="checkbox"/> NAGA 00%	<input checked="" type="checkbox"/> ONPG 05%	<input checked="" type="checkbox"/> PHS 03%	<input checked="" type="checkbox"/> PRO 00%
<input checked="" type="checkbox"/> MAL 24%	<input checked="" type="checkbox"/> RAF 92%	<input checked="" type="checkbox"/> αGLU 85%	<input checked="" type="checkbox"/> αGAL 09%	<input checked="" type="checkbox"/> PCHO 01%	<input checked="" type="checkbox"/> HIST 66%
<input checked="" type="checkbox"/> SUC 96%	<input checked="" type="checkbox"/> LIP 02%	<input checked="" type="checkbox"/> βGLU 82%	<input checked="" type="checkbox"/> βFUC 01%	<input checked="" type="checkbox"/> URE 01%	<input checked="" type="checkbox"/> LGY 44%

QUESTIONABLE MICROCODE - Unreliable Probabilities **CREATE REPORT >>**

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Test Results
1 Sac. cerevisiae	> 99.9%	1 / 15025	MAL [24] TRE [1] αGLU[85]

Probability Level: **QUESTIONABLE!** Biofrequency: **VERY RARE**

QUESTIONABLE LEVEL... REISOLATION AND REPEAT TESTING RECOMMENDED !!

Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!

Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!

Accessory Test **Show All Accessory Tests**

No accessory tests

Informe Proporcional de Software Eric:

ERIC Web		Identification Report	
RapID Yeast Plus		Run Date: 12/7/2014	
Microcode: 734002		Facility: Universidad Politecnica Salesiana	
		Reference No:	
System Tests	+GLU 98% +TRE 00% -NAGA 00% -ONPG 05% -PHS 03% -PRO 00%		
	+MAL 24% +RAF 92% -αGLU 85% -αGAL 09% -PCHO 01% +HIST 66%		
	+SUC 96% -LIP 02% +βGLU 82% -βFUC 01% -URE 01% -LGY 44%		
QUESTIONABLE MICROCODE - Unreliable Probabilities			
Choice	Probability	Bioscore	Contraindications
Sac. cerevisiae	> 99.9%	1/15025	MAL [24] TRE [1] αGLU[85]
Probability Level: QUESTIONABLE!			
Biofrequency: VERY RARE			
QUESTIONABLE LEVEL... REISOLATION AND REPEAT TESTING RECOMMENDED !!			
Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!			
Frequency value for the 1st Choice is not within acceptable limits for reliable identification.. recheck coding test interpretation Gram stain morphology purity and test procedures carefully. Reisolation and repeat testing recommended !!			

Ficha electrónica de Identificación de Levadura (TA11 D5 R17-3-1) *Cryptococcus neoformans var. uniguttulatus* en Software Eric®.



ERIC Web > Home > Rapid Systems > Identifications

Rapid Identifications Entry

Welcome: Roberto Almeida > Universidad Politecnica Salesiana (LogOut)

Select a system and then enter the sample reference number (OPTIONAL) and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

RAPID SYSTEMS

- Identifications
- Batch Identifications
- System Database
- Organism Abbr.
- Archived Test Results
- Profile Management
- Help

Rapid System	Reference #	Microcode
Yeast Plus		004045

Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived

<input type="checkbox"/> GLU 02%	<input type="checkbox"/> TRE 02%	<input type="checkbox"/> NAGA 01%	<input type="checkbox"/> ONPG 02%	<input type="checkbox"/> PHS 23%	<input type="checkbox"/> PRO 95%
<input type="checkbox"/> MAL 02%	<input type="checkbox"/> RAF 00%	<input type="checkbox"/> αGLU 01%	<input type="checkbox"/> αGAL 08%	<input type="checkbox"/> PCHO 19%	<input type="checkbox"/> HIST 25%
<input type="checkbox"/> SUC 02%	<input type="checkbox"/> LIP 02%	<input type="checkbox"/> βGLU 96%	<input type="checkbox"/> βFUC 13%	<input type="checkbox"/> URE 99%	<input type="checkbox"/> LGY 39%

[CREATE REPORT >>](#)

IDENTIFICATION = *Cr. uniguttulatus*

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Test Results
Cr. uniguttulatus	> 99.9%	1 / 9	None

Probability Level: **Implicit** Biofrequency: **Typical**

Synonymous with *Cryptococcus neoformans var uniguttulatus*. Rarely isolated from clinical specimens, however, may cause infection in immunocompromised patients.

Accessory Test [Show All Accessory Tests](#)
No accessory tests

Informe Proporcional de Software Eric:

ERIC Web		Identification Report	
RapID Yeast Plus		Run Date: 12/7/2014	
Microcode: 004045		Facility: Universidad Politecnica Salesiana	
		Reference No:	
System Tests	-GLU 02% -TRE 02% -NAGA 01% -ONPG 02% -PHS 23% +PRO 95%		
	-MAL 02% -RAF 00% -αGLU 01% -αGAL 08% -PCHO 19% -HIST 25%		
	-SUC 02% -LIP 02% +βGLU 96% -βFUC 13% +URE 99% +LGY 39%		
IDENTIFICATION = Cr. uniguttulatus			
Choice	Probability	Bioscore	Contraindications
Cr. uniguttulatus	> 99.9%	1/9	None
	Probability Level: Implicit		
	Biofrequency: Typical		
Synonymous with <i>Cryptococcus neoformans var uniguttulatus</i> . Rarely isolated from clinical specimens, however, may cause infection in immunocompromised patients.			

Ficha electrónica de Identificación de Levadura (TA3 D17 -2-3) *Rhodotorula rubra* x *Rhodotorula mucilaginosa* en Software Eric®



ERIC Web > Home > Rapid Systems > Identifications

Rapid Identifications Entry

Welcome: Roberto Almeida > Universidad Politecnica Salesiana (LogOut)

Select a system and then enter the sample reference number **OPTIONAL** and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

- RAPID SYSTEMS
- Identifications
- Batch Identifications
- System Database
- Organism Abbr.
- Archived Test Results
- Profile Management
- Help

Rapid System	Reference #	Microcode
Yeast Plus		100045
Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived		
<input type="checkbox"/> GLU 09%	<input type="checkbox"/> TRE 03%	<input type="checkbox"/> NAGA 00%
<input type="checkbox"/> MAL 06%	<input type="checkbox"/> RAF 02%	<input type="checkbox"/> αGLU 64%
<input type="checkbox"/> SUC 05%	<input type="checkbox"/> LIP 46%	<input type="checkbox"/> βGLU 02%
<input type="checkbox"/> ONPG 00%	<input type="checkbox"/> PHS 28%	<input type="checkbox"/> PRO 99%
<input type="checkbox"/> αGAL 00%	<input type="checkbox"/> PCHO 26%	<input type="checkbox"/> HIST 71%
<input type="checkbox"/> βFUC 00%	<input type="checkbox"/> URE 97%	<input type="checkbox"/> LGY 62%

IDENTIFICATION = Rhod. ru

Choice(s)

- Rhod. rubra**

Probability Level: Adequate

Accessory Test

No accessory tests

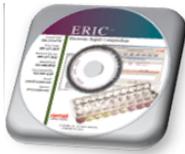
Rhod. = Rhodotorula

Synonymous with *Rhodotorula pilimanae*. Normal inhabitant of moist skin. Can be recovered from environmental sources. Reported to cause septicemia meningitis and central nervous system infection. Produces a red or pink pigment.

Informe Proporcional de Software Eric:

ERIC Web		Identification Report	
Rapid Yeast Plus		Run Date: 12/7/2014	
Microcode: 100043		Facility: Universidad Politecnica Salesiana	
		Reference No:	
System Tests	+GLU 09% -TRE 03% -NAGA 00% -ONPG 00% -PHS 28% +PRO 99%		
	-MAL 06% -RAF 02% -αGLU 64% -αGAL 00% -PCHO 26% +HIST 71%		
	-SUC 05% -LIP 46% -βGLU 02% -βFUC 00% +URE 97% -LGY 62%		
IDENTIFICATION = Rhod. rubra			
Choice	Probability	Bioscore	Contraindications
Rhod. rubra	> 99.9%	1/500	GLU [9]
Probability Level: Adequate			
Biofrequency: Acceptable			
Synonymous with <i>Rhodotorula pilimanae</i> . Normal inhabitant of moist skin. Can be recovered from environmental sources. Reported to cause septicemia meningitis and central nervous system infection. Produces a red or pink pigment.			

Ficha electrónica de Identificación de Levadura (TA6 D1 R7- 6-3) *Cryptococcus neoformans* en Software Eric®



ERIC Web > Home > RapID Systems > Identifications

RapID Identifications Entry

Welcome: **Roberto Almeida** > Universidad Politecnica Salesiana (LogOut)

Select a system and then enter the sample reference number (optional) and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

RAPID SYSTEMS

- Identifications
- Batch Identifications
- System Database
- Organism Abbr.
- Archived Test Results
- Profile Management
- Help

RapID System	Reference #	Microcode
Yeast Plus		100040

Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived

<input checked="" type="checkbox"/> GLU 68%	<input type="checkbox"/> TRE 05%	<input type="checkbox"/> NAGA 15%	<input type="checkbox"/> ONPG 00%	<input type="checkbox"/> PHS 11%	<input type="checkbox"/> PRO 01%
<input type="checkbox"/> MAL 16%	<input type="checkbox"/> RAF 11%	<input type="checkbox"/> αGLU 12%	<input type="checkbox"/> αGAL 00%	<input type="checkbox"/> PCHO 01%	<input type="checkbox"/> HIST 02%
<input type="checkbox"/> SUC 44%	<input type="checkbox"/> LIP 03%	<input type="checkbox"/> βGLU 36%	<input type="checkbox"/> βFUC 00%	<input checked="" type="checkbox"/> URE 98%	<input type="checkbox"/> LGY 02%

[CREATE REPORT >>](#)

IDENTIFICATION = Cr. neoformans

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Test Results
<input checked="" type="radio"/> Cr. neoformans	99.46%	1 / 10	None
<input type="radio"/> C. krusei	0.54%	1 / 79	URE [9]

Probability Level: **Implicit**

Biofrequency: **Typical**

Includes Cr. neo. var. neoformans and Cr. neo. var. gatti. Isolated from a variety of clinical specimens. Most often associated with central nervous system infections. Can cause lesions in skin bone lungs and other organs.

Accessory Test

No accessory tests

[Show All Accessory Tests](#)

Informe Proporcional de Software Eric:

ERIC Web		Identification Report	
RapID Yeast Plus		Run Date: 12/07/2014	
Microcode: 100040		Facility: Universidad Politecnica Salesiana	
		Reference No:	
System Tests	+GLU 68% -TRE 05% -NAGA 15% -ONPG 00% -PHS 11% -PRO 01% -MAL 16% -RAF 11% -αGLU 12% -αGAL 00% -PCHO 01% -HIST 02% -SUC 44% -LIP 03% -βGLU 36% -βFUC 00% +URE 98% -LGY 02%		
IDENTIFICATION = Cr. neoformans			
Choice	Probability	Bioscore	Contraindications
Cr. neoformans	99.46%	1/10	None
C. krusei	0.54%	1/79	URE [9]
Probability Level: Implicit			
Biofrequency: Typical			
Includes Cr. neo. var. neoformans and Cr. neo. var. gatti. Isolated from a variety of clinical specimens. Most often associated with central nervous system infections. Can cause lesions in skin bone lungs and other organs.			

Ficha electrónica de Identificación de Levadura (TA1 FE4 R1-2-5) *Candida krusei* en Software Eric®



- RAPID SYSTEMS
- Identifications
- Batch Identifications
- System Database
- Organism Abbr.
- Archived Test Results
- Profile Management
- Help

ERIC Web > Home > RapID Systems > Identifications

RapID Identifications Entry

Welcome: **Roberto Almeida** > Universidad Politecnica Salesiana (LogOut)

Select a system and then enter the sample reference number (OPTIONAL) and the microcode. Alternatively, you can click on each reaction to indicate a positive well. Once the microcode or reaction selections are completed, click "submit request". Clicking "reset" at any time will clear entered values.

Click the [+] or [-] to score the test and the microcode will be derived

<input type="checkbox"/> GLU 99%	<input type="checkbox"/> TRE 00%	<input type="checkbox"/> NAGA 00%	<input type="checkbox"/> ONPG 00%	<input type="checkbox"/> PHS 01%	<input type="checkbox"/> PRO 00%
<input type="checkbox"/> MAL 00%	<input type="checkbox"/> RAF 00%	<input type="checkbox"/> αGLU 00%	<input type="checkbox"/> αGAL 00%	<input type="checkbox"/> PCHO 00%	<input type="checkbox"/> HIST 69%
<input type="checkbox"/> SUC 00%	<input type="checkbox"/> LIP 01%	<input type="checkbox"/> βGLU 26%	<input type="checkbox"/> βFUC 00%	<input type="checkbox"/> URE 09%	<input type="checkbox"/> LGY 35%

PROBABILITY OVERLAP AMONG FIRST TWO CHOICES

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Test Results
<input type="radio"/> C. krusei	79.11%	1 / 148	URE [9]
<input type="radio"/> Cr. neoformans	20.89%	1 / 477	LGY [2]

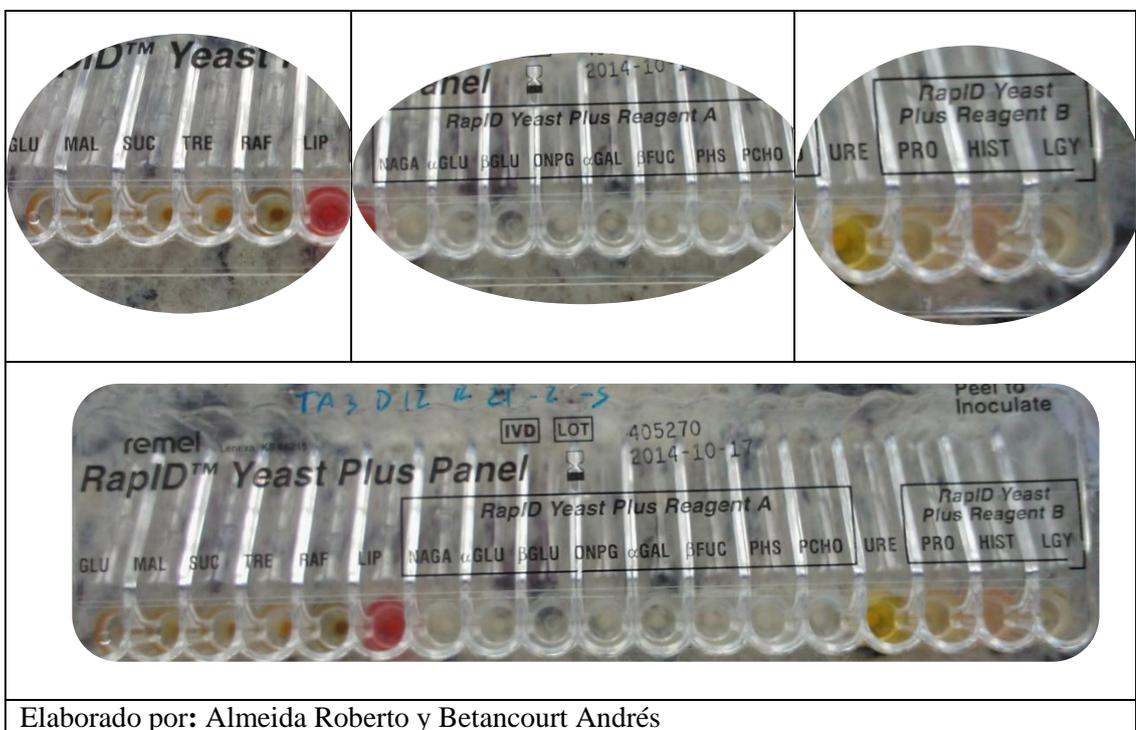
Probability Level: **Inadequate** Biofrequency: **Not Applicable**

Probability Overlap Between First Two Choices.
 Probability Overlap between first two identification choices. Refer to the Overlap Window or Accessory Test Chart for tests that will help resolve this overlap condition.

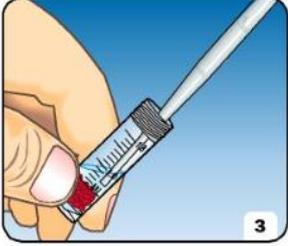
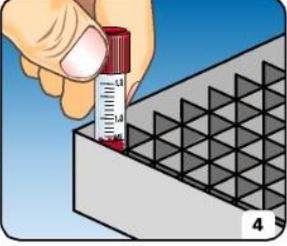
Informe Proporcional de Software Eric:

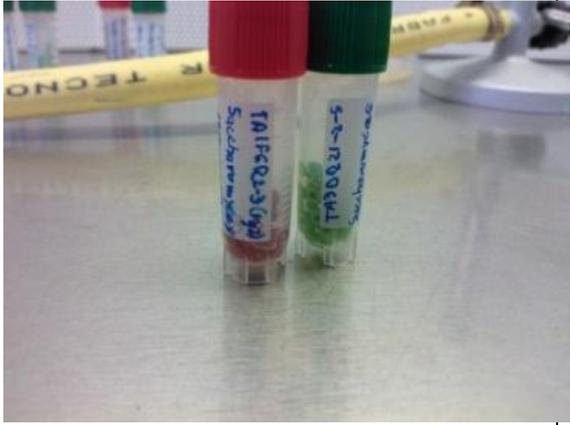
ERIC Web	Identification Report																		
RapID Yeast Plus	Run Date: 12/7/201 12/7/2014																		
Microcode: 100044	Facility: Universidad Politecnica Salesiana																		
	Reference No:																		
System Tests	<table style="font-family: monospace; font-size: 0.9em;"> <tr> <td>+GLU 99%</td><td>-TRE 00%</td><td>-NAGA 00%</td><td>-ONPG 00%</td><td>-PHS 01%</td><td>-PRO 00%</td> </tr> <tr> <td>-MAL 00%</td><td>-RAF 00%</td><td>-αGLU 00%</td><td>-αGAL 00%</td><td>-PCHO 00%</td><td>-HIST 69%</td> </tr> <tr> <td>-SUC 00%</td><td>-LIP 01%</td><td>-βGLU 26%</td><td>-βFUC 00%</td><td>+URE 09%</td><td>+LGY 35%</td> </tr> </table>	+GLU 99%	-TRE 00%	-NAGA 00%	-ONPG 00%	-PHS 01%	-PRO 00%	-MAL 00%	-RAF 00%	-αGLU 00%	-αGAL 00%	-PCHO 00%	-HIST 69%	-SUC 00%	-LIP 01%	-βGLU 26%	-βFUC 00%	+URE 09%	+LGY 35%
+GLU 99%	-TRE 00%	-NAGA 00%	-ONPG 00%	-PHS 01%	-PRO 00%														
-MAL 00%	-RAF 00%	-αGLU 00%	-αGAL 00%	-PCHO 00%	-HIST 69%														
-SUC 00%	-LIP 01%	-βGLU 26%	-βFUC 00%	+URE 09%	+LGY 35%														
PROBABILITY OVERLAP AMONG FIRST TWO CHOICES																			
Choice	Probability Bioscore Contraindications																		
C. krusei	79.11% 1/148 URE [9]																		
Cr. neoformans	20.89% 1/477 LGY [2]																		
	Probability Level: Inadequate Biofrequency: Not Applicable																		
Probability Overlap Between First Two Choices.																			
Probability Overlap between first two identification choices. Refer to the Overlap Window or Accessory Test Chart for tests that will help resolve this overlap condition.																			

Anexo 10: Reacción de identificación de *Saccharomyces cerevisiae* cepa TA1F6R2-3 (1y2)] y (TA3 D12 R21 -2 -5)



Anexo 11:

Procedimiento	
	De una placa que contenga un cultivo fresco (de no mas de 18 horas), retire una muestra concentrada y disuélvala en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK™.
	Agite hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, esto permitirá que las bacterias se adhieran a las perlas.
	Con una pipeta estéril remueva del tubo el medio de cultivo de CRYOBANK™.
	Inmediatamente después almacene el tubo de CRYOBANK™ a -70°C o en nitrógeno líquido.

Resultados	
	

Elaborado por: Almeida Roberto y Betancourt Andrés

GLOSARIO

- **Ácidos grasos saturados:** Son ácidos carboxílicos de cadena larga con uno o varios dobles enlaces entre los átomos de carbono.
- **Antocianos:** Son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos
- **Anticuerpo monoclonal:** Son versiones sintéticas de las proteínas del sistema inmune (anticuerpos) que están diseñados para atacar un objetivo específico, como por ejemplo células cancerosas
- **Ascospora:** Es una espora (meiospora) contenida en un asca. Esta clase de espora es específica de los hongos clasificados como ascomycetes (Ascomycota).
- **Cepa:** En microbiología es una variante fenotípica de una especie de microorganismo.
- **Cicloheximida:** Es un Inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas.
- **Coenzimas:** Son pequeñas moléculas orgánicas no proteicas, necesarias para la actividad de las enzimas. Su principal función es transportan grupos químicos entre enzimas
- **Cryobank:** Sistema comercial para crio-conservación de microorganismos compuesto por 64 tubos, cada uno de los cuales contienen una solución crioprotectora, no iónica que penetra en las células impidiendo la formación de cristales de hielo cuando la temperatura baja.
- **Ecotipo:** Forma genéticamente diferenciada de una especie que vive en un hábitat o ecosistema determinados.
- **Esteroles:** Son conocidos como alcoholes esteroides, son estructuras esteroides con 27 a 29 átomos de carbono, son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno que se caracterizan por tener como función orgánica oxigenada el alcohol.
- **Fenol:** Es un compuesto químico presente como sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH

- **Glucano:** polisacárido (glúcidos) formado por subunidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos.
- **Grados Brix:** Es una medida utilizada para determinar el cociente total de sacarosa o sal disuelta en un líquido.
- **Hexoquinasa:** Son un grupo de enzimas del tipo transferasa, que pueden transferir un grupo fosfato desde una molécula de "alta energía" a otra, que actuará como aceptora de este fosfato, denominada sustrato.
- **Hidrófobo:** En el contexto fisicoquímico, el término se aplica a aquellas sustancias que son repelidas por el agua o que no se pueden mezclar con ella.
- **Invertasa:** Son enzimas que se aplican en la industria de alimentos azucarados, cuya función es hidrolizar la sacarosa por escisión en sus constituyentes glucosa y fructosa.
- **Levadura seca activa:** La levadura seca activa es aquella que suele venir en forma de **gránulos en sobre** y su caducidad es muy larga sin necesitar condiciones especiales de conservación ni bajas temperaturas.
- **Manoproteínas:** Son los componentes de la pared celular de las levaduras "*Saccharomyces cerevisiae*" utilizadas en vinificación, para transformar el azúcar en alcohol y arrancar la fermentación alcohólica.
- **Péptido:** Son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Los péptidos, al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables de un gran número de funciones, muchas de las cuales todavía no se conocen.
- **Probiótico:** En alimentos, son microorganismos vivos adicionados que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos benéficos para el ser humano.
- **Tanino:** Son compuestos polifenólicos muy astringentes y de gusto amargo que producen las plantas.
- **Taxa:** Hace referencia a una categoría taxonómica, como una especie o un género.

