

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

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

TEMA:

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE TAXA DE LEVADURAS
PRESENTES EN EL FRUTO DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*) CON
CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA ALCOHÓLICA**

AUTOR:

DANIEL ANTONIO CORONEL NAVARRO

DIRECTORA:

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, febrero del 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE GRADO**

Yo, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

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

Quito, febrero del 2015

Daniel Antonio Coronel Navarro

CC: 1722646385

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico de manera especial a mi padre Francisco Coronel, amigo, guía, un ejemplo a seguir. A mi madre Fanny Navarro, pilar fundamental en mi realización personal y a cada uno de los miembros de mi familia.

Para Laura Huachi, más que una docente, amiga, guía y confidente; con sonrisas ha sabido guiarme en la realización de este trabajo y en muchos aspectos de mi vida ha sabido aconsejarme.

Mi agradecimiento infinito a Pablo Coba, sin su guía, apoyo incondicional y desinteresado nada de esto hubiese sido posible.

Al Doctor Ever Morales, investigador apasionado, cuyo interés por la investigación me ha sido transmitido a través de sus enseñanzas, consejos y sonrisas.

Para Karla Verdugo, por su compañía, apoyo y cariño que me han permitido sobrellevar situaciones duras, sin su aliento no hubiese podido alcanzar muchas metas ahora cumplidas, gracias por ser más que una amiga.

Daniel Antonio Coronel Navarro

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos el espacio y la experiencia de sus docentes que han contribuido con nuestra formación humana y profesional.

A mi Directora de Tesis la Msc. Laura Elizabeth Huachi Espín por ser guía, amiga y proporcionarme las pautas necesarias para poder culminar este trabajo de investigación.

Al Msc. Pablo Coba Santamaria, por su amistad y confianza en mi persona y mis compañeras para ser parte de sus proyectos que nos han llevado a desarrollarnos de forma profesional.

A mis profesores que han implantado valores, han brindado sus conocimientos y experiencia para llegar a ser grandes profesionales

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
Objetivos	2
Objetivo General.....	2
Objetivos específicos	2
Justificación.....	2
Hipótesis.....	4
Hipótesis Alternativa	4
Hipótesis Nula.....	4
Variables.....	5
Variable independiente	5
Variable dependiente	5

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Industria vinícola.....	6
1.1.1. Biotecnología industrial.....	6
1.1.2. El vino	6
1.1.2.1. Clasificación de los vinos	7
1.1.2.2. Importancia mundial de la producción de vino.....	10
1.2. Fermentación.....	11
1.2.1. Tipos de fermentación	12
1.2.1.1. Tipos de fermentación en base a la presencia ausencia de oxígeno. 12	
1.2.1.2. Tipos de fermentación basada en los productos finales.....	13
1.2.2. Cinética fermentativa.....	16
1.3. Levaduras	19
1.3.1. Definiciones.....	19
1.3.2. Clasificación de las levaduras	20
1.3.2.1. Levaduras industriales.....	22
1.3.2.2. Levaduras naturales o salvajes	23
1.3.2.3. Levaduras falsas	23
1.3.3. Levaduras vinícolas	23
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25

1.4.1. Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.5. Mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	28
1.5.1. Descripción taxonómica	28
1.5.2. Descripción botánica	28
1.5.3. Ubicación geográfica	28
1.5.4. Composición química y nutricional	29
1.5.5. Propiedades y usos	31
1.5.5.1. Propiedades nutritivas	31
1.5.5.2. Uso ornamental	32
1.5.5.3. Otros usos	33
1.6. Selección e identificación de levaduras	33
1.6.1. Aislamiento de levaduras	33
1.6.2. Selección de cepas fermentativas	33
1.6.2.1. Selección de cepas por resistencia alcohólica	34
1.6.3. Identificación de levaduras	35
1.6.3.1. Identificación mediante criterios morfológicos	35
1.6.3.2. Identificación mediante criterios bioquímicos	36
1.6.3.2.1. Criterios bioquímicos enzimáticos	36
1.6.3.2.2. Técnicas Moleculares	37
CAPÍTULO 2	
MARCO METODOLÓGICO	38
2.1. Ubicación	38
2.2. Muestreo	39
2.2.1. Materiales, Reactivos	39
2.2.1.1. Procedimiento de muestreo de frutos de mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	39
2.3. Aislamiento por prefermentación y por dilución	40
2.3.1. Materiales, Reactivos	40
2.3.1.1. Prefermentación de mortiño	40
2.3.1.2. Dilución	40
2.4. Aislamiento por cultivos puros y codificación	42
2.4.1. Materiales, Reactivos	42
2.4.1.1. Procedimiento para aislamiento de cultivos puros	42
2.4.1.2. Procedimiento para la codificación de cepas puras	43

2.5. Identificación macro y microscópica de cepas.....	43
2.5.1. Materiales, Reactivos.....	43
2.5.1.1. Procedimiento	43
2.6. Siembra en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio	44
2.6.1. Materiales, Reactivos.....	44
2.6.2. Procedimiento.....	44
2.7. Siembra en medio Lisina adicionado lactato de sodio	45
2.7.1. Materiales, Reactivos.....	45
2.7.1.1. Procedimiento	46
2.8. Siembra en medio YPD adicionado diversas concentraciones de etanol.....	46
2.8.1. Materiales, Reactivos.....	46
2.8.1.1. Procedimiento	47
2.9. Tinción vital de células de levadura (Análisis de viabilidad de cepas).....	48
2.9.1. Materiales, Reactivos.....	48
2.9.1.1. Procedimiento	48
2.10. Identificación bioquímica de cepas.....	49
2.10.1. Materiales, Reactivos	49
2.10.1.1. Procedimiento mediante pruebas RapID Yeast Plus REMEL	49
2.10.1.1.1. Preparación del inóculo	49
2.10.1.1.2. Inoculación de los paneles RapID TM Yeast Plus	50
2.10.1.1.3. Incubación de los paneles RapID TM Yeast Plus	50
2.10.1.1.4. Puntuación de los paneles RapID TM Yeast Plus	51
2.11. Conservación en el cepario por el método Criobank (MAST, 2004)	51
2.11.1. Materiales, Reactivos	51
2.11.1.1. Almacenamiento de un microorganismo	52
2.11.1.2. Procedimiento	52
CAPÍTULO 3	
RESULTADOS.....	53
3.1. Aislamiento y codificación.....	53
3.1.1. Codificación de cepas obtenidas por el método de prefermentación	53
3.1.2. Codificación de cepas obtenidas por el método de dilución	54
3.1.3. Aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación	54
3.1.3.1. Control de crecimiento por el método de prefermentación.....	55
3.1.4. Aislamiento y control de crecimiento por el método de dilución.....	56

3.1.4.1. Porcentaje de crecimiento	57
3.2. Aislamiento en medios selectivos	60
3.2.1. Aislamiento y control de crecimiento en agar YPD con metabisulfito de sodio	60
3.2.1.1. Aislamiento y control de crecimiento presencia – ausencia por el método de fermentación.....	60
3.2.1.2. Aislamiento y control de crecimiento presencia – ausencia por el método de dilución.....	63
3.3. Identificación macroscópica y microscópica	65
3.3.1. Identificación macroscópica por el método de fermentación.....	65
3.3.2. Identificación macroscópica por el método de dilución.....	68
3.3.3. Identificación microscópica de cepas obtenidas por el método de fermentación	70
3.3.4. Identificación microscópica de cepas obtenidas por el método de dilución	71
3.4. Aislamiento y control de crecimiento en medio Lisina con lactato de sodio.	73
3.4.1. Aislamiento y control de crecimiento por el método de fermentación	73
3.4.2. Aislamiento y control de crecimiento por el método de dilución.....	75
3.5. Aislamiento y control de crecimiento en medio Agar YPD a diferentes concentraciones de etanol.....	76
3.5.1. Aislamiento y control de crecimiento por el método de fermentación	76
3.5.2. Aislamiento y control de presencia ausencia por el método de dilución...	78
3.6. Viabilidad de las taxa de levaduras de interés por medio de cámara Neubauer	78
3.6.1. Tinción vital de células de levadura	79
3.7. Identificación bioquímica de cepas mediante pruebas Rapid Yeast Plus	80
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	86
GLOSARIO	87
LISTA DE REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de vinos dentro de su clasificación por color	8
Tabla 2. Ejemplos de vinos dentro de su clasificación por contenido de gas carbónico	9
Tabla 3. Ejemplos de vinos dentro de su clasificación por contenido de azúcar	9
Tabla 4. Símbolos utilizados para la caracterización de especies en base a la las reacciones de fermentación y reacciones	21
Tabla 5. Clasificación de las levaduras por su actividad y aplicación.	22
Tabla 6. Especies de levaduras utilizadas industrialmente	22
Tabla 7. Géneros de levadura clasificados conforme su género	24
Tabla 8. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Tabla 9. Descripción taxonómica del Mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	28
Tabla 10. Composición química del Mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	30
Tabla 11. Composición nutricional del mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	32
Tabla 12. Análisis bromatológico del mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)	32
Tabla 13. Criterios de selección de arbustos para ser muestreados	39
Tabla 14. Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías y su codificación - Prefermentación.....	53
Tabla 15. Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías y su codificación . Dilución	54
Tabla 16. Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías, porcentaje de crecimiento y control presencia- ausencia de colonias - Prefermentación 55	
Tabla 17. Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías, porcentaje de crecimiento y control presencia – ausencia de colonias - Dilución.....	57
Tabla 18. Porcentaje de crecimiento de las cepas puras - Dilución	59
Tabla 19. Cultivo de cepas en Agar YPD + Na ₂ S ₂ O ₅ y control presencia – ausencia de crecimiento - Prefermentación.....	62
Tabla 20. Cultivo de cepas en Agar YPD + Na ₂ S ₂ O ₅ y control presencia – ausencia de colonias - Dilución.....	63
Tabla 21. Criterios de identificación macroscópica de las cepas aisladas por el método de prefermentación	65
Tabla 22. Comparación macroscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	66

Tabla 23. Comparación macroscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	67
Tabla 24. Comparación macroscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	67
Tabla 25. Criterios de identificación macroscópica de las cepas aisladas por el método de dilución	68
Tabla 26. Comparación macroscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Dilución.....	69
Tabla 27. Comparación macroscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Dilución.....	70
Tabla 28. Comparación microscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	71
Tabla 29. Comparación microscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	71
Tabla 30. Comparación microscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Prefermentación	72
Tabla 31. Comparación microscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Dilución.....	72
Tabla 32. Comparación microscópica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na ₂ S ₂ O ₅ - Dilución.....	73
Tabla 33. Cultivo de cepas en medio Lisina + C ₃ H ₅ O ₃ .Na y control presencia ausencia - Prefermentación.....	75
Tabla 34. Cultivo de cepas en medio Lisina + C ₃ H ₅ O ₃ .Na y control presencia ausencia – Dilución	75
Tabla 34. Cultivo de cepas en medio Lisina + C ₃ H ₅ O ₃ .Na y control presencia ausencia – Dilución (continuación).....	76
Tabla 35. Cultivo de cepas en medio Agar YPD + Etanol y control de crecimiento - Prefermentación.....	77
Tabla 36. Cultivo de cepas en medio Agar YPD + Etanol y control de crecimiento - Dilución	78
Tabla 37. Porcentaje de viabilidad de las taxa de levaduras mediante cámara Neubauer.....	79
Tabla 38. Identificación mediante criterios bioquímicos por medio de pruebas RapID Yeast Plus	81

Tabla 39. Identificación de cepas mediante el sistema RapID Yeast Plus de Remel 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> durante la fermentación alcohólica.....	16
Figura 2. Cinéticas fermentativas.....	18
Figura 3. Vía metabólica de Embden-Meyerhof Parnas	26
Figura 4. Criterios de caracterización morfológica de colonias.....	35
Figura 5. Ubicación de la zona de muestreo.	38
Figura 6. Diagrama del aislamiento de cepas.....	41
Figura 7. Diagrama del aislamiento de cultivos puros y codificación de cepas	43
Figura 8. Gráfica del porcentaje de crecimiento de cepas puras - Dilución	59
Figura 9. Gráfica de los porcentajes de crecimiento de cepas puras por el método de prefermentación.....	60
Figura 10. Comparación morfológica de hongo <i>Aspergillus niger</i>	63
Figura 11. Gráfica de los porcentajes de crecimiento de cepas puras por el método de dilución.....	64
Figura 12. Morfologías representativas presentes en las cepas aisladas por el método de prefermentación.....	66
Figura 13. Gráfica de los porcentajes de crecimiento de cepas puras.....	80
Figura 14. Identificación de la cepa C001/4/F, mediante criterios bioquímicos por medio de pruebas RapID Yeast Plus	82

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas por el método de dilución.	99
Anexo 2. Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas por el método de prefermentación	106
Anexo 3. Zona de muestreo, recolección de bayas y aislamiento de cepas	110
Anexo 4. Conservación en el cepario.....	111
Anexo 5. Planta de mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>) antes de su caracterización botánica	112
Anexo 6. Identificación botánica del mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>) en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador	113

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se lo realizó con el objetivo de identificar las especies de levaduras presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, estableciendo la viabilidad de las taxa de levaduras por medio del análisis microscópico y cámara de Neubauer. A partir de esto, determinar la resistencia de las levaduras seleccionadas a diferentes concentraciones de etanol, para poder caracterizar morfológicamente y bioquímicamente las levaduras de interés, mediante pruebas estandarizadas Remel.

Se aisló 52 cepas de levaduras de frutos de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), las cuales fueron identificadas por sus características morfológicas de sus células y colonias. De estas, por el método de prefermentación, 3 cepas presentaron crecimiento óptimo y de acuerdo a su caracterización se las incluye dos en el género *Saccharomyces* y una cepa perteneciente al género *Candida*, Mientras que por el método de dilución se identificaron 2 cepas con crecimiento considerable pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces*.

La propiedad de resistencia alcohólica celular estableció que, de las 52 cepas aisladas, tan solo 2 cepas (que representan el 3,84%), portan esta propiedad a una concentración de 8%. Estas cepas fueron identificadas en los géneros *Saccharomyces* y *Candida*.

Los valores de viabilidad de las cepas que presentan resistencia alcohólica, son superiores al 98,00%, siendo este valor considerado en la industria enológica como apto para procesos industriales de fermentación de mosto, estas cepas fueron identificadas tras las pruebas bioquímicas como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida krusei*.

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan el potencial que posee el mortiño, como sustrato para el crecimiento de microorganismos con capacidad fermentativa, pero su baja resistencia alcohólica, les da una utilidad parcial dentro de la industria enológica.

ABSTRACT

The present investigation it made with the objective to identify taxa of yeast in the fruit of mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) with fermentative capacity and alcoholic resistance, establishing the viability of yeast through microscopic analysis and Neubauer tests, based on this, determining the resistance of the selected yeasts to different concentrations of ethanol, to characterized morphologically as and biochemically yeast, using standardized tests Remel.

52 yeast strains fruits of mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), which were identified by their morphological characteristics of both the colony, and its cells, which, by the method of prefermentation, 3 strains showed optimal growth was isolated and characterization of localized two on the genus *Saccharomyces* and a strain belonging to the genre *Candida*, by the dilution method 2 strains were identified with significant growth belonging to the genera *Saccharomyces* and *Brettanomyces*.

The identification of alcoholic strength established that, from 52 isolated strains, only 2 strains representing 3.84%, alcohol resistance present at a concentration of 8%, these strains were identified within the genera *Saccharomyces* and *Candida*.

The viability values strains having alcoholic strength are greater than 98.00%, this value being considered in the wine industry as suitable for industrial fermentation of must, these strains were identified after biochemical tests as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei*.

The results obtained in this investigation reveal the potential of the mortiño as optimal substrate for the growth of microorganisms with fermentation capacity, but its low alcoholic strength gives a partial utility within the wine industry.

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Ecuador más del 80% de los vinos que se consumen son importados, lo que indica que menos del 20% es producido localmente, esto establece una contradicción al Plan Nacional del Buen Vivir en cuanto la sustitución de importaciones, lo que refleja claramente que la industria del vino en Ecuador es incipiente, con una escasa tradición en la elaboración de vinos y una dependencia en la importación de cepas y materias primas dentro de esta industria.

La industria vinícola ecuatoriana presenta problemáticas muy marcadas, una de ellas se relaciona a las levaduras de elevada capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, características de las levaduras comerciales propias de esta industria, la base de esta problemática se enfoca a la escasa o nula investigación dentro del campo de la microbiología, principalmente en frutas autóctonas, investigación que podría establecer cepas de levaduras que puedan competir con las características de las levaduras comerciales.

Esta realidad incluye la necesidad de importar mostos para el desarrollo de bebidas fermentadas, por el desconocimiento de sustratos a base de frutos con características similares en su composición química a un mosto industrial que se ha enfocado principalmente en la uva (*Vitis vinífera*) (Oficina Comercial de ProChile, 2011, pág. 12).

El uso de frutos Andinos como el mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) para la elaboración de sub productos alimenticios y bebidas se ha visto limitado a una producción tradicional por temporada, enfocándose a productos como colada morada, jaleas, mermeladas, pasteles, helados, y harina los cuales son realizados desde un punto de vista cultural sin un conocimiento de las propiedades de este fruto. El mortiño cuya parte consumible es la baya tiene un elevado potencial industrial y médico, dicho potencial es desaprovechado por el desconocimiento, lo que ha llevado a este fruto a

una parcial desaparición por su condición de crecimiento silvestre y la pérdida de zonas aptas para su desarrollo (Estrella, 1986, pág. 279).

Pese a esta realidad el mercado del vino en Ecuador está creciendo debido a que existen empresas que se están dedicando a la producción y comercialización del mismo, sin embargo estos productos no son hechos a base de frutas sino son elaborados en base a sustancias químicas.

Tema:

Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum*) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica.

Objetivos:

Objetivo General:

Identificar las taxa de levaduras presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum*) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica

Objetivos específicos:

- Aislar levaduras nativas presentes en los frutos maduros de Mortiño (*Vaccinium floribundum*) en la Reserva Cayambe – Coca.
- Establecer la viabilidad de las taxa de levaduras de interés por medio del análisis microscópico y pruebas Neubauer.
- Caracterizar morfológicamente y bioquímicamente las levaduras de interés, mediante pruebas estandarizadas Remel.
- Determinar la resistencia de las levaduras seleccionadas a diferentes concentraciones de etanol.

Justificación:

El uso integrado de la bioquímica, microbiología y la ingeniería para obtener aplicaciones industriales de las capacidades metabólicas de los microorganismos, establece en cierto modo el significado de biotecnología, en la cual sus principales actividades son la obtención de productos químicos de vegetales o animales, su producción mediante bacterias, hongos, levaduras o cultivos de células (García, et al.

1993, pág. 13). Bajo esta consideración la microbiología como una ciencia asociada a la biotecnología, está ligada a la identificación de microorganismos que puedan tener aplicación industrial.

En el Ecuador existen algunos estudios relacionados en la caracterización e identificación de las taxa y cepas como es el caso del CLQCA (Colección de Levaduras Quito Católica) que es un esfuerzo de la Universidad Católica del Ecuador por levantar un cepario de levaduras. La perspectiva biotecnológica está relacionada al uso de levaduras fermentativas como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y su amplía la gama de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica e industrial en cuanto a la obtención de bioproductos.

Ecuador se ha visto en la necesidad de importar mostos y levaduras aptas para el desarrollo de bebidas fermentadas, por el desconocimiento de sustratos a base de frutos con características similares en su composición química a un mosto industrial; y levaduras específicas que participen en el proceso de fermentación (Villacrés, Martínez & Pozo, 2006, pág. 9).

El Plan Nacional del Buen Vivir sostiene que el acelerado crecimiento de las importaciones ha contribuido a deteriorar las condiciones de vida de la población de todos los sectores sociales y laborales, en el caso específico de la industria vinícola es necesario implementar sistemas de investigación y producción de levaduras y mostos para generar plazas de trabajo, fomentar la investigación y disminuir las importaciones en este sector.

A raíz de esto, se plantea la identificación de las taxa de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), de la familia Ericaceae, se encuentra distribuido en los Andes de Ecuador, desde la provincia del Carchi hasta Loja (Jørgensen & León, 1999, pág. 1181). Esta especie crece en un extenso rango altitudinal (1.600 hasta los 3.800 m.s.n.m.), se desarrolla a temperaturas de 8 a 16 °C en climas templados y fríos, en suelos húmedos y bien drenados (Bernal & Correa, 1990, pág. 11).

En décadas anteriores este producto tenía importancia dentro de la alimentación ecuatoriana atribuyéndole utilidades como el restablecimiento de los niveles normales de azúcar en la sangre, calmar el reumatismo, fiebres, cólicos, sanar la gripe, las dolencias del hígado y riñones (CESA, 1993, pág. 53); sin embargo la dificultad para su propagación, su crecimiento silvestre, baja producción anual (Torres & Trujillo, 2010, pág. 9) y limitado conocimiento corroborado acerca de sus beneficios, han generado una disminución en su consumo y con el pasar de los años la planta ha comenzado a desaparecer.

Al tener un bajo contenido de calorías su uso se ha extendido como parte de dietas, por la presencia de compuestos fenólicos y fibra (Vasco *et al.* 2009, pág. 8277), reduce el azúcar en la sangre. Su alto contenido en vitaminas C y A, le dan propiedades como antioxidante celular, acción purificadora y fortalecimiento de la vista.

Con esta premisa el mortiño puede ser considerado un excelente sustrato para la proliferación de levaduras salvajes con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica; lo que engloba el objetivo de esta investigación y abrirá puertas a nuevas investigaciones relacionadas a la generación de bebidas alcohólicas con similares características al mosto de uva (*Vitis vinífera*), siendo el mortiño uno de los frutos que por sus características bromatológicas puede ser comparado con la uva. Por lo cual es fundamental involucrarse en la ecología microbiana sobretodo en especies endémicas y en este caso el mortiño, por su riqueza en azúcares, nitrógeno y minerales que colaboran a su desarrollo.

Hipótesis:

Hipótesis Alternativa:

Existen diversas taxa de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).

Hipótesis Nula:

Existen diversas taxa de levaduras que no poseen capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).

Variables:

Variable independiente:

Aislamiento de levaduras en medios selectivos y medios adaptados con concentraciones variables de etanol; temperatura de incubación; pH.

Variable dependiente:

Crecimiento de colonias, sobrevivencia, porcentaje de contaminación, resistencia alcohólica en etanol, capacidad fermentativa.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Industria vinícola

1.1.1. Biotecnología Industrial

La Biotecnología Industrial, también conocida como biotecnología blanca, es el moderno uso y aplicación de la biotecnología para la producción y procesado sostenibles de combustibles, materiales y productos químicos. Se utilizan enzimas y microorganismos para fabricar productos en sectores tales como el químico, agroalimentario, papelerero, textil y energético (SBI, 2005, pág. 2).

El uso integrado de la bioquímica, microbiología y la ingeniería para obtener aplicaciones industriales de las capacidades sintetizadoras de los microorganismos, establece en cierto modo el significado de biotecnología, en la cual sus principales actividades son la obtención de productos químicos de vegetales o animales, su producción mediante bacterias, hongos, levaduras o cultivos de células (García, Quintero & López, 1993, pág. 13), bajo esta consideración la microbiología como una ciencia asociada a la biotecnología, está ligada a la identificación de microorganismos que puedan tener aplicación industrial.

1.1.2. El vino

El vino es definido como una sustancia hidroalcolica procedente de la fermentación de los azúcares de la uva por levaduras. En su composición se encuentran azúcares, ácidos, sales, compuestos fenólicos y otras sustancias (García, 2008, pág. 29). La calidad de un vino no depende de la cantidad de una única sustancia sino de la armonía y equilibrio del conjunto (García, 2011, pág. 37).

La Organización Internacional del Vino (2007, pág. 11), define al vino como “una bebida que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica de una fruta, sea fresca o madura, o del mosto de la fruta fresca, con un contenido mínimo de alcohol del 7%”.

Bajo este contexto, de una amplia cultura vinícola mundial el vino es definido como una sustancia hidroalcohólica procedente de la fermentación de los azúcares de la uva por levaduras. En su composición se encuentran azúcares, ácidos, sales, compuestos fenólicos y otras sustancias (García, 2008, pág. 29). Cada sustancia presente en el vino tiene un sabor y olor propio que se transmiten al conjunto. La calidad de un vino no depende de la cantidad de una única sustancia sino de la armonía y equilibrio del conjunto (García, 2011, pág. 37).

En Ecuador, la Norma Ecuatoriana NTE-INEN-0374, define los vinos de frutas de la siguiente manera: “el vino es obtenido por fermentación alcohólica de mostos constituidos por jugos de frutas convenientemente corregidos en lo que se refiere a contenido de azúcar y acidez” (Grado alcohólico – GL: 8-18%).

El sector vinícola internacional se ha caracterizado por la existencia de un grupo de países dominantes (España, Francia e Italia). Este grupo de países lidera la superficie cultivada de viñedos, la producción de uva, así como la elaboración de vinos. Pero desde hace unas décadas, un conjunto de países se han hecho del protagonismo de la industria el vino (Estados Unidos, China, Australia, Argentina) que poco a poco se han ido consolidando en este sector (Fernández, 2013, pág. 177).

1.1.2.1. Clasificación de los vinos

Los vinos se clasifican en base a distintos criterios, entre ellos se encuentra el color, el contenido de azúcar, grado alcohólico y de gas carbónico (Navarre, 1998, pág. 354).

Por el color, se consideran (Navarre, 1998, pág. 354):

- Blancos: Estos vinos se elaboran con uvas blancas o con uvas rojas de pulpa blanca. El color de estos vinos varía en diversos tonos de amarillo. Su contenido alcohólico varía entre 8.5 y 11.5 % y el de azúcares residuales es inferior a 2 g/L.

- Rosados: Se elaboran a partir de la uva tinta o mezcla de uvas tintas y blancas, la coloración de este vino es rosado, adquiere su color característico en una etapa de maceración prefermentativa del mosto junto con la cáscara del fruto.
- Claretos: Procedente de mostos de mezclas de uvas blancas y tintas o de sus mostos. Es un vino cuyo color es rojo ligero y pálido. Los vinos claretos más conocidos son elaborados con un 80% de mosto blanco y 20% de la vendimia tinta.
- Tintos: Estos se elaboran con uvas rojas, con un tiempo de maceración adecuado para permitir la extracción suficiente de la materia colorante de las uvas. El color de estos vinos varía en diversos tonos de rojo que puede incluir tonos de rubí a púrpura. Su graduación alcohólica se sitúa entre 8,5 y 12,5% y su contenido en azúcares residuales menor a 2 g/L.

Tabla 1.

Variedades de vinos dentro de su clasificación por color

Blanco	Rosados	Clarete	Tinto
Semillon	Rosé Syrah	Clarete Rioja	Merlot
Sauvignon Blanc	Rosé	Clarete Rioja Himaf	Cabernet Sauvignon
Chardonnay			Syrah
Gewürztraminer			Pinot Noir
			Malbec

Nota: Ejemplos de variedades de vinos clasificados por su color

Fuente: (Pérez, 2009, pág. 81)

Por el contenido de gas carbónico, se consideran (Gil, García & García, 2009, pág. 106):

- Vinos espumosos: Presentan una concentración importante de gas carbónico, lo que le da una característica efervescente.
- Vinos tranquilos: Son aquellos que no presentan gas carbónico de manera importante.

Tabla 2.

Ejemplos de vinos dentro de su clasificación por contenido de gas carbónico

Espumoso	Tranquilo
Medio & Medio Demisec	Iron Horse Vineyards
L'Hereu Brut	Goulart Clasico (Malbec)
Moscato Pinelli	Vino Polo Amateur Chardonay

Nota: Clasificación de vinos por el contenido de gas carbónico

Fuente: (Bruzzese, 2011, págs. 9-15)

Por su contenido de azúcar en (Hernández, 2003, pág. 131); (IOVW, 2012, pág. 5):

- Secos: No contienen azúcar, su contenido máximo de azúcar residual es 5 g/L proveniente de la fruta y el contenido de ácido (ácido tartárico) es de 2 g/L más bajo que el de azúcar residual.
- Semidulces: Su contenido máximo de azúcar residual es 5 a 25 g/L y el contenido de ácido (ácido tartárico) no sobrepasa los 18 g/L.
- Dulces: El contenido de azúcar puede provenir de forma natural o por adición. Su contenido mínimo de azúcar residual es 25 g/L.

Tabla 3.

Ejemplos de vinos dentro de su clasificación por contenido de azúcar

Seco	Semidulce	Dulce
Chardonnay de Pennautier	Domaine Vincent Latour Saint Aubin "1er. Cru Les Frionnes"	Recioto della Valpolicella
Viognier de Pennautier	Domaine Lequin Colin Chassange Montrachet "1er Cru Morgeot"	Vin Santo y Aleatico
Château Capitoul "Les Rocailles" Blanc	Chateau Laffitte Teston "Ericka"	Oporto

Nota: Clasificación de vinos por el contenido de azúcar

Fuente: (Bruzzese, 2011, págs. 9- 15)

Por su graduación alcohólica (porcentaje de alcohol en volumen) los vinos pueden ser clasificados como (Gil, García & García, 2009, pág. 110):

- Vinos de mesa: Volumen de alcohol inferior al 14.5%.
- Vinos de licor, licorosos, generosos o fortalecidos: Su porcentaje de alcohol en volumen se encuentra aproximadamente desde los 15% a los 23%.

1.1.2.2.Importancia mundial de la producción de vino

La Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV), establece que la producción mundial de vino del año 2011 (sin contar zumo y mosto) se estima en 265,8 millones de hectolitros. El primer país productor de vino es Francia, con 49,6 millones de hl (18,7% mundial), Italia, con 41,6 millones de hl (15,6% mundial), y España, con 34,3 millones de hl (12,9% mundial) (OIV, 2014, pág. 1).

Los intercambios mundiales (exportación) en el sector del vino revelan que un total de 72,2 millones de hectolitros entre el año 2001 y 2005, se ha extendido a 103,5 millones de hectolitros en el año 2011 según la OIV. Esto en términos de valor y tomando como fuente GTA (Servicios portuarios y aduaneros) (OEMV, 2012, pág. 7), el importe global de las exportaciones de vino y mosto habría alcanzado en 2011 la cifra de 23.264 millones de euros, lo que demuestra el constante crecimiento de esta industria (OIV, 2014, pág. 4).

La popularidad de los vinos de América Latina es cada vez mayor, lo que ha disminuido los ingresos de los productores europeos. Estos vinos, producidos y fermentados de manera más adaptada a la geografía americana, han ganado posición dominante en el mercado. Los vinos producidos en América Latina se asocian con valores como la honestidad, frescura, energía, juventud y familia; características que se asocian con un estilo de vida relajado y moderno (WTCS, 2013, pág. 80).

En Ecuador, el 90% de los vinos que se consumen es importado y el 10% restante es producido localmente por 5 empresas ecuatorianas, de las cuáles dos se encuentran realizando exportaciones: Chaupi Estancia Winery y Dos Hemisferios (ganadora de

premios internacionales con su cepa Chardonnay) (Oficina Comercial de ProChile, 2011, pág. 12).

Del 90% del vino importado por Ecuador, Chile es su principal proveedor con un 73% de participación, Argentina (13.12%), Estados Unidos (5.34%), España (4.18%), las importaciones totales de vino hacia Ecuador en el período 2000-2009, han experimentado un crecimiento de más del 178%, (Oficina Comercial de ProChile, 2011, pág. 12), pese a las estrategias de cambio de matriz productiva y los incentivos a la industria, la industria del vino en Ecuador es incipiente, lo que indica no solo una escasa tradición en la elaboración de vinos sino también una dependencia a la importación tanto de cepas como maquinaria dentro de esta industria.

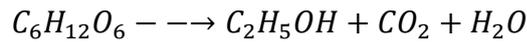
1.2.Fermentación

La palabra fermentación proviene de una adaptación del término en latín *fermentare*, que significa ebullición (Hernández, 2003, pág. 37), el término se plantea tras observar la ebullición aparente que presenta el proceso de elaboración de vinos a causa de la producción del dióxido de carbono, que se libera en forma de burbujas.

La bioquímica define a la fermentación como un proceso mediante el cual las sustancias orgánicas siendo estas el sustrato, sufren una serie de cambios químicos que incluyen procesos de reducción y oxidación liberando energía; al finalizar la fermentación, se presenta una acumulación de varios productos, oxidados y reducidos generando un balance total de energía positivo. La energía liberada en este proceso es utilizada en el metabolismo de los microorganismos.

En el concepto bioquímico no se considera como fermentaciones a los procesos en los que participa el oxígeno. Cuando el aceptor final de electrones es oxígeno molecular y una sustancia orgánica, el proceso se conoce como respiración (García, 2008, pág. 38).

Así se puede establecer como ejemplo la obtención de etanol, dióxido de carbono y agua a partir de glucosa (Barrachina, 2007, pág. 252):



Desde el punto de vista microbiológico, la fermentación es el proceso en que los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de sustancias orgánicas es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos para esta finalidad (Hernández, 2003, pág. 38).

Para la industria vinícola la cual se basa en las fermentaciones microbiológicas, no existe diferencia entre fermentación y respiración, pues en ambos procesos los microorganismos hidrolizan un sustrato orgánico, ya sea en presencia o ausencia de oxígeno. Las conversiones mencionadas de glucosa en etanol, dióxido de carbono y agua, así como en lactato y agua son procesos de fermentación desde el concepto microbiológico (García, 2011, pág. 38).

En procesos naturales, la fermentación no se lleva a cabo por una sola especie de levadura sino por una sucesión de cepas diferentes como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rodotorula*, *Metschnikowia*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa*, cepas que además de tener un alto poder fermentativo poseen una gran resistencia alcohólica (Regodón, 2004, pág. 6).

1.2.1. Tipos de fermentación

1.2.1.1. Tipos de fermentación en base a la presencia ausencia de oxígeno

Las fermentaciones se han clasificado en base a la presencia o ausencia de oxígeno molecular durante el proceso. De acuerdo con esta división, los procesos se denominan:

- Fermentación aerobia: El aceptor final de electrones es el oxígeno; es imprescindible su presencia para el desarrollo de microorganismos y la producción del compuesto deseado. Bajo este proceso se obtiene biomasa, dióxido de carbono y agua.

- Fermentación anaerobia: El proceso de producción del metabolito de interés en un ambiente libre de oxígeno; los productos finales son sustancias orgánicas, como ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, butanol, etanol y acetona.

1.2.1.2. Tipos de fermentación basada en los productos finales

- Fermentación homoláctica: Proceso de fermentación de la glucosa obteniendo ácido láctico a través de la enzima láctico deshidrogenasa, siendo el NADH el dador de electrones en la reacción de la tercera etapa de la vía glucolítica. Esta fermentación es característica de los micrororganismos del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. (Voet & Pratt, 2007, pág. 447).
- Fermentación heteroláctica: Proceso de fermentación en la cual se utiliza la mitad de la molécula de glucosa, esta se transforma en ácido láctico, y el resto se transforma en una mezcla de anhídrido carbónico, ácido fórmico, ácido acético, etc. Esta fermentación es característica de los micrororganismos del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, el (Voet & Pratt, 2007, pág. 446).
- Fermentación del ácido propiónico: Proceso de fermentación en la cual se pueden utilizar tanto azúcares como lactato. Es característica de algunos microorganismos anaerobios como el *Propionibacterium* (bacilo grampositivo, no esporulado).
- Fermentación ácido mixta: Proceso de fermentación en el cual se metabolizan hexosas a través del piruvato a ácido láctico, ácido acético, ácido succínico y ácido fórmico. Esta fermentación es característica de la mayoría de las enterobacterias, como *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli*, (Villanueva, 1996, pág. 472).
- Fermentación de butanodiol: Fermentación en la cual se producen 2,3-butanodiol a partir de una molécula de glucosa. Este proceso se caracteriza por la condensación de dos moléculas de piruvato las cuales forman una molécula neutra de acetoína que se reduce a 2,3-butanodiol. Los microorganismos que presentan esta fermentación pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Bacillus* (Varela & Grotiuz, 2012, pág. 3).
- Fermentación del ácido butírico: Fermentaciones relacionadas a los hidratos de carbono cuyo objetivo es la obtención de energía, sin embargo dentro de este proceso de fermentación se pueden metabolizar diferentes sustratos además de hidratos de carbono como por ejemplo: aminoácidos (alanina, glicina). Esta

fermentación se presenta en bacterias del género *Clostridium* (bacilo grampositivo, anaerobio y esporulado) (Varela & Grotiuz, 2012, pág. 3).

- Fermentación maloláctica: También conocida como segunda fermentación, la cual consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico. Los microorganismos causantes de esta fermentación son bacterias lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Palacios, *et al.* 2006, pág. 47).
- Fermentación alcohólica: El desarrollo de la fermentación alcohólica está íntimamente ligada a la fase de crecimiento de las levaduras, de tal modo que cuando los mostos son muy ricos en azúcares, una buena parte de la fermentación tiene que realizarse con levaduras en la fase de declive, pudiendo entonces surgir problemas para finalizarla (Bely, *et al.* 1990, pág. 249).

La razón por la cual las levaduras no se siguen multiplicando no suele estar en una carencia nutricional del medio fermentativo, sino más bien en la aparición de uno o varios factores limitantes que frenan el crecimiento de las células. Entre estos factores cabe destacar la acumulación en el medio de sustancias segregadas por las levaduras que a ciertos niveles pueden ser tóxicas para ellas mismas, como la acumulación de alcohol o de ácidos grasos de cadena media, que dificultan o impiden el transporte de sustancias a través de las membranas celulares.

Antes de alcanzar la máxima población de levaduras, se produce cierto tiempo antes, la mayor velocidad de desprendimiento de anhídrido carbónico, coincidiendo con un consumo de azúcares de tan solo unos 10 g/L y cuando la población celular corresponde a un tercio de la máxima (Agudo, 2014, pág. 19). El conocimiento de este dato puede tener gran interés, pues permite detectar de manera inicial una posible carencia de nitrógeno asimilable, ya que existe una correlación entre éste y la velocidad de desprendimiento de gas carbónico: además de poder predecir la duración de la fermentación y también coincidir con la máxima liberación de calor, pudiendo tomarse medidas de refrigeración si fuese necesario.

La velocidad de fermentación expresada como cantidad de azúcar transformado en unidad de tiempo, es muy variable al depender de una gran cantidad de factores, no

obstante la velocidad de desprendimiento de anhídrido carbónico oscila entre 0,4 a 2,8 g/L y hora, que corresponde a una velocidad de consumo de azúcar de 0,9 a 6,0 g/L y hora. La temperatura es uno de los factores que más influyen en la cinética de las fermentaciones, siendo más activa cuando esta es más elevada y hasta el límite vital de las levaduras (22 a 27 °C): influyendo también su régimen, pues una temperatura alta al principio de la fermentación, aumenta efectivamente la velocidad fermentativa, pero puede conducir a una parada de fermentación hacia el final de la misma (Agudo, 2014, pág. 20).

El rendimiento fermentativo de una levadura es la cantidad de azúcar que puede ser transformada en alcohol durante la fermentación alcohólica, que depende de las condiciones del medio y sobre todo del tipo de levadura considerada, alcanzando valores situados entre 16 y 17 g/L por cada 1 por 100 vol de etanol formado. El poder alcohólico es la máxima cantidad de alcohol que puede producir una levadura por fermentación, valor que varía en función del tipo de levadura, siendo la especie de *Saccharomyces cerevisiae* la que mejores propiedades alcohólicas alcanza. La energía fermentativa o la capacidad de una cepa de levadura para iniciar una rápida y pronta fermentación del mosto, es la cantidad de azúcar transformada por unidad de tiempo, que equivale a la velocidad de consumo de azúcar, situada entre los valores antes citados de 0.9 a 6.0 g/L y hora (Agudo, 2014, pág. 20).

En el siguiente diagrama se expresan las reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura.

Metabolismo de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica

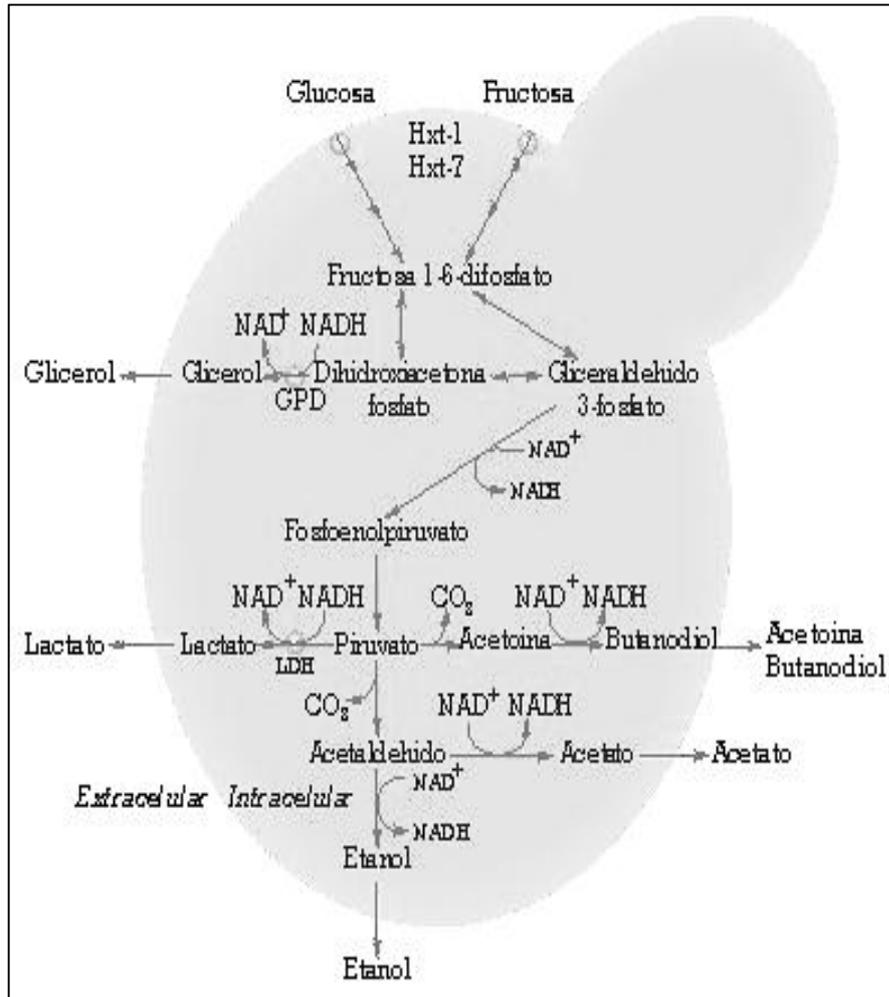


Figura 1. Representación esquemática de la síntesis de los metabolitos principales producidos por *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica Fuente: (Cordero, 2007)

1.2.2. Cinética fermentativa

Mosquera (2012) define la cinética fermentativa como la velocidad de metabolización de azúcares relacionadas al tiempo. En enología, es habitual definirla como la variación de la densidad o como la pérdida de dióxido de carbono relacionado al tiempo. La cinética fermentativa permite el seguimiento del progreso de la fermentación y la detección de situaciones anormales (pág. 26); varios son los criterios a tener en cuenta para determinar la correcta cinética fermentativa de una levadura:

- Duración total del proceso.
- Arranque rápido de la fermentación: Garantiza la estabilidad de la materia prima (mosto y levadura) y disminuye las posibilidades de ataques bacterianos o reacciones indeseadas de oxidaciones.
- Respuesta al estrés fermentativo: Es causado por la producción de etanol y CO₂, ácidos grasos saturados, deficiencia o ausencia de micronutrientes y esteroides de membrana.
- Regularidad fermentativa y curva termodinámica de cada especie de levadura: Una cinética gradual ayuda a establecer la ausencia de explosiones calóricas. Esto evitará elevaciones excesivas de temperatura que puedan provocar mala calidad del vino e incluso paradas fermentativas. Además permitirá reducir la necesidad de refrigeración.
- Ausencia de problemas de acabado: Se refiere a la presencia de azúcares residuales en el vino, este punto garantiza que la cepa pueda terminar correctamente la fermentación sin que en el vino permanezcan azúcares residuales.

Las curvas termodinámicas de las especies de levadura en estudio manifiestan diferentes gradientes de concentración de azúcar, amplias variaciones en el tiempo en el que se dan los máximos consumos y, por tanto, la producción de los máximos calóricos. En la figura 2, se representan curvas, cuya altura de cresta y extensión de la base varía mucho de una cepa a otra (García, 1993, pág. 103).

Cinéticas fermentativas

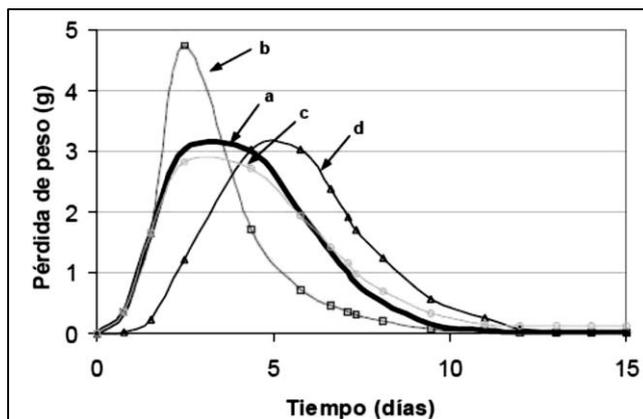


Figura 2. Diferentes cinéticas fermentativas. a) Correcta, b) Rápida, c) Con problemas de acabado, d) Con problemas de arranque.

Fuente: (Abad, 2006, pág. 66)

La curva puede ser dividida en tres fases (Abad, 2006, pág. 65):

La fase de latencia, corresponde con el periodo de saturación del medio en CO₂. El periodo de duración está en función de la temperatura y generalmente esta fase no supera las 24 horas.

La segunda fase dura hasta el final del crecimiento celular. Esta fase se caracteriza por un máximo de velocidad específica de liberación de CO₂. La velocidad específica máxima es correspondiente a la actividad celular; se alcanza muy pronto, aunque se haya producido menos de 5 g/L de CO₂, este valor corresponde con un consumo de azúcar inferior a 10 g/L. en esta etapa el número de células es menor al tercio de la población final (Mosquera, 2012, pág. 26).

El valor de la liberación CO₂ es interesante por tres aspectos:

- Permite detectar los mostos con carencia de nitrógeno (Bely, *et al.* 1990, pág. 249), puesto que existe cierta relación entre éste y la velocidad máxima de producción de CO₂.
- El valor está ligado a la liberación máxima de calor.
- Permite estimar la velocidad de la fermentación (Bely, *et al.* 1990, pág. 250).

Tercera fase corresponde a la fase estacionaria, las levaduras ya no se encuentran en crecimiento. Su número se mantiene constante. Durante toda esta fase, la actividad de las levaduras continúa disminuyendo progresivamente, a pesar de que, en la mayoría de los casos, se conserva una fuerte tasa de viabilidad. La disminución de la actividad celular se debe principalmente al agotamiento de componentes nitrogenados asimilables en el medio. Este elemento, no sólo interviene a nivel de crecimiento de la levadura sino también sobre la cinética de transporte de los azúcares por las levaduras a lo largo de la fermentación. Esta velocidad de transporte es a menudo la etapa limitante de la cinética fermentativa (Busturia & Lagunas, 1986, pág. 381).

Al final de la fermentación, cuando los azúcares residuales se encuentran en concentraciones mínimas, la velocidad cae y después se anula. Esta caída puede ser progresiva en el caso de fermentaciones largas. La cinética final se relaciona al número de levaduras viables. La velocidad de fermentación, la regularidad en la actividad fermentativa, duración total, y contenido en etanol generado, se debe valorar en idénticas condiciones en cuanto a composición química del sustrato, recipiente de microvinificación, volumen de aire en su interior, oxígeno disuelto en mosto y potencial redox, así como la temperatura de incubación (Salmon, Vincent, Bely & Barre, 1993, pág. 60).

1.3. Levaduras

1.3.1. Definiciones

Las levaduras han sido definidas desde diferentes puntos de vista, desde su morfología, aplicación y taxonomía estas definiciones pueden ser:

- “Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos, con una morfología característica esférica u ovalada. Una célula de levadura puede formar hasta 24 células hijas por gemación” (Santamarina, 1997, pág. 102).
- “Las levaduras son organismos unicelulares importantes en el sector biotecnológico e industria. Son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas, tales como pan, cerveza, vino y sidra. También pueden estar

involucradas en la degradación de algunos alimentos, por procesos de fermentación o contaminación durante la poscosecha de frutas” (Senses, *et al.* 2005, pág. 120).

- “Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies (clasificadas a su vez en 39 géneros), lo que muestra que dentro de los hongos constituyen un pequeño grupo. Son organismos unicelulares ampliamente distribuidas en la naturaleza” (García, 2004, pág. 346).

Considerando las múltiples definiciones otorgadas a las levaduras conforme su aplicación, ecología o morfología se establece una definición que englobe la mayoría de definiciones antes citadas

Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos agrupados en 350 especies, con una morfología esférica u ovalada, y de gran distribución en la naturaleza, sobre todo en la superficie de frutos o en sustratos ricos en azúcar, las levaduras son de gran interés industrial y biotecnológico cuya aplicación se ha centrado en la producción de alimentos y bebidas tales como pan, cerveza, vino y sidra.

1.3.2. Clasificación de las levaduras

Mendoza (2005, pág. 16) y Fisher (1998, pág. 198), establecen que el término levadura se refiere básicamente a un grupo de hongos unicelulares, donde las hifas y/o pseudohifas pueden o no estar presentes, tienen una fase sexual perfecta o teleomorfa y una fase asexual que ocurre mediante gemación formándose un abultamiento que se denomina yema.

Bajo este contexto se puede apreciar una clasificación de levaduras por su fase sexual, aunque existen levaduras a las cuales no se les han descrito aún su fase sexual, y sólo se le conoce por su la fase anamorfa, denominándolas “yeastlike” o con forma parecida a levadura; las cuales poseen una reproducción por gemación.

La ubicación taxonómica, este último grupo es ubicado en la división Deuteromycota u hongos anamorfos, clase Blastomycetes o Levaduras. La caracterización del

teleomorfo, cuando la célula haploide de la levadura se conjuga y da origen a asco con sus ascosporas, son incluidas en la División Ascomycota, clase Ascomycetes. (McGinnis, 1980, pág. 42). Las que producen basidios con basidiosporas, están entre los Basidiomycota, clase Basidiomycetes (Hoog de Guarro, 1995, pág. 242).

Kurtzman y Boekhout (2011), en el libro *The Yeast*, clasifican a las levaduras en base a varios criterios incluyendo: los tamaños y formas de sus células, las estructuras de las paredes celulares, los modos de reproducción y su capacidad de utilizar varios compuestos exógenos (pág. 21). A partir de la década de 1970, se incluyó en la caracterización de las levaduras como forma de clasificación su ADN y el ARN siendo este uno de los criterios de caracterización más utilizado.

Tabla 4.

Símbolos utilizados para la caracterización de especies en base a las reacciones de fermentación y reacciones

Símbolo	Criterios de caracterización de especies en base a la reacción	
+	positive	positivo
I	latent (rapid development of positive reaction after lag period)	latente (desarrollo rápido de reacción positiva después de un período de latencia)
+/I	positive or latent	positiva o latente
s	positive but slow	positivo pero lento
w	weak	débil
ws	weak and slow	débil y lento
+/w	positive or weak	positiva o débil
w/-	weak or negative	débil o negativo
Iw	latent but weak (rapid development of a weak reaction after a lag period)	latente pero débil (desarrollo rápido de una reacción débil después de un período de latencia)
-/I	negative or latent	negativo o latente
v	variable	variable
-	negative or latent	negativo o latente
n	no data	no hay datos

Nota: Criterios de caracterización de especies en base a su reacción en medios de crecimiento

Fuente: (Kurtzman & Boekhout, 2011, pág.21)

Sin embargo pese a esta clasificación existe una sistematización más sencilla que se usa para clasificar a las levaduras; durante muchos años se han definido a las levaduras en grupos utilitarios, teniendo en cuenta las actividades en que desarrollan los cultivos, que se emplean en las fermentaciones industriales.

Tabla 5.

Clasificación de las levaduras por su actividad y aplicación.

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

Nota: Clasificación, característica distintiva y uso de levaduras de interés.

Fuente: (García, 2004, pág. 347), (Hidalgo, 2011, pág. 607), (García, 1993, pág. 286), (Cardona, 2014, pág. 35)

1.3.2.1. Levaduras industriales

Las levaduras, desde el punto de vista industrial son los microorganismos con mayor relevancia, ya que a partir de diversas cepas se pueden convertir los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. Participan en la producción de cerveza, vino, alcohol industrial, glicerol, vinagre (Hernández A. , 2003, pág. 7). Las células de levadura se utilizan también en la industria de la panificación y como alimento animal y humano, por su alto nivel proteico, en la siguiente tabla se presentan algunas especies de levaduras y el proceso industrial en el cual participan.

Tabla 6.

Especies de levaduras utilizadas industrialmente

Levadura	Producto
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	Vino
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cerveza y levadura de panificación
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>	Alcohol industrial

Nota: Levaduras de interés utilizadas en la industria

Fuente: (Hernández, 2003, pág. 7)

1.3.2.2. Levaduras naturales o salvajes

Muchas veces las levaduras se encuentran como contaminantes en las industrias de fermentación. En estos casos su presencia es indeseable e interfiere con el buen rendimiento de los procesos. Estas levaduras se conocen como “levaduras salvajes” para indicar que provienen de otra fuente que no es el cultivo puro utilizado en las diferentes industrias (García, 1993, pág. 103). Las levaduras se encuentran sobre las uvas y otras frutas en estado natural también se denominan levaduras salvajes, siendo estas las primeras que aparecen en la uva cuando envera y en la época de maduración representan casi la totalidad de la población, por cual se las denomina salvajes (Hernández, 2003, pág. 132).

Estas levaduras producen fermentaciones del mosto, pese a su débil poder fermentativo, en el cual destaca el género *Klockera*. Las levaduras salvajes son capaces de desdoblar azúcares hasta el 4 y 6% vol. de alcohol, y con un rendimiento azúcar/alcohol bastante bajo, además de producir cantidades considerables de acidez volátil y acetato de etilo, razón por la cual estas levaduras no son deseadas (Hidalgo, 2011, pág. 836).

1.3.2.3. Levaduras falsas

Este criterio se fundamenta en la actividad patógena de la levadura. En este grupo se incluyen levaduras, como las pertenecientes al género *Torula*, que se reproducen exclusivamente por gemación y provocan reacciones de fermentación perjudiciales y algunas que poseen importancia médica, ya que son foco de infección diseminada como es el caso de *Candida glabrata* (Koneman, 2008, pág. 119).

1.3.3. Levaduras vinícolas

Las levaduras enológicas pertenecen a un amplio grupo de hongos unicelulares (Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos), incluyendo alrededor de 80 géneros, 600 especies y 4000 nombres. La mayor parte de las cepas fermentativas útiles pertenecen al género *Saccharomyces* y casi siempre a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Las diferencias reales e importantes entre levaduras se refieren a su morfología (apiculadas, ovoides, multiplicación por gemación o bipartición), y a sus propiedades fisiológicas (aptitud de fermentar o consumir tal o cual azúcar o ácido). Estas diferencias entre especies hoy se complementan y se sustituyen por el análisis del ADN que permite una identificación fácil de las cepas, es decir de las variedades de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que se diferencian, por sus propiedades enológicas (levaduras aromáticas de refermentaciones), como *S. uvarum*, *S. carlsbergensis*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*, *S. chevalieri*, *S. oviformis*, *S. italicus*, *S. capensis*, *S. vini*, *S. sake* (García, et al. 1993, pág. 103).

Tabla 7.

Géneros de levadura clasificados conforme su género

Teleomorphic ascomycetous genera (Ascomycotina)		Anamorphic ascomycetous genera (Deuteromycotina)	Teleomorphic heterobasidiomycetous genera (Basidiomycotina)	Anamorphic heterobasidiomycetous genera (Basidiomycotina)
<i>Ambrosiozyma</i>	<i>Lodderomyces</i>	<i>Aciculoconidium</i>	<i>Agaricostilbum</i>	<i>Bensingtonia</i>
<i>Arxiozyma</i>	<i>Metschnikowia</i> *	<i>Arxula</i>	<i>Bulleromyces</i>	<i>Bullera</i>
<i>Ascoidea</i>	<i>Nadsonia</i>	<i>Blastobotrys</i>	<i>Chionosphaera</i>	<i>Cryptococcus</i> *
<i>Babjevia</i>	<i>Pachysolen</i>	<i>Botryozyma</i>	<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Fellomyces</i>
<i>Cephaloascus</i>	<i>Pichia</i> *	<i>Brettanomyces</i> *	<i>Erythrobasidium</i>	<i>Hyalodendron</i>
<i>Citeromyces</i>	<i>Protomyces</i>	<i>Candida</i> *	<i>Fibulobasidium</i>	<i>Itersonilia</i>
<i>Clavispora</i>	<i>Saccharomyces</i> *	<i>Geotrichum</i>	<i>Filobasidiella</i>	<i>Kockovaella</i>
<i>Coccidiascus</i>	<i>Saccharomycodes</i> *	<i>Kloeckera</i> *	<i>Filobasidium</i>	<i>Kurtzmanomyces</i>
<i>Cyniclomyces</i>	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Lalaria</i>	<i>Holtermannia</i>	<i>Malassezia</i>
<i>Deharyomyces</i> *	<i>Saturnispora</i>	<i>Myxozyma</i>	<i>Leucosporidium</i>	<i>Moniliella</i>
<i>Dekkera</i> *	<i>Schizosaccharomyces</i> *	<i>Oosporidium</i>	<i>Mrakia</i>	<i>Phaffia</i>
<i>Dipodascopsis</i>	<i>Sporopachydermia</i>	<i>Saitoella</i>	<i>Rhodosporidium</i>	<i>Pseudozyma</i>
<i>Dipodascus</i>	<i>Stephanoascus</i>	<i>Schizoblastosporion</i>	<i>Sirobasidium</i>	<i>Reniforma</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Torulaspora</i>	<i>Sympodiomyces</i>	<i>Sporidiobolus</i>	<i>Rhodotorula</i> *
<i>Eremothecium</i>	<i>Wickerhamia</i>	<i>Trigonopsis</i>	<i>Sterigmatosporidium</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Galactomyces</i>	<i>Wickerhamiella</i>		<i>Tilletiaria</i>	<i>Sterigmatomyces</i>
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Williopsis</i>		<i>Tremella</i>	<i>Sympodiomycopsis</i>
<i>Issatchenkia</i>	<i>Yarrowia</i>		<i>Trimorphomyces</i>	<i>Tilletiopsis</i>
<i>Kluyveromyces</i> *	<i>Zygoascus</i>		<i>Xanthophyllomyces</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Lipomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> *			<i>Trichosporonoides</i>

Nota: * Géneros que se encuentra con frecuencia en los viñedos, bodegas, mosto de uva y/o vino

Fuente: (Kurtzman & Boekhout, 2011, pág. 31); (Pretorius, 1999, pág. 676).

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura utilizada para la obtención de etanol a nivel industrial, esto se debe a su fácil manipulación y recuperación, tolerancia a altas concentraciones de etanol, produce niveles bajos de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular lo que permite reutilizarlas, presenta características de floculación y sedimentación (Carballo, 2000, pág. 23).

Tabla 8.

Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Sacchaomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetaidae
Género	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

Nota: Ubicación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: (Carballo, 2000, pág. 24).

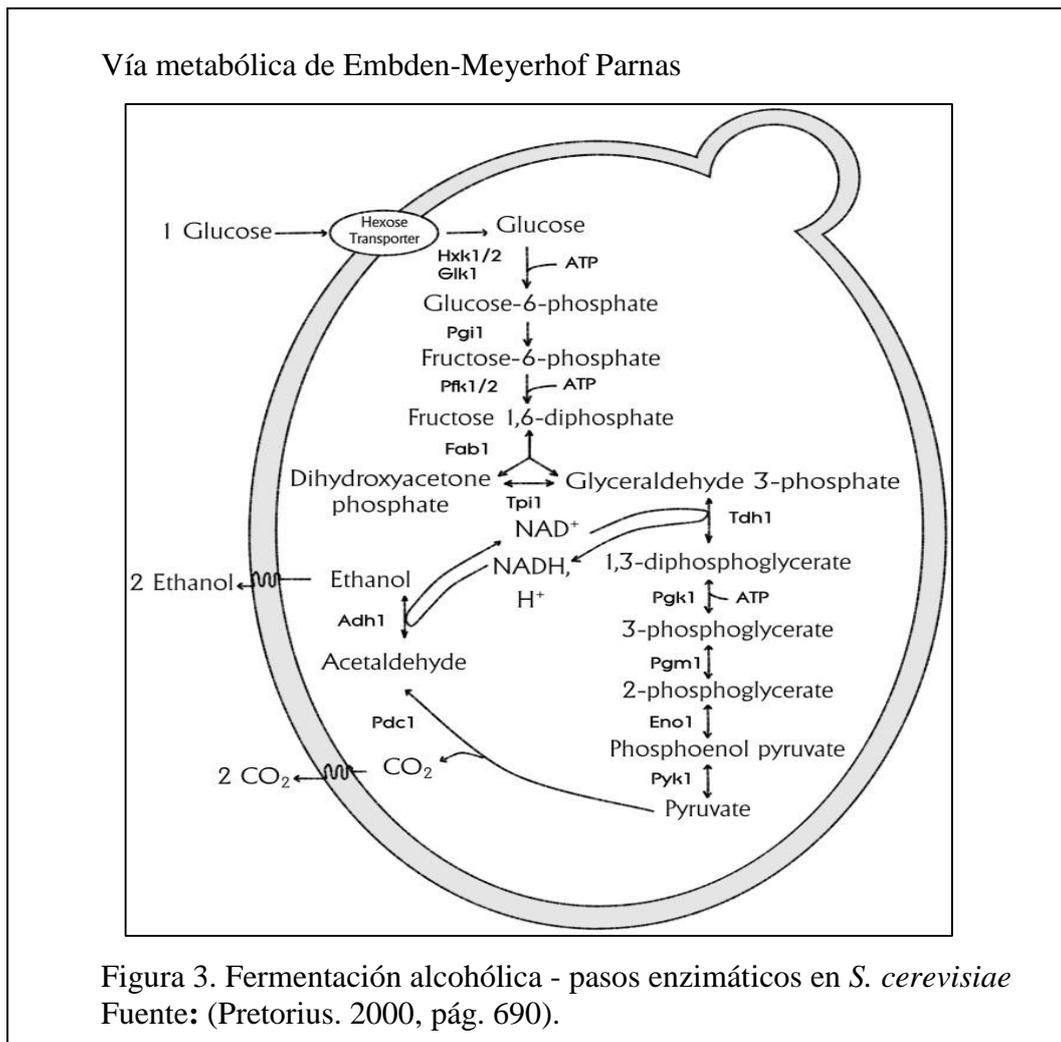
Saccharomyces cerevisiae, presenta colonias de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas. Sus dimensiones son: 2.5 – 10 micras de ancho y 4.5 – 21 micras de largo. Metaboliza glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. La aireación óptima es de 0.6 – 0.9 vvm (volúmenes de aire por unidad de volumen de medio por minuto) (Ariza & Gonzales, 1997, pág. 24)

El nombre de *Saccharomyces* significa azúcar de hongos, por su marcado poder fermentativo es característica de las industria cervecera, panificadora y vinícola; sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, interviene en la obtención de vacunas, ácidos grasos y aceites (Ariza & Gonzales, 1997, pág. 26).

Saccharomyces pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*; que se caracteriza por una reproducción vegetativa, que ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presenta ausencia de hifas verdaderas. *Saccharomyces* en presencia del O₂ puede metabolizar mediante reacciones de oxidación sustratos como glicerol, etanol y lactato (Yépez, 1995, pág. 37).

1.4.1. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae realiza fermentación alcohólica, en la cual a partir de la D-glucosa se forma etanol; D-glucosa es convertido en piruvato por la vía de Embden-Meyerhof Parnas en la cual bajo la acción de por la piruvato descarboxilasa, el piruvato es descarboxilado a acetaldehído y la tiamina pirofosfato y el acetaldehído reducido se transforma a etanol (Halasz & Laszlity, 1991, pág. 22)



La levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: lag, logarítmica, cambio diáuxico, postdiáuxica y estacionaria. La fase lag es considerada como un período de adaptación, en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica, las células llevan a cabo un metabolismo fermentativo (condición aerobia) en la que producen altas cantidades de etanol. Al disminuir la concentración de azúcares, las células atraviesan por el cambio diáuxico, el cual se define, como un periodo breve de tiempo en el cual no hay división celular, y se presenta un metabolismo respiratorio. En la fase postdiáuxica se incrementan la resistencia al estrés gradualmente, ya que las células utilizan el etanol como fuente de carbono; la fase estacionaria se caracteriza por la ausencia de división celular, causada por la deficiencia de nutrientes en el medio. En esta fase, las células alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés, engrosando su pared celular por la acumulación de carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, (Folch, *et al.* 2004, pág, 25).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede fermentar la glucosa a etanol. En condiciones anaerobias ésta es la única manera de producir energía. En la presencia de oxígeno, tiene lugar la respiración. Sin embargo, se puede producir fermentación alcohólica incluso en condiciones aerobias (Dijken & Scheffers, 1996, pág. 202) si la concentración de glucosa sobrepasa un valor límite crítico (superior a 0.16g/L) (Verduyn, *et al.* 1984, pág. 181). Esto es lo que se conoce como efecto Crabtree. La formación aeróbica de etanol a partir de glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* se produce de diferentes maneras en los tres tipos de técnicas de cultivo: discontinuo (batch), semicontinuo (fedbatch) y continuo (chemostat).

1.5. Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

1.5.1. Descripción taxonómica

Tabla 9

Descripción taxonómica del mortiño *Vaccinium floribundum* Kunth

<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Nombre Científico	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth
Sinonimia	<i>Vaccinium mortinia</i>
Nombres vulgares:	
Ecuador:	Mortiño Uva de los Andes Manzanilla de cerro Raspadura quemada Uva del monte
Colombia:	Agraz Macha macha
Perú:	Congama Pushgay

Nota: Ubicación taxonomía de la planta de mortiño

Fuente: (Ruiz, 2011, pág. 13)

1.5.2. Descripción botánica

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), es un arbusto ramificado cuya altura llega hasta 2.5 m, de hojas muy pequeñas con el margen aserrado o crenado, nervación pinnada, flores pequeñas presentadas en inflorescencias; El fruto es una baya esférica de 5 a 8 mm de diámetro de color azul y azul oscuro, lisa a veces glauca (Jørgensen, *et al.* 1995, pág. 229).

1.5.3. Ubicación geográfica

El mortiño se encuentra distribuido en los Andes ecuatorianos desde la provincia del Carchi hasta la provincia de Loja (Jørgensen & León, 1999, pág. 1181): Esta especie

crece en un extenso rango altitudinal desde los 1.600 a los 3.800 m.s.n.m, se desarrolla en climas templados y fríos, (8 a 16 °C), en los bosques seco montano bajo y húmedo montano, en suelos húmedos y bien drenados (Bernal & Correa, 1990, pág, 11).

En el Ecuador *Vaccinium floribundum Kunth*, es considerada una planta silvestre que pese a su extenso rango altitudinal de crecimiento, son pocos los páramos que poseen un número considerable de plantas, ya que la extensión de las áreas agrícolas ha relegado a esta especie a zonas de páramo comprendidas entre los 3400 hasta los 4500 m.s.n.m (MAGAP, 1998).

Luteyn (1996), señala que existen diversas especies pertenecientes al género *Vaccinium* en Ecuador los cuales se encuentran distribuidos en la Región Sierra (provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja), estos son *Vaccinium distichum* y *Vaccinium crenatum* y *Vaccinium floribundum Kunth* (pág. 328).

1.5.4. Composición química y nutricional

El mortiño es conocido como un fruto que posee gran cantidad de antioxidantes con un alto contenido de azúcares, pectinas y vitaminas, como la vitamina C, vitaminas del complejo B, al igual minerales como: potasio, calcio, fósforo y magnesio, proteínas, fibra, además de un gran contenido de agua (Jorgensen, Ulloa & Valencia, 1995, pág. 232).

La baya del mortiño consumida fresca aporta con agua en un 80%; proteína 0,7%; grasa alrededor del 1%; carbohidratos totales del 16,9% al 18,1%; cenizas 0,4%; fibra total del 7,6%; componente calórico de 84 kcal/100g FF (Fresh fruits – Futa Fresca), 75 kcal/100g FF (Vasco, *et al*, 2009, pág. 8277).

Una característica nutricional relevante del mortiño es la cantidad de vitaminas que aportan al bienestar humano, como la presencia de ácido ascórbico en una concentración de 14 g/100g (Vasco, *et al*, 2009, pág. 8277), (USDA, 2014); 106,1 mg/100g (Vasco, 2009, pág. 8278); *b*-carotenos 36ug/100g (Vasco *et al.*, 2009, pág.

8278); así como Tiamina 0,05 mg/100g; Riboflavina 0,05mg/100g; Niacina 0,18mg/100g; ácido patoténico 0,09 mg/100g (USDA, 2014).

Tabla 10

Composición química del Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

COMPONENTE	UNIDADES	NIVEL	+/-
Contenidos Aproximados			
Humedad	(g/100g FW)	81.0	0.2
Grasas	(g/100g FW)	1.0	0.04
Proteína	(g/100g FW)	0.7	0.02
Cenizas	(g/100g FW)	0.4	0.03
Carbohidratos totales	(g/100g FW)	16.9	0.1
Fibras totales	(g/100g FW)	7.6	2.2
Fibras solubles	(g/100g FW)	1.2	1.0
Fibras insolubles	(g/100g FW)	6.5	2.5
Azúcares			
Fructosa	(g/100g FW)	4.4	0.4
Glucosa	(g/100g FW)	2.6	0.3
Calorías	(Kcal/100g FW)	84	0.4
Ácidos orgánicos			
Ácido cítrico	(g/100g FW)	3142	614
Ácido málico	(g/100g FW)	1823	274
Minerales			
Fe	(g/100g FW)	0.64	0.2
K	(g/100g FW)	607	73
Ca	(g/100g FW)	17.0	2.3
Mg	(g/100g FW)	10.2	1.1
Cu	(g/100g FW)	0.12	0.02
Zn	(g/100g FW)	0.13	0.02
Compuestos antioxidantes			
Ácido ascórbico	(g/100g FW)	9.0	2.0
β - carotenos	(μ/100g FW)	36.0	6.0
Compuestos fenólicos totales	(mg GA/100g FW)	882	38
TEAC	(mg Trolox/100 FW)	1203	94

Nota: Composición química del fruto fresco de mortiño

Fuente: (Vasco, 2009, pág. 42)

1.5.5. Propiedades y usos

1.5.5.1. Propiedades nutritivas

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, según sus estándares, considera al mortiño como un fruto con bajo contenido de grasa y sodio, rico en fibras, vitaminas y libre de colesterol. En el Ecuador el mortiño es usado tradicional como en un plato especial con miel de caña, especias y otros pedazos de frutas en el Día de los Difuntos, sin olvidar a la Colada Morada, tradicional plato típico del país (Estrella, 1986, pág. 279).

El fruto no solo es de consumo animal sino también de consumo humano por su exquisito sabor, además de la alta concentración de antioxidantes. Generalmente en el Ecuador es utilizado para preparar la colada morada, jaleas, mermeladas, pasteles, helados, jugos, vinos y harina.

El mortiño, posee bajo contenido de calorías, alta cantidad de fibra (Vasco, *et al.* 2009, pág. 8277), se le atribuyen propiedades que reducen enfocadas a la reducción del azúcar en la sangre, el fruto cocido puede ser establecido como tratamiento para hipoglicemia, gripe y diabetes, además de problemas digestivos, vasculares, entre otros, por su alto contenido en vitaminas, como la vitamina C, que es un excelente antioxidante celular y purificadora, mientras que vitamina A, que fortalece a la vista y vitamina E, que protege a los glóbulos rojos. En la alimentación humana, este tipo de frutas constituye una de las fuentes más importantes de antocianos, que le confieren su color y los ácidos orgánicos tales como el ácido oxálico o el ácido málico son responsables de su sabor.

Tabla 11

Composición nutricional del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*)

Composición nutricional del mortiño cada 142 g			
Calorías	100 Kcal	Zinc	0.16 mg
Proteínas	0.97 g	Cobre	0.09 mg
Grasas	1.0 g	Manganeso	0.41 mg
Carbohidratos	20.5 g	Vitamina C	18.9 mg
Fibra	3 g	Tiamina	0.07 mg
Calcio	9.0 mg	Rivoflavina	0.07 mg
Hierro	0.24 mg	Niacina	0.25 mg
Magnesio	7.0 mg	A. Pantoténico	0.13 mg
Fósforo	15 mg	Vitamina B6	0.05 mg
Potasio	129 mg	Folacina	9.3 mg
Sodio	9 mg	Vitamina A	145.0 IU

Nota: Análisis de compuestos nutricionales del fruto de mortiño

Fuente: (INIAP, 2006)

Tabla 12

Análisis bromatológico del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*)

Resultados en 100 g de fruta fresca		
Identificación		
Antocianinas	%	5
Vitamina C	mg/100 g	106,1
pH		2,92
Grados Brix °		14,1
Azúcares Reductores	%	8,16

Nota: Bromatología del fruto de mortiño por cada 100 g.

Fuente: (INIAP, 2006)

1.5.5.2. Uso ornamental

El mortiño es conocido como un arbusto ideal para fines ornamentales gracias a que posee hojas con características brillantes, lisas, de color granate y rosadas en su juventud. Estas son usadas idealmente para adornar ambientes ya que al ser un arbusto con la poda adquiere formas decorativas que suelen ser muy llamativas (Estrella, 1986, pág. 279).

1.5.5.3.Otros usos

Puede ser utilizado como tinte y de color duradero. Esta planta es utilizada como regeneradora de sitios quemados empleándose en la reforestación de los páramos (Estrella, 1986, pág. 280).

1.6. Selección e identificación de levaduras

La identificación de levaduras por géneros y en menor medida su especie se fundamenta en las propiedades fisiológicas, las pruebas más utilizadas para la identificación de levaduras se basa en la actividad fermentativa de azúcares o compuestos carbonados y el crecimiento sobre diferentes fuentes de nitrógeno, vitaminas, comportamiento del crecimiento a diferentes temperaturas, resistencia a antibióticos, altas concentraciones de azúcar e hidrólisis de urea (Kurtzman & Boekhout, 2011, pág. 20).

1.6.1. Aislamiento de levaduras

El aislamiento de las levaduras se basa en la obtención de la muestra en estado natural, esta muestra debe ser inoculada sobre un medio selectivo con la finalidad de obtener la microflora correspondiente al fruto de estudio, para esto emplearan medios específicos y técnicas de estriado simple para minimizar la carga microbiana obtenida y de esta manera obtener cepas puras que permitan el análisis individual de sus características macroscópicas y microscópicas.

1.6.2. Selección de cepas fermentativas

La selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación garantiza por un lado una fermentación correcta, y mejora las características del producto final, (Mas, *et al.* 2012).

Las características generales que una cepa de levadura debe presentar para ser seleccionada son las siguientes (Mas, *et al.* 2002; Suárez, *et al.* 2002, pág, 43)

- Elevado poder fermentativo: Se refiere a la producción y tolerancia al etanol y está dado por la cantidad de azúcar que es transformada en alcohol, independiente del tiempo empleado en ello (Hidalgo, 2011, pág. 1822; García, 2001, pág. 32).
- Baja Acidez volátil: La acidez volátil del vino lo dan el conjunto de ácido acético, propionico, butírico y sulfúrico. Si la acidez volátil presente es muy elevada el producto final se avinagrará con el paso del tiempo.
- Rápido arranque de fermentación: La energía fermentativa o la capacidad de una cepa de levadura para iniciar una rápida y pronta fermentación del mosto, es la cantidad de azúcar transformada por unidad de tiempo, que equivale a la velocidad de consumo de azúcar (Hidalgo, 2011, pág. 1822; García, 2001, pág. 32).
- Resistencia al SO₂: El anhídrido sulfuroso ejerce sobre los microorganismos en general una acción de simple ralentización del crecimiento, antiséptica, o letal, esterilizante, según las cantidades empleadas.
- Factor killer: Las levaduras pueden clasificarse en tres fenotipos distintos: killer, sensible y neutras. Las levaduras de fenotipo killer sintetizan toxinas (factor killer) que son letales para las células sensibles que no sintetizan la toxina ni son resistentes a la misma. Las levaduras con fenotipo neutro no la sintetizan, pero son resistentes a su acción (Gutiérrez & Garijo, 2001, pág. 354)

1.6.2.1. Selección de cepas por resistencia alcohólica

Varios de los métodos propuestos para determinar la tolerancia al etanol se basan en la interferencia del mismo con los procesos fisiológicos dependientes de membrana, pues éstas, y en particular la membrana plasmática, son consideradas como dianas primarias de la acción del etanol. Uno de los métodos empleados para definir la tolerancia al etanol es determinar la concentración de etanol que suprime completamente el crecimiento (Panaretou, 1990, pág. 1766)

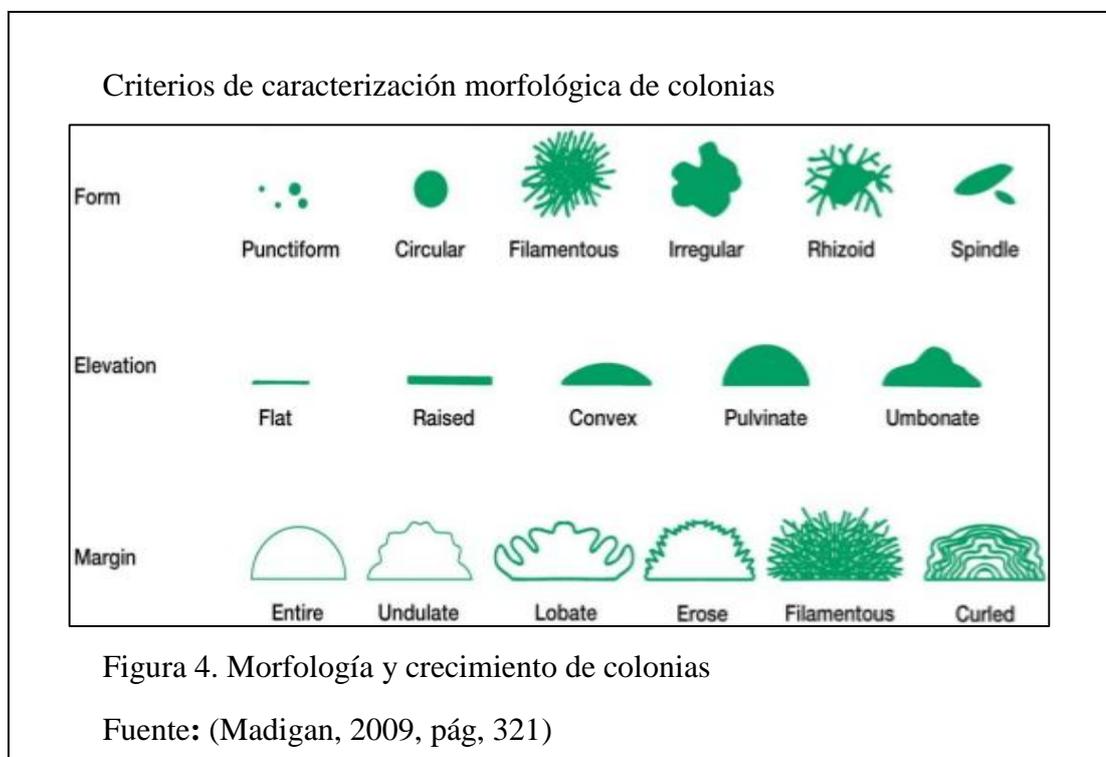
Otro método para definir la tolerancia al etanol, se basa en la relación existente entre las actividades fermentativas, de las estirpes, en medios con ausencia y presencia de etanol, a una determinada concentración (Nojiri & Ouchii, 1962, pág. 825).

1.6.3. Identificación de levaduras

1.6.3.1. Identificación mediante criterios morfológicos

Los criterios morfológicos pueden ser, macro o microscópicos (Linares & Solís, 2011, pág. 1):

- Criterios macroscópicos: Se considera el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen con gran facilidad en medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio (agar sangre, agar chocolate, agar YPD, etc.). Sin embargo, el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos, es considerado el medio de aislamiento preferencial para la identificación de organismos levaduriformes. (Madigan, 2009, pág. 321). En el medio SDA las colonias de levaduras se presentan ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa de aroma dulce agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen.



- Criterios microscópicos: Las características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes (Linares & Solís, 2011, pág. 1):
 - Tinciones: El estudio microscópico de los organismos levaduriformes o microorganismos relacionados como los microorganismos del género *Prototheca* se puede llevar a cabo mediante tinciones, generalmente se utiliza tinción de Gram; con esta tinción, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas.
 - Formación de hifas, clamidosporas, blastoconidias y artrosporas: La formación de estas estructuras por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de suma importancia para la identificación de algunas especies de levaduras. La presencia de estructuras con aspecto de hifas, permite enfocarnos en definir si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidias por lo que presentan puntos regulares de estrechamiento) o, caso contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias.
 - Prueba del tubo germinal: También denominada prueba de filamentación precoz, el tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Se considera una prueba con respuesta positiva cuando se visualizan tubos germinales.

1.6.3.2. Identificación mediante criterios bioquímicos

1.6.3.2.1. Criterios bioquímicos enzimáticos (Linares & Solís, 2011, pág. 3).

- RapID Yeast Plus System®: Es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos (Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Trehalosa, Rafinosa), ácidos orgánicos o aminoácidos, ácidos grasos (Éster de ácido graso, p-nitrofenil-N-acetil- β , D-galactosamida, p-nitrofenil- α , D-glucósido, p-nitrofenil- β , D-glucósido, p-nitrofenil- β , D-galactósido, p-nitrofenil- α , D-galactósido, p-nitrofenil- β , D-frucósido, p-nitrofenil fosfato, p-nitrofenil fosforilcolina,

Prolina- β -naftilamida, Histidina β -naftilamida, Leucil-glicina β -naftilamida), la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Estas pruebas permiten en identificar hasta 43 especies de levaduras.

- Medios cromogénicos: el diseño de estos medios se enfoca en el aislamiento e identificación de cepas levaduriformes. El fundamento de los mismos 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. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales.

1.6.3.2.2. Técnicas Moleculares

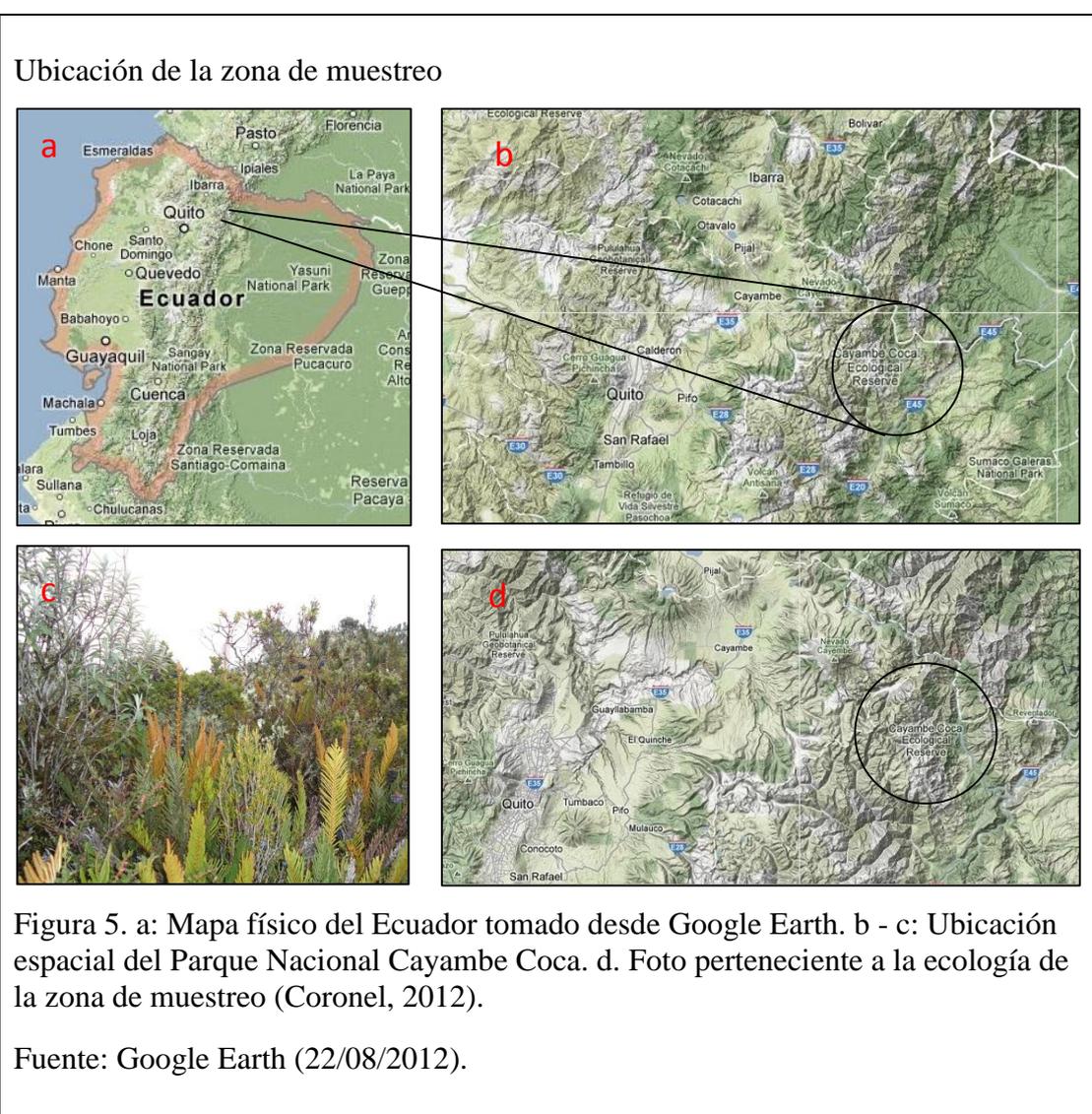
La comparación de los ácidos nucleicos entre cepas de levaduras, se limitaba originalmente a la determinación de la composición de dos de las bases nitrogenadas del ADN, y la mayoría de los investigadores usaron la desnaturalización térmica para conocer la composición del ADN, reportando principalmente 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 se mencionan 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) (Orberán, 2004, pág. 18).

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Ubicación

La fase experimental se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Universidad Politécnica Salesiana del CIVABI. Las muestras vegetales (planta y baya) fueron obtenidas en el Parque Nacional Cayambe Coca cuya posición geográfica es 0016324 N; 813815 E, a 3461 m.s.n.m. Cantón Cayambe, al nororiente de la ciudad de Quito en la provincia de Pichincha.



2.2.Muestreo

La recolección de los frutos se realizó con guantes estériles rociados con alcohol de 70°GL.

2.2.1. Materiales, Reactivos.

Fundas Ziploc, Cooler, cuchillos estériles, guantes estériles, papel absorbente, fundas plásticas, tijeras, marcador, frascos de vidrio de boca ancha estériles, papel aluminio, papel periódico, prensa para muestreo vegetal, flexómetro de 50 m, gel refrigerante; Alcohol 70°GL, Caldo peptonado, agua destilada; GPS: GARMIN ETREX VENTURE HC

2.2.1.1. Procedimiento de muestreo de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).

- Establecer una zona de muestreo en un cuadrante de 50 m² de una población de 2400 m² de Paramo Andino del Parque Nacional Cayambe
- Determinar mediante GPS las coordenadas y altura de muestreo.
- Seleccionar dentro del área establecida cuáles serán los arbustos para ser muestreados, bajo los siguientes criterios:

Tabla 13

Criterios de selección de arbustos para ser muestreados

Criterio	Valor
Altura promedio por planta (m)	1,50 - 1,75
Número aproximadamente de racimos por planta	42
Número aproximadamente de frutos por racimo	25

Nota: Características de la planta para ser considerada como objeto de muestreo

Elaborado por: Coronel, Daniel

- Colocar alrededor de 30 bayas maduras en cada funda Ziploc con 20 ml de caldo peptonado y de manera simultánea llenar los frascos de vidrio de boca ancha con bayas maduras. Los frascos de vidrio deberán estar libres de hojas, insectos, ramas o inflorescencias.

- Aplastar las bayas manualmente para homogeneizar la muestra en el caldo peptonado y aplastar las bayas de los frascos de vidrio para el desarrollo de la prefermentación.
- Colocar cada una de las muestras en un cooler estéril con geles refrigerantes.

2.3. Aislamiento por prefermentación y por dilución

La realización de las dos técnicas de aislamiento por prefermentación y dilución a continuación detalladas fueron realizadas con el equipo de protección necesario el cual consta de cofias, guantes y mascarilla, y se lo realizó dentro de cámara de flujo laminar dependiendo de la técnica usada.

2.3.1. Materiales, Reactivos

Frascos de vidrio de boca ancha, cooler, marcador permanente, papel aluminio, mechero bunsen, fósforos, papel absorbente, espátula; Alcohol de 70°GL; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.

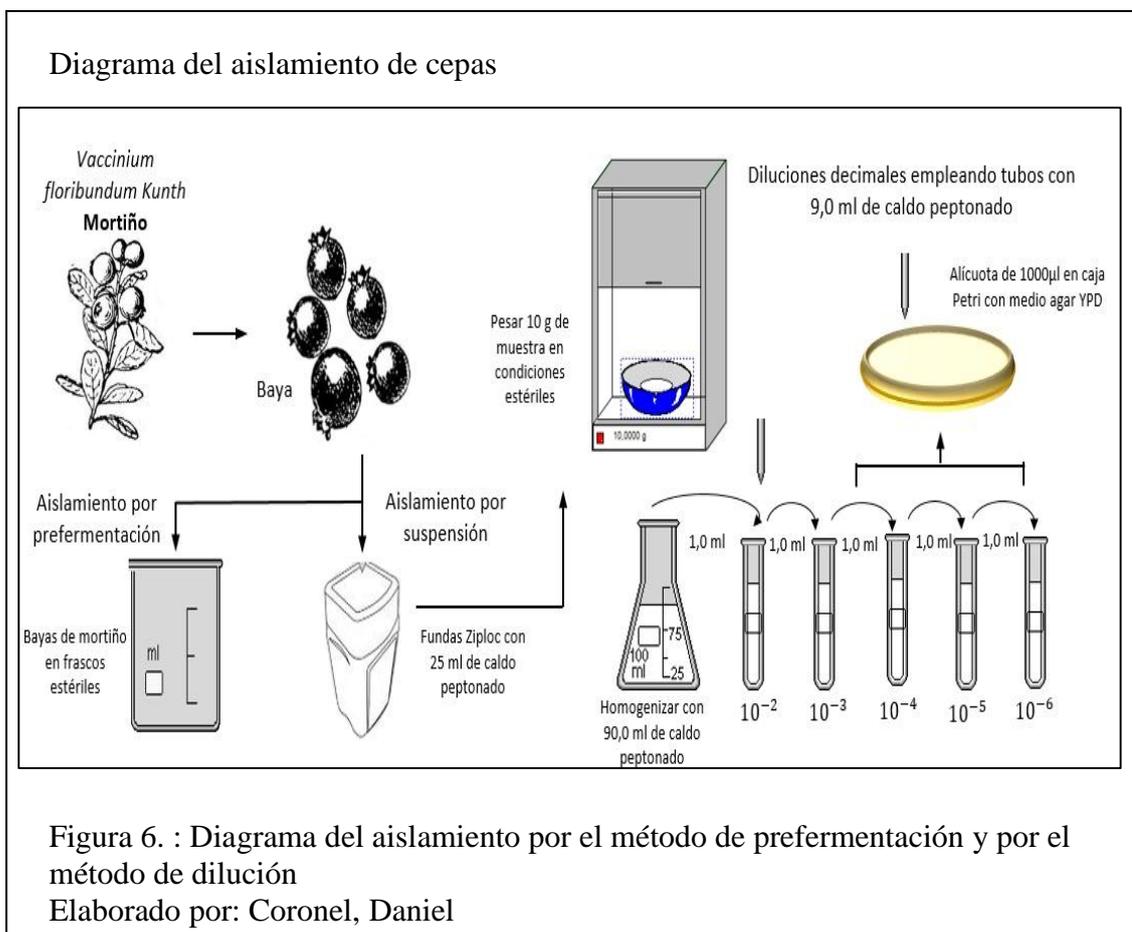
2.3.1.1. Prefermentación de mortíño

- Limpiar el exterior de los frascos de vidrio con alcohol de 70°GL y rotular los frascos.
- Destapar el frasco de vidrio en cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.
- Envolver el frasco de vidrio con papel aluminio, verificando que la boca del frasco no tenga aberturas.
- Colocar los frascos de vidrio en el cooler a una temperatura estimada de a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, para el crecimiento de levaduras a fin de que se produzca una fermentación espontánea predominantemente anaeróbica

2.3.1.2. Dilución

- Tomar las alícuotas (1000 μl) a partir de las fundas Ziploc con los frutos homogeneizados en el caldo peptonado (25 ml de caldo peptonado por funda)

- Tomar mediante una micropipeta, una alícuota de la muestra contenida en la funda Ziploc, y depositar 1 ml en el primer tubo con 9 ml de caldo peptonado (dilución 10^{-1}). Agitar hasta conseguir una dilución homogénea.
- Tomar otra punta de micropipeta estéril, y transferir de esta primera dilución 1000 μl al siguiente tubo con 9 ml de caldo peptonado (dilución 10^{-2}).
- Inocular 1000 μl en una caja petri con medio agar YPD (Agar Yeast Extract-Peptone-Dextrose), a partir del tubo con dilución 10^{-4} y 10^{-6} , con una micropipeta,
- Esparcir la muestra mediante un asa de Winogradsky de vidrio, la cual debe estar estéril antes de su introducción en el medio de cultivo.



2.4. Aislamiento por cultivos puros y codificación

2.4.1. Materiales, Reactivos

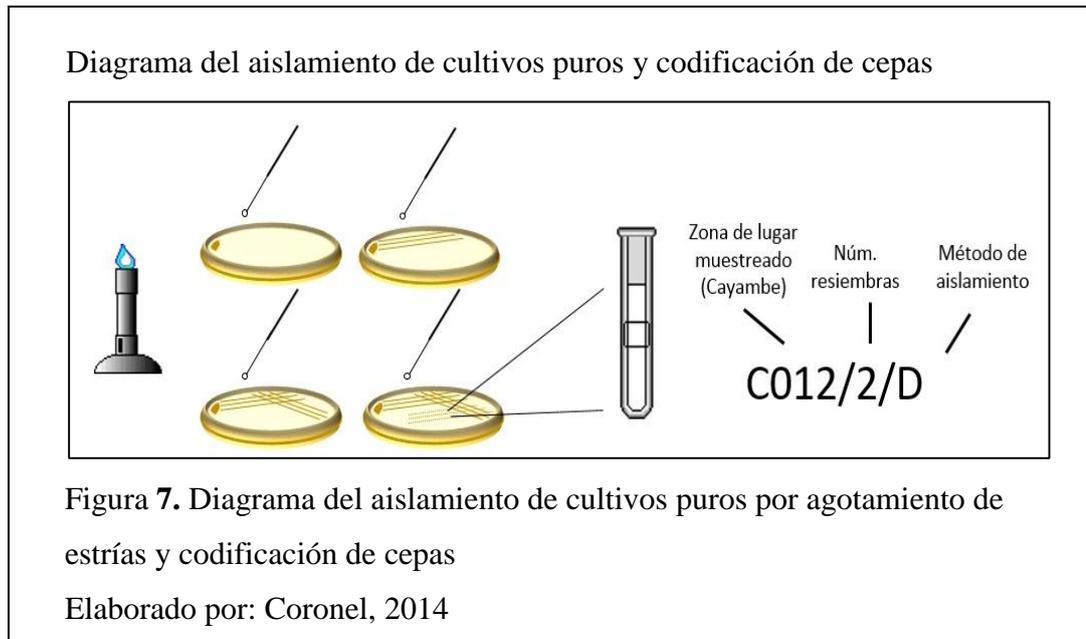
Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 1000 ml, marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70°GL, medio Agar YPD Broth, agua destilada; Cámara de flujo 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

2.4.1.1. Procedimiento para aislamiento de cultivos puros

- Sembrar la muestra de cultivo mediante la técnica agotamiento de estrías.
- Esterilizar el asa y enfriarla en las proximidades del mechero.
- Tomar una cantidad suficiente de inóculo (entre 1 y 3 colonias).
- Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde.
- Extender el asa con el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
- Cerrar la placa y flamear el asa al terminar el primer grupo de estrías.
- Abrir la placa y girarla alrededor de 45°. Posicionarse al final del primer grupo de estrías y proyectarlas hacia una porción virgen de la placa estableciendo así el segundo grupo de estrías.
- Finalizar con un pequeño agotamiento en el centro de la superficie del medio de cultivo
- Incubar a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ la placa estriada durante 24 horas en un cooler estéril.

2.4.1.2. Procedimiento para la codificación de cepas puras

- Establecer las siglas a usarse para la identificación de la zona de muestreo.
- Identificar el número de resiembras realizadas para la obtención de cultivos puros.
- Identificar el método por el cual se obtuvo la cepa madre.



2.5. Identificación macro y microscópica de cepas

2.5.1. Materiales, Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 500 ml, micropipetas de 100 a 1000 μ l, puntas de micropipeta, mechero de Bunsen, vaso de precipitación de 500 ml. marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70°GL, agua destilada; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2; Porta y cubre objetos, azul de lactofenol.

2.5.1.1. Procedimiento

- Preparar un frotis de cada una de las cepas aisladas en cultivo puro
- Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio. Y flamear el asa de siembra y dejar enfriar.

- Tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad de las colonias (una UFC) en medio sólido y transferirlo a la gota de agua.
- Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.
- Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el portaobjetos a la llama del mechero.
- Permitir que los frotis se sequen al aire y luego fíjelos con calor.
- Teñir con azul de lactofenol agregando suficiente colorante y deje que actúe durante 1 minuto.
- Lavar suavemente con agua.
- Secar la preparación.
- Examinar al microscopio con el objetivo 100X haciendo uso del aceite de inmersión

2.6.Siembra en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio

2.6.1. Materiales, Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 1000 ml, marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70°GL, YPD Broth, metabisulfito de sodio, Agar nutritivo, 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.

2.6.2. Procedimiento

- Pesar el medio Agar YPD (70 g) y el metabisulfito de sodio (0.15 g) de potasio en una balanza analítica Mettler Toledo NewClassic MF ML204/01 y colocarlos en el papel aluminio.
- Colocar en el frasco Boeco de 1000 ml, 500 ml de agua destilada y calentarla sobre la estufa magnética a 350 °C.

- Introducir en el frasco Boeco el agitador magnético y ajustarlo con la perilla específica de la estufa magnética Mettler Toledo, hasta que presente un movimiento constante.
- Colocar el medio Agar YPD con la ayuda de la espátula en el frasco Boeco paulatinamente esperando que este se disuelva, y aforar el volumen a 1000 ml.
- Calentar el medio hasta que este cambie su color a un tono translucido.
- Retirar el frasco con la ayuda de los guantes de calor y auto-clavar a 121°C.
- Adicionar metabisulfito de sodio anteriormente pesado cuando el medio haya alcanzado una temperatura menor a 30°C
- Dispensar en cajas petri bajo cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2
- Sembrar el inóculo por medio de la técnica de agotamiento de estrías.
- Colocar en un cooler estéril las cajas petri sembradas a temperatura estimada de a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Realizar el análisis de crecimiento cada una de las cajas a las 24 horas y un segundo análisis a las 48 horas luego de la siembra

2.7.Siembra en medio Lisina adicionado lactato de sodio

La clasificación de las levaduras como pertenecientes o no al género *Saccharomyces* se determinó mediante la siembra en medio de lisina con lactato de sodio. Este medio de cultivo es selectivo para levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*, ya que el medio posee como única fuente de nitrógeno la lisina; las levaduras del género *Saccharomyces* no pueden crecer teniendo a la lisina como única aporte de nitrógeno (Russo, 2011).

2.7.1. Materiales, Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 1000 ml, marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70°GL, medio comercial Lisina, lactato de Sodio, 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.

2.7.1.1.Procedimiento

- Pesar 1 mL de lactato de sodio al 50%, 6,6 g de medio Lisina y 0,25 g de agar por cada 100 ml en una balanza analítica Mettler Toledo NewClassic MF ML204/01.
- Colocar en el frasco Boeco de 1000 ml, 500 ml de agua destilada y calentarla sobre la estufa magnética a 350 °C.
- Introducir en el frasco Boeco el agitador magnético y ajustarlo con la perilla específica de la estufa magnética Mettler Toledo, hasta que presente un movimiento constante.
- Colocar los componentes del medio con la ayuda de la espátula en el frasco Boeco paulatinamente esperando que este se disuelva, y aforar el volumen a 1000 ml.
- Calentar el medio hasta que este cambie su color a un tono translucido.
- Retirar el frasco con la ayuda de los guantes de calor.
- Dispensar en cajas petri bajo cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2
- Sembrar el inóculo por medio de la técnica de agotamiento de estrías.
- Colocar en un cooler estéril las cajas petri sembradas a temperatura estimada de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Realizar el análisis de crecimiento cada una de las cajas a las 24 horas y un segundo análisis a las 48 horas luego de la siembra.

2.8.Siembra en medio YPD adicionado diversas concentraciones de etanol

2.8.1. Materiales, Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 1000 ml, marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70 °GL, Alcohol de 90 °GL, Agar YPD Broth, Agar nutritivo, 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.

2.8.1.1.Procedimiento

- Pesar el medio Agar YPD (70 g) y el metabisulfito de sodio (0.15 g) de potasio en una balanza analítica Mettler Toledo NewClassic MF ML204/01 y colocarlos en el papel aluminio.
- Colocar en el frasco Boeco de 1000 ml, 500 ml de agua destilada y calentarla sobre la estufa magnética a 350 °C.
- Introducir en el frasco Boeco el agitador magnético y ajustarlo con la perilla específica de la estufa magnética Mettler Toledo, hasta que presente un movimiento constante.
- Colocar el medio Agar YPD con la ayuda de la espátula en el frasco Boeco paulatinamente esperando que este se disuelva, y aforar el volumen a 1000 ml.
- Calentar el medio hasta que este cambie su color a un tono translucido.
- Retirar el frasco con la ayuda de los guantes de calor y auto-clavar a 121°C.
- Bajo cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2 dispensar en cajas petri, antes de la solidificación total del medio añadir concentraciones de 8%, 10%, 12% de alcohol al 96°GL.
- Sembrar la muestra de cultivo es por agotamiento de estrías.
- Sembrar las cepas en el medio Agar YPD con diferentes concentraciones de alcohol, estas cepas a sembrar son las cepas con un control positivo luego de la siembra en medio lisina con Lactato de sodio.
- Colocar en un cooler estéril las cajas petri inoculadas a temperatura estimada de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Realizar el control de cada una de las cajas a las 24 y 48 horas luego de la siembra.

2.9. Tinción vital de células de levadura (Análisis de viabilidad de cepas)

2.9.1. Materiales, Reactivos

Asas de microbiología, cajas petri de 4 cuadrantes, toallas desechables, parafilm, frasco Boeco de 500 ml, micropipetas de 100 a 1000 μ l, puntas de micropipeta, mechero de Bunsen, vaso de precipitación de 500 ml. marcador permanente, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula; Alcohol de 70°GL, agua destilada, azul de lactofenol; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2; Porta y cubre objetos, azul de lactofenol.

2.9.1.1. Procedimiento

- Tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad de colonias (dos a tres UFC) en medio sólido y transferirlo a un volumen de agua de 5 ml.
- Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea.
- Teñir con azul de lactofenol la suspensión agregando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto.
- Lavar la cámara de Neubauer y la laminilla con agua destilada y alcohol 96%
- Tomar con una micro pipeta 1000 μ l de la suspensión
- Poner la punta del micro pipeta en una de las dos ranuras de la cámara y por capilaridad, las levaduras se distribuirán en la cámara
- Fijar la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica
- Colocar la muestra teñida la microscopio y observar el prepara a un aumento de 40x
- Esperar tres minutos antes de contar para que las levaduras se dispersen de forma adecuada en la cámara.

2.10. Identificación bioquímica de cepas

2.10.1. Materiales, 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, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, agitador magnético, cooler, guantes de calor, espátula, Pruebas Remel; Alcohol de 70°GL, agua destilada, YPD Broth, agar nutritivo; 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

El medio Agar YPD Broth se preparará para la revitalización de las cepas seleccionadas a partir del crecimiento positivo en medios selectivos

2.10.1.1. Procedimiento mediante pruebas RapID Yeast Plus REMEL (Remel, 2005).

Las pruebas usadas en el sistema RapID™ Yeast Plus se basan en la degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. Los reactivos utilizados son una combinación de pruebas convencionales y pruebas cromogénicas de monosustrato.

2.10.1.1.1. Preparación del inóculo

- Cultivar los microorganismos en estudio en un medio de cultivo puro y examinarse con la tinción de Gram o medio húmedo antes de usarlos en el sistema.
- Utilizar medio Agar Sabouraud dextrosa (SDA).
- Suspender suficiente crecimiento de cultivo en la placa de agar en el líquido de inoculación RapID™ con una torunda de algodón o un asa de inoculación, con un volumen de 2 ml para conseguir una turbidez visual como la indicada en notas, con ayuda de la tarjeta de inoculación RapID™ Yeast Plus.

- Inocular otra placa de agar para comprobar la pureza y cualquier otro estudio adicional que pueda ser necesario, usando un asa llena de la suspensión de prueba del tubo de líquido de inoculación. Incubar la placa durante un periodo de 24 a 72 horas a una temperatura de 30°C.

2.10.1.1.2. Inoculación de los paneles RapID™ Yeast Plus

- 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.
- Volver a sellar el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición original.
- Añadir la suspensión de prueba, y mientras se mantiene el panel sobre una superficie nivelada, incline el panel hacia el lado contrario a los pocillos de reacción, aproximadamente en un ángulo de 45°.
- Mecer suavemente panel de lado a lado para descubrir homogéneamente el inóculo a lo largo de las depresiones posteriores.
- Mantener en posición horizontal nivelada (que se consigue usando la parte superior de la mesa de trabajo contra el fondo de los pocillos), debe inclinarse lentamente el panel hacia delante, hacia los pocillos de reacción hasta que el inóculo fluya a lo largo de las depresiones de los pocillos de reacción. De esta manera todo el inóculo de la parte posterior del panel será evacuado.
- Devolver 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.

2.10.1.1.3. Incubación de los paneles RapID™ Yeast Plus

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

2.10.1.1.4. Puntuación de los paneles RapID™ Yeast Plus

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.

- Retirar la tapa que cubre los pocillos de reacción., mientras se sujeta finamente el panel RapID™ Yeast Plus sobre la mesa.
- 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 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).
- Añadir el reactivo RapID™ Yeast Plus B, esperar al menos 30 segundos pero no más de un minuto para que se desarrolle el color.
- Leer y puntuar los pocillos de prueba de izquierda a derecha usando la guía de interpretación. Anotar las puntuaciones en los recuadros correspondientes del formulario de resultados.
- Consultar el microcódigo obtenido en el formulario de resultados del Compendio de códigos RapID™ Yeast Plus o ERIC® (Compendio electrónico RapID™) para la identificación.

2.11. Conservación en el cepario por el método Criobank (MAST, 2004)

2.11.1. Materiales, Reactivos

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, papel aluminio, fósforos, papel absorbente, caja de 64 pequeños frascos plásticos de 2 ml, cada uno con 1 ml de solución de criopreservativo hipertónico cubriendo aproximadamente 25 rosarios de cristal a los cuales los microorganismos pueden adherirse, vaso de precipitación de 500 ml, azas de microbiología; Alcohol de 70°GL, cultivos de levaduras establecidos en cajas petri; Cámara de flujo laminar Labculture® Horizontal Laminar Flow Cabinet LHC-4C2.

Autoclave horizontal TUTTNAUER AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER 3870M,
Criopreservador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC C340 – 86.

2.11.1.1. Almacenamiento de un microorganismo

- Etiquetar el código para el microorganismo en el área blanca para marcado, área impresa en el frasco, con la ayuda de un marcador permanente
- Retirar una muestra concentrada y disolverla en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK, a partir de una placa que contenga un cultivo fresco (de no más de 18 horas).
- Inocular asépticamente el tubo de Cryobank con colonias de un cultivo puro de una densidad equivalente a McFarland 3 o 4 estándares
- Sustituir el tapón y mezclar cuidadosamente invirtiendo el tubo para distribuir completamente el microorganismo. Esto permitirá que las bacterias se adhieran a las perlas.
- Sacar tanto fluido del criopreservativo como sea posible con una pipeta estéril y volver a cerrar el tubo
- Almacenar el tubo del Cryobank inoculado en un congelador adecuado entre -60 y -80°C. Algunos microorganismos pueden ser almacenados hasta un máximo de -20°C.

2.11.1.2. Procedimiento

- Sacar el tubo de Cryobank del congelador. No dejar que el frasco se derrita. Si varios tubos son sacados al mismo tiempo, el derretimiento de ser prevenido mediante el uso de Mast Cryoblock (CRYO/Z).
- Abrir el frasco y quitar un rosario insertando una aguja estéril a través de un agujero o usando un fórceps estéril.
- Colocar el abalorio o cuenta en un líquido adecuado o vetado inmediatamente sobre la superficie de un medio sólido adecuado e incubado bajo condiciones adecuadas.
- Desechar el rosario de modo seguro, en la manera recomendada para el material contaminado.
- Cerrar el vial y devolverlo al congelador tan pronto como sea posible

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Aislamiento y codificación

El aislamiento de cepas para la obtención de cultivos puros se los realizó conforme a la metodología descrita por medio de agotamiento de estrías.

3.1.1. Codificación de cepas obtenidas por el método de prefermentación

Tabla 14

Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías y su codificación

Código	Fermentación	Lugar	Código	Fermentación	Lugar
C001/4/F	x	Cayambe	C011/4/F	x	Cayambe
C002/2/F	x	Cayambe	C012/3/F	x	Cayambe
C003/2/F	x	Cayambe	C013/2/F	x	Cayambe
C004/2/F	x	Cayambe	C014/2/F	x	Cayambe
C005/2/F	x	Cayambe	C015/2/F	x	Cayambe
C006/3/F	x	Cayambe	C016/2/F	x	Cayambe
C007/3/F	x	Cayambe	C017/2/F	x	Cayambe
C008/3/F	x	Cayambe	C018/2/F	x	Cayambe
C009/3/F	x	Cayambe	C117/5/F	x	Cayambe
C010/2/F	x	Cayambe			

Nota: Codificación de cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.1.2. Codificación de cepas obtenidas por el método de dilución

Tabla 15

Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías y su codificación.

Código	Dilución	Lugar	Código	Dilución	Lugar	Código	Dilución	Lugar
C001/3/D	x	Cayambe	C012 2 D	x	Cayambe	C024 2 D	x	Cayambe
C002/2/D	x	Cayambe	C013 2 D	x	Cayambe	C100 3 D	x	Cayambe
C003 2 D	x	Cayambe	C014 2 D	x	Cayambe	C114 4 D	x	Cayambe
C004 2 D	x	Cayambe	C015 2 D	x	Cayambe	C115 4 D	x	Cayambe
C005 2 D	x	Cayambe	C016 2 D	x	Cayambe	C116 4 D	x	Cayambe
C006 2 D	x	Cayambe	C017 2 D	x	Cayambe	C118 2 D	x	Cayambe
C007 2 D	x	Cayambe	C018 2 D	x	Cayambe	C119 2 D	x	Cayambe
C008 2 D	x	Cayambe	C019 2 D	x	Cayambe	C120 2 D	x	Cayambe
C009 3 D	x	Cayambe	C020 2 D	x	Cayambe	C121 2 D	x	Cayambe
C010 2 D	x	Cayambe	C021 3 D	x	Cayambe	C122 2 D	x	Cayambe
C011 2 D	x	Cayambe	C022 3 D	x	Cayambe	C123 2 D	x	Cayambe

Nota: Codificación de cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.1.3. Aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación

El método de prefermentación establece fermentaciones espontáneas con el fin de inducir el desarrollo de levaduras nativas. A partir de estas fermentaciones y su aislamiento en medio Agar YPD se obtuvieron 19 cepas que se las consideró endémicas, las cuales fueron codificadas conforme el número de siembras necesarias para su aislamiento. El número de cepas obtenidas es similar con la investigación realizada por Vallejo, Rodríguez y Rollán (2013), en la cual en frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum*) de la variedad Misty, se aislaron 24 cepas de levaduras presentes en etapas prefermentativas (pág. 39).

3.1.3.1. Control de crecimiento por el método de prefermentación

Tabla 16.

Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías, porcentaje de crecimiento y control presencia – ausencia de colonias

Obtención de cultivos puros en medio Agar YPD									
Código	24 h	%	48 h	%	Código	24 h	%	48 h	%
C001/4/F	+	5,26	+	-	C011/4/F	-	0	+	5,26
C002/2/F	+	5,26	+	-	C012/3/F	+	5,26	+	-
C003/2/F	+	5,26	+	-	C013/2/F	+	5,26	+	-
C004/2/F	+	5,26	+	-	C014/2/F	+	5,26	+	-
C005/2/F	-	0	+	5,26	C015/2/F	+	5,26	+	-
C006/3/F	-	0	+	5,26	C016/2/F	+	5,26	+	-
C007/3/F	-	0	+	5,26	C017/2/F	-	0	+	5,26
C008/3/F	-	0	+	5,26	C018/2/F	+	5,26	+	-
C009/3/F	-	0	+	5,26	C117/5/F	-	0	+	5,26
C010/2/F	+	5,26	+	-					
%: Porcentaje de crecimiento; Porcentaje de crecimiento en 24 horas de las 11 cepas que presentaron crecimiento positivo: 57,89%. Porcentaje de crecimiento en 48 horas de las 8 cepas restantes: 42,11%									

Nota: Obtención de cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías en el método de prefermentación.

Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 16, ilustran las 19 cepas aisladas que desarrollaron crecimiento positivo en medio Agar YPD en diferentes etapas. De las cuales 11 cepas que representan 57,89% del total de cepas aisladas crecieron en un período de 24 horas, siendo las condiciones para el crecimiento de la cepas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH: 3.58) las cepas C001/4/F y C016/2/F, presentan colonias bien desarrolladas con relación a las 9 cepas con crecimiento positivo en el primer período de control, lo que representa un crecimiento óptimo de las cepas en un 18,18%. Las características de crecimiento de estas colonias (blancas, cremosas y glabras) pueden establecer a estas cepas en los géneros *Saccharomyces* y *Candida*, los autores Bial & Aréstegui (2002), establecen que, el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida* en agar glucosado de Sabouraud durante 2 días a 24°C , establecen características morfológicas similares (pág. 39).

En la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se observa crecimiento de las cepas restantes, siendo la cepa C009/3/F la que presentó mejores características macroscópicas, lo que representa el 5,26%, con características de crecimiento similares a las cepas C001/4/F y C016/2/F, lo que permite colocar a esta cepa en los géneros *Saccharomyces* y *Candida*. Las cepas que presentan crecimiento en un periodo de 48 horas representan el 42,11% de las cepas, esta diferencia de crecimiento puede ser atribuida a las condiciones de crecimiento en cuanto a la temperatura y pH del medio. En la tabla 16 se presentan los resultados y porcentaje de crecimiento a las 24 horas y 48 horas de control.

Esta variabilidad en el tiempo de crecimiento de las cepas se le atribuye a un proceso de adaptación de las levaduras al medio y a las condiciones de crecimiento en cuanto al pH, ya que no se establecen condiciones específicas para el crecimiento en condiciones óptimas para cada cepa; este resultado se corrobora en los estudios realizados por Fleet, (1999, pág. 110) y Rousseau & Doneche (2001, pág. 79), quienes sostienen que las condiciones de crecimiento influyen en el desarrollo de cada una de las especies de levaduras, el pH en valores menores a 3,0 y cercanos a 6,0 en un proceso de crecimiento y proceso fermentativo, se presenta el fenómeno de la inhibición, el cual se fundamenta en el efecto que el pH tiene sobre los centros activos de las enzimas. Estos centros presentan actividad en un determinado estado de ionización y este estado varía en función del pH del medio. Este fenómeno puede interpretarse por el importante efecto que el pH del medio tiene sobre la estructura y la permeabilidad de la membrana plasmática (Toro, Girón, Torija, & Cámara, 1999, pág. 380).

3.1.4. Aislamiento y control de crecimiento por el método de dilución

El método de dilución establece procesos de exosmosis, fenómeno por el cual migran nutrientes del interior al exterior de la fruta proporcionando sustancias nutritivas a la microbiota periférica de la baya. A partir de las diluciones generadas y su aislamiento en medio Agar YPD se obtuvieron 33 cepas que se las consideró endémicas, las cuales fueron codificadas conforme el número de siembras necesarias para su aislamiento.

El número de cepas obtenidas es similar con la investigación realizada por Bernardi (2013), en condiciones similares a la metodología utilizada, en la cual en frutos de uva (*Vitis vinifera*) de la variedad Malbec, se aislaron 49 cepas de levaduras presentes en etapas exosmosis (pág. 23).

Estos resultados comparables demuestran la veracidad de su fundamento y confiabilidad de los resultados obtenidos en la investigación, lo que hace de esta investigación de relevancia científica y por tanto reproducible.

3.1.4.1. Porcentaje de crecimiento

Tabla 17.

Cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías, porcentaje de crecimiento y control presencia – ausencia de colonias

Código	24 h	%	48 h	%	Código	24 h	%	48 h	%
C001/3/D	+	3,03	+	-	C018/2/D	-	0	+	3,03
C002/2/D	-	0	+	3,03	C019/2/D	-	0	+	3,03
C003/2/D	-	0	+	3,03	C020/2/D	-	0	+	3,03
C004/2/D	+	3,03	+	-	C021/3/D	-	0	+	3,03
C005/2/D	-	0	+	3,03	C022/3/D	+	3,03	+	-
C006/2/D	-	0	+	3,03	C024/2/D	+	3,03	+	-
C007/2/D	-	0	+	3,03	C100/3/D	-	0	+	3,03
C008/2/D	-	0	+	3,03	C114/4/D	-	0	+	3,03
C009/3/D	-	0	+	3,03	C115/4/D	-	0	+	3,03
C010/2/D *	-	0	-	0	C116/4/D	-	0	+	3,03
C011/2/D	-	0	+	3,03	C118/2/D	+	3,03	+	-
C012/2/D	-	0	+	3,03	C119/2/D	-	0	+	3,03
C013/2/D	-	0	+	3,03	C120/2/D	-	0	+	3,03
C014/2/D	+	3,03	+	-	C121/2/D	+	3,03	+	-
C015/2/D	+	3,03	+	-	C122/2/D	-	0	+	3,03
C016/2/D	+	3,03	+	-	C123/2/D	-	0	+	3,03
C017/2/D	+	3,03	+	-					
%: Porcentaje de crecimiento; Porcentaje de crecimiento en 24 horas de las 10 cepas que presentaron crecimiento positivo: 30,33%. Porcentaje de crecimiento en 48 horas de las 8 cepas restantes: 66,66%. *: cepa sin crecimiento									

Nota: Obtención de cultivos puros obtenidos por agotamiento de estrías en el método de dilución.

Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 17, ilustra las 33 cepas aisladas, de las cuales 10 cepas que representan el 30,30% crecieron en un período de 24 horas, siendo las condiciones para el crecimiento de las cepas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH: 3.58); la cepa C022/3/D, presenta colonias claras y de óptimo crecimiento en las primeras 24 horas, que representa el 3,03%. El 27,27% de cepas que presentan crecimiento positivo en el primer período presentan colonias pequeñas o un crecimiento positivo leve. La cepa C022/3/D, presenta colonias blancas, cremosas y glabras lo que ubica a esta cepa en los géneros *Saccharomyces* o *Candida*, lo que puede ser confirmado Linares & Solís, (2011), quienes reportan que tras incubación a 28°C durante 3-4 días, las colonias del género *Saccharomyces* y *Candida* desarrollan una coloración blanca, cremosa sin proyecciones a manera de hifas, de margen redondeado (pág. 1).

En la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se observa crecimiento de 22 cepas que representan el 66,66% de cepas aisladas (Ver tabla 18 y Figura 8), la cepa C009/3/D, presenta características óptimas en su crecimiento, presentando colonias numerosas, pequeñas, cremosas y circulares, estas características aunque encajan en la descripción de las colonias de *Saccharomyces* y *Candida* dada por Linares y Solís (2011, pág. 1), la cepa C009/3/D, posee un aroma característico y penetrante que no se presenta en la cepa C022/3/D a la cual se la ha ubicado dentro de los géneros mencionados, el aroma de la colonia C009/3/D se lo identifica como un olor medicinal, siendo el género *Brettanomyces*, el que corresponde tanto a la descripción macroscópica, como al aroma característico desprendido. Estas características son corroboradas en el trabajo de Vásquez (2009), en la cual se identifica a *Brettanomyces*, como colonias pequeñas, lisas, cremosas de olor medicinal, tempera y animal (pág. 19).

La cepa correspondiente a la codificación C010/2/D, no presenta crecimiento desde la primera etapa de aislamiento en medio Agar YPD, aunque esta presenta crecimiento en la primera caja Petri previo a la obtención de cultivo puro. La ausencia de crecimiento se puede justificar haciendo énfasis en la ecología de las levaduras cuyos requerimientos suelen ser muy puntuales como es el caso del pH, como ya se mencionó en el Control de crecimiento por el método de prefermentación sustentado por Toro, Girón, Torija & Cámara, (1999, pág. 380), o requieren de otras especies para su

crecimiento, de este condicionante surge el término “Flor”, siendo este el conjunto de levaduras responsable de la crianza biológica de los vinos, de acuerdo con Gallego, (2012, pág. 155). El término también se refiere al velo que se desarrolla en la superficie del vino de forma espontánea, a modo de capa flotante de color blanco grisáceo, generado por el conjunto de 4 levaduras pertenecientes principalmente al género *Saccharomyces*, y al no estar presente una de ellas no se producirán las mismas características al vino o mosto.

Tabla 18.
Porcentaje de crecimiento de las cepas puras

Control presencia – ausencia	Cepas	Porcentaje (%)
Crecimiento en 24 horas	10	30,30
Crecimiento en 48 horas	22	66,67
Sin crecimiento	1	3,03

Nota: Control presencia – ausencia de cepas y el porcentaje que representan

Elaborado por: Coronel, Daniel

Gráfica del porcentaje de crecimiento de cepas puras

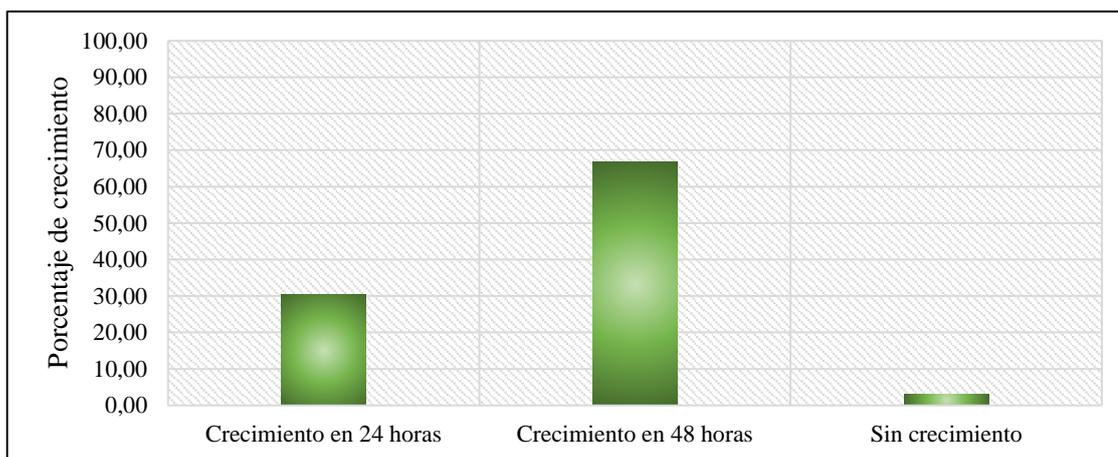


Figura 8. Representación gráfica del porcentaje de crecimiento de cepas puras, tras análisis presencia – ausencia de colonias

Elaborado por: Coronel, 2014

3.2. Aislamiento en medios selectivos

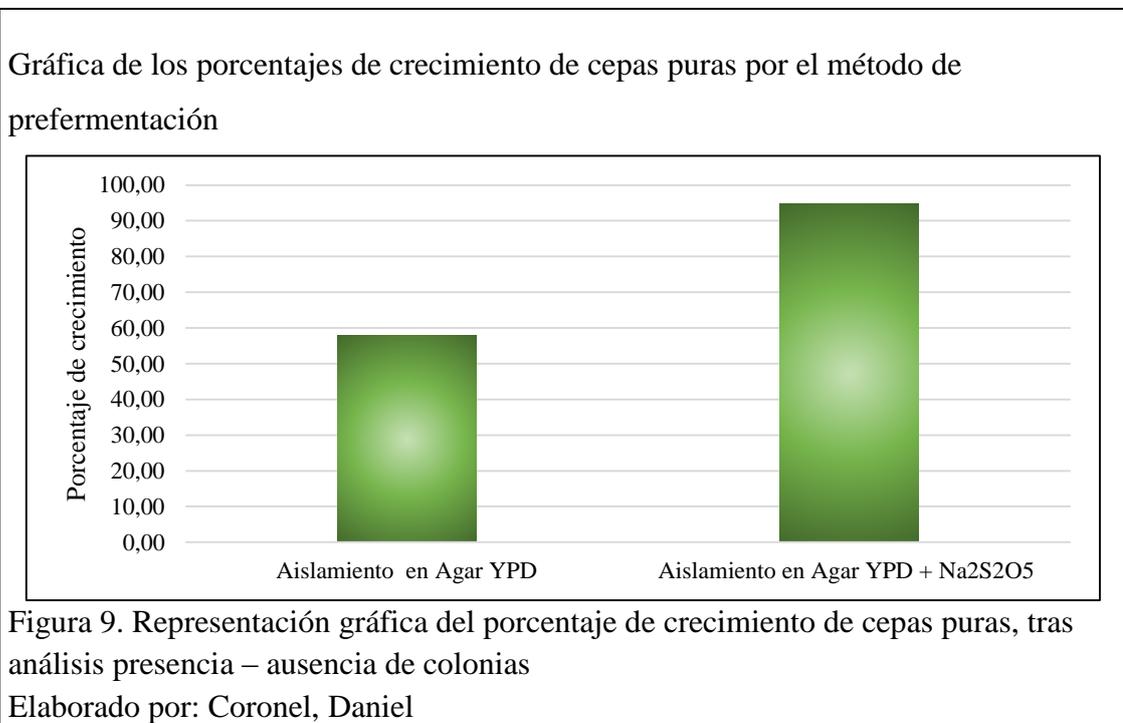
El aislamiento de cepas de levaduras en medios específicos puros se realizó conforme a la metodología descrita por medio de agotamiento de estrías.

3.2.1. Aislamiento y control de crecimiento en agar YPD con metabisulfito de sodio

3.2.1.1. Aislamiento y control de crecimiento presencia – ausencia por el método de prefermentación

Las 19 cepas aisladas, fueron sembradas en medio agar YPD adicionado con metabisulfito de sodio, de las cuales 18 cepas que representan 94,73% del total de cepas aisladas crecieron en un período de 24 horas, siendo las condiciones para el crecimiento de las cepas ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, pH: 3.92).

El porcentaje de crecimiento dado en el aislamiento en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio es comparable con el primer aislamiento en medio Agar YPD sin conservante, siendo los porcentajes de 94,73% y 57,89% respectivamente.



Como se observa en la figura 9, la diferencia en el crecimiento se puede atribuir a la adaptación de las cepas al medio de cultivo, en el primer aislamiento se parte de cultivos mixtos en el cual existe una clara competencia por nutrientes, lo que limita el crecimiento de las levaduras, por lo cual al ser transferido a cultivos puros su adaptación será lenta, lo que influye directamente en el crecimiento de las colonias; lo que no se puede apreciar en el segundo aislamiento, en el cual, se parte de un cultivo puro, donde ya se ha eliminado la competencia, de esta manera la adaptabilidad de la cepa es mucho más rápida. Esta apreciación es corroborada en la investigación de Ramírez *et al.*, (2014), quien sostiene que, las levaduras actuarían en el comienzo de la fermentación alcohólica en clara competencia por los nutrientes con otras las levaduras, esta interacción entre colonias limita el crecimiento de las diversas levaduras presentes en el medio (pág.1352).

Las cepas C001/4/F, C016/2/F y C009/3/F presentan colonias bien desarrolladas con relación a las otras 15 cepas con crecimiento positivo en el primer período de control, lo que representa un crecimiento óptimo de las cepas en un 18,18%, siendo este porcentaje y las características morfológicas de las colonias iguales a lo obtenido en el primer aislamiento.

En la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se presenta contaminación por hongos en la cepa C018/2/F, pese a la realización de resiembras a partir del primer aislamiento la cepa no pudo ser recuperada por lo que se consideró como cepa perdida.

Tabla 19.

Cultivo de cepas en Agar YPD + Na₂S₂O₅ y control presencia – ausencia de crecimiento

Código	24 h	48 h	Código	24 h	48 h
C001/4/F	+	+	C011/4/F	+	+
C002/2/F	+	+	C012/3/F	+	+
C003/2/F	+	+	C013/2/F	+	+
C004/2/F	+	+	C014/2/F	+	+
C005/2/F	+	+	C015/2/F	+	+
C006/3/F	+	+	C016/2/F	+	+
C007/3/F	+	+	C017/2/F	+	+
C008/3/F	+	+	C018/2/F	+	Perdida
C009/3/F	+	+	C117/5/F	+	+
C010/2/F	-	-			

Nota: Control de crecimiento de las cepas aisladas por prefermentación

Elaborado por: Coronel, Daniel

La metodología utilizada en la investigación basada en los estudios de Kish, Sharf, & Margalith, (1983), establece una concentración de 0,15 g/L de metabisulfito de sodio para la inhibición de hongos y bacterias en los procesos de aislamiento de levaduras, (pág. 178), sin embargo esta concentración es baja conforme a los estudios de Guillem (2005), en la cual el uso de metabisulfito de sodio en medio agar YPD, inhibe el crecimiento de bacterias y hongos, a concentraciones de 0,2 a 0,5 g/L (pág, 105), este rango de concentración es útil para evitar el crecimiento de hongos contaminantes, algunos pertenecientes a especies de mucorales, hongos propios del ambiente como es el caso de *Aspergillus*, hongo identificado en el cultivo C018/2/F, por sus características morfológicas siendo estas de textura algodonosa, de coloración negra, con presencia de esporulación, características similares con las descritas por Sáez, Flórez y Cadavid (2012): cabezas conidiales de tono negro, esporulada, de estriación longitudinal marcada, de textura algodonosa (pág. 37) y fotografía de Cannon (2014).

Comparación morfológica de hongo <i>Aspergillus niger</i>		
CODIGO	D. MACROSCOPICA	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C018/2/F <i>Aspergillus niger</i>	 (Coronel, 2014)	 (Cannon, 2014)

Figura 10: Comparación morfológica de hongo generado en el cultivo C018/2/F
Elaborado por: Coronel, Daniel

3.2.1.2. Aislamiento y control de crecimiento presencia – ausencia por el método de dilución.

Tabla 20.

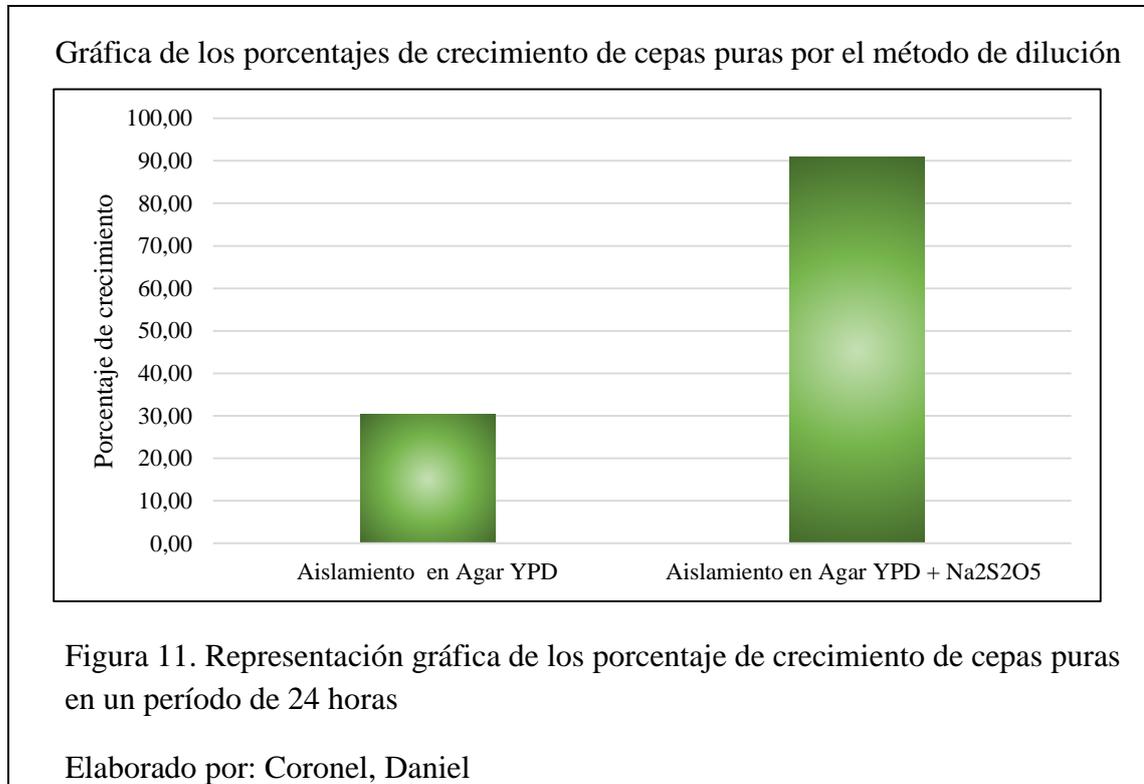
Cultivo de cepas en Agar YPD + Na₂S₂O₅ y control presencia – ausencia de colonias

Código	24 h	48 h	Código	24 h	48 h	Código	24 h	48 h
C001/3/D	+	+	C012/2/D	+	+	C024/2/D	+	+
C002/2/D	+	+	C013/2/D	+	+	C100/3/D	+	+ cont
C003/2/D	+	+	C014/2/D	-	- cont	C114/4/D	+	+
C004/2/D	+	+	C015/2/D	+	+	C115/4/D	+	+
C005/2/D	+	+	C016/2/D	+	+	C116/4/D	+	+
C006/2/D	+	+	C017/2/D	-	-	C118/2/D	+	+
C007/2/D	+	+	C018/2/D	+	+ cont	C119/2/D	+	+
C008/2/D	+	+	C019/2/D	+	+	C120/2/D	+	+
C009/3/D	+	+	C020/2/D	+	+ cont	C121/2/D	+	+
C010/2/D	-	-	C021/3/D	+	+	C122/2/D	+	+
C011/2/D	+	+	C022/3/D	+	+	C123/2/D	+	+

Nota: Coronel, 2014

La tabla 20, ilustra las 33 cepas aisladas, las cuales fueron sembradas en medio agar YPD adicionado con metabisulfito de sodio, en el cual se presenta crecimiento positivo a las 24 horas de 30 cepas que representan 90,90% del total de cepas aisladas; siendo las condiciones para el crecimiento de las cepas (30 ± 2°C, pH: 3,92).

El porcentaje de crecimiento dado en el aislamiento en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio es comparable con el primer aislamiento en medio Agar YPD sin conservante, siendo los porcentajes de 90,90% y 30,30% respectivamente.



Esta diferencia en el crecimiento se puede atribuir al igual que en el aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación a la adaptación de las cepas al medio de cultivo, apreciación corroborada por Ramírez (2014), quien sostiene que, las levaduras actuarían en el comienzo de la fermentación alcohólica en clara competencia por los nutrientes con otras las levaduras, esta interacción entre colonias limita el crecimiento de las diversas levaduras presentes en un medio mixto, y al pasar a cultivos puros estos pasaran por un periodo de adaptación el cual será lento (pág., 1352).

Las cepas C009/3/D y C022/3/D presentan colonias bien desarrolladas con relación a las otras 31 cepas con crecimiento positivo en el primer período de control, lo que representa un crecimiento óptimo de las cepas en un 6,06%, las características morfológicas de las colonias son iguales a lo obtenido en el primer aislamiento.

En la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se presenta contaminación en las cepas C018/2/D, C020/2/D, C100/3/D; (9,09% de contaminación); sin embargo a partir de resiembras tomadas desde el primer aislamiento la cepas fueron recuperadas.

La contaminación presentada en las cepas C018/2/D, C020/2/D, C100/3/D; se atribuye a hongos propios del suelo cuyas esporas se encuentran en el ambiente como es el caso de *Aspergillus*, desarrollándose este bajo las mismas características presentadas en la cepa C018/2/F en el aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación, por lo cual la presencia de contaminación en estas colonias se le atribuye a la misma razón en cuanto a la concentración de metabisulfito de sodio la cual fue de 0,15 g/L, siendo la concentración para inhibición de bacterias y hongos de 0,2 a 0,5 g/L (Guillem, 2005, pág. 105).

3.3. Identificación macroscópica y microscópica

3.3.1. Identificación macroscópica por el método de prefermentación

La identificación macroscópica de las 18 cepas aisladas en medio Agar YPD + Na₂S₂O₅, según los criterios de caracterización se establece que el 50% de las cepas aisladas poseen una elevación convexa, el 77,78% posee una forma circular, el 88,89% posee margen entero, y el color crema representa el 66,67% del total de cepas aisladas.

Tabla 21.
Criterios de identificación macroscópica de las cepas aisladas por el método de prefermentación

Elevación	Cant	%	Forma	Cant	%
Plana	4	22,22	Circular	14	77,78
Convexa	9	50	Filamentosa	1	5,56
Pulvinada	5	27,78	Puntiforme	2	11,11
			Irregular	1	5,56
Margen	Cant	%	Color	Cant	%
Entero	16	88,89	Salmón	5	27,78
Ondulado	1	5,56	Crema	12	66,67
Filamentoso	1	5,56	Beige	1	5,56

Nota: Criterios de identificación establecidos por la elevación, margen, forma y color de las colonias

Elaborado por: Coronel, Daniel

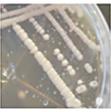
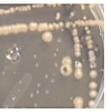
Morfologías representativas presentes en las cepas aisladas por el método de prefermentación								
	Caracterización			Caracterización			Caracterización	
	Elevación	Convexa		Elevación	Convexa		Elevación	Convexa
	Forma	Circular		Forma	Circular		Forma	Circular
	Margen	Entero		Margen	Entero		Margen	Entero
	Color	Crema		Color	Crema		Color	Crema
	Caracterización			Caracterización			Caracterización	
	Elevación	Convexa		Elevación	Plana		Elevación	Pulvinada
	Forma	Circular		Forma	Filamentosa		Forma	Circular
	Margen	Entero		Margen	Filamentosa		Margen	Entero
	Color	Salmón		Color	Salmón		Color	Crema

Figura 12. Gráficas que ilustran la caracterización morfológica representativa en las cepas aisladas

Elaborado por: (Coronel, Daniel)

Bajo estas consideraciones se realizó comparaciones morfológicas entre las levaduras aisladas y las fotos bibliográficas a razón de tener una posible cepa, se presentaron a continuación 3 cepas de las 18 aisladas, cepas que presentaron crecimiento óptimo en las cuales la morfología presentada es característica de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Candida*.

La tabla 22, ilustra la morfología de las colonias tomada tras el aislamiento de la cepa C001/4/F, son colonias blancas, cremosas y glabras con un diámetro de 2 mm, dicha descripción corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, (Dumitru, 2011), describe las colonias *Saccharomyces cerevisiae* como cremosas, redondeadas y de coloración blanca, lo que coincide con la descripción de la cepa C001/4/F (pág. 473).

Tabla 22.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MACROSCOPICA	CARACTERIZACIÓN	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C001/4/F <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	 (Coronel, 2014)	ELEVACION:	Convexa
		FORMA:	Circular
		MARGEN:	Entero
		COLOR:	Crema
		TAMAÑO:	2 mm
			 (Dumitru, 2011)

Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de

Elaborado por: Coronel, Daniel

Tabla 23.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MACROSCOPICA	CARACTERIZACIÓN	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C016/2/F <i>Candida</i>	 (Coronel, 2014)	ELEVACION:	Convexa
		FORMA:	Circular
		MARGEN:	Entero
		COLOR:	Crema
		TAMAÑO:	3 mm
			 (Toivola, 1984)

Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de

Elaborado por: Coronel, Daniel

Tabla 24.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MACROSCOPICA	CARACTERIZACIÓN	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C009/3/F <i>Candida</i>	 (Coronel, 2014)	ELEVACION:	Plana
		FORMA:	Irregular
		MARGEN:	Entero
		COLOR:	Salmón
		TAMAÑO:	1 mm
			 (Agarwal, Manchanda, & Verma, 2011)

Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de

Elaborado por: Coronel, Daniel

Las tablas 23 y 24 ilustran, la morfología de las colonias tomada tras el aislamiento de la cepa C016/2/F y C009/3/F, sus características son colonias blancas, cremosas y glabras con un diámetro de 3 mm y 1 mm respectivamente, dicha descripción corresponde a *Candida*, siendo esto corroborado por las descripciones y fotografías dadas por Toivola (1984, pág. 1221) y Agarwal, *et al.*, (2011, pág. 173), donde las colonias son de coloración blanca, cremosa y redondeada. Aunque estas características también pertenecen a cepas del género *Saccharomyces*, la diferencia entre estas radica en los primeros estados de crecimiento, en el cual el género *Saccharomyces*, presenta un borde irregular y de elevación convexa, y el género *Candida* presenta margen redondo o irregular y de elevación plana, con una coloración crema o rosada

dependiendo de la especie, características corroboradas en el estudio de Garzón y Hernández, (2009, pág. 106), estas características se presentan en la cepa C009/3/F.

3.3.2. Identificación macroscópica por el método de dilución

La identificación macroscópica de las 33 cepas aisladas en medio Agar YPD + Na₂S₂O₅, según los criterios de caracterización se establece que el 48,48% de las cepas aisladas poseen una elevación convexa, el 48,48% posee una forma circular, el 51,52% posee margen entero, el color crema de las colonias representa el 30,30% del total de cepas aisladas.

Tabla 25
Criterios de identificación macroscópica de las cepas aisladas por el método de dilución

Elevación	Cant	%	Forma	Cant	%
Plana	13	39,39	Circular	16	48,48
Convexa	16	48,48	Fusiforme	2	6,06
Pulvinada	1	3,03	Puntiforme	4	12,12
Acuminada	1	3,03	Irregular	11	33,33
Elevada	2	6,06			
Margen	Cant	%	Color	Cant	%
Entero	17	51,52	Salmón	6	18,18
Ondulado	11	33,33	Crema	10	30,3
Lobulado	2	6,06	Beige	9	27,27
Rizoide	1	3,03	Blanco	7	21,21
Erosionado	2	6,06	Naranja	1	3,03

Nota: Criterios de identificación establecidos por la elevación, margen, forma y color de las colonias
Elaborado por: Coronel, Daniel

Bajo estas consideraciones se realizó comparaciones morfológicas entre las levaduras aisladas y las fotos bibliográficas a razón de tener una posible cepa, se presentan a continuación 2 cepas de las 33 aisladas, cepas que presentaron el crecimiento más óptimo en las cuales la morfología presentada es característica de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Brettanomyces*.

La tabla 26 ilustra, la morfología de las colonias tomada tras el aislamiento de la cepa C022/3/D, presenta colonias blancas, cremosas y glabras con un diámetro de 3 mm, dicha descripción corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, morfológicamente esta cepa es igual a la cepa C001/4/F, obtenida por el aislamiento a través del método de prefermentación, por lo cual su morfología es corroborada por la descripción y fotografía dada por Dumitru (2011, pág. 473).

Tabla 26
Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MACROSCOPICA	CARACTERIZACIÓN	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C022/3/D <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		ELEVACION:	Convexa
		FORMA:	Circular
		MARGEN:	Redondeado
		COLOR:	Crema
		TAMAÑO:	3 mm
	(Coronel, 2014)		
			(Dumitru, 2011)

Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de
Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 27, ilustra la morfología de las colonias tomada tras el aislamiento de la cepa C009/3/D, son colonias blancas, cremosas y glabras con un diámetro de 3 mm, dicha descripción corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que la cepa C022/3/D, sin embargo, la cepa C009/3/D, presenta un aroma característico y penetrante, ya identificado en el primer aislamiento en medio Agar YPD, este olor medicinal separa a este cultivo del género *Saccharomyces*, Vásquez (2009), establece que, las especies pertenecientes al género *Brettanomyces*, pueden poseer características morfológicas similares a *Saccharomyces cerevisiae*, siendo una diferencia de identificación primaria su olor medicinal (pág. 19). Las características macroscópicas presentadas en la colonia C009/3/D son confirmadas por la descripción y fotografía dada por (Nagodawithana, 1974, pág. 387).

Tabla 27.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MACROSCOPICA	CARACTERIZACIÓN	D. MACROSCOPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA		FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C009/3/D <i>Brettanomyces</i>		ELEVACION:	Convexa
		FORMA:	Circular
		MARGEN:	Redondeada
		COLOR:	Crema
		TAMAÑO:	3 mm
	(Coronel, 2014)		
			(Nagodawithana, 1974)

Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de

Elaborado por: Coronel, Daniel

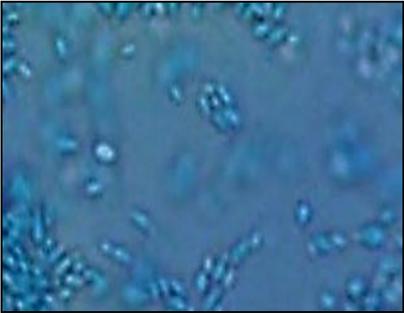
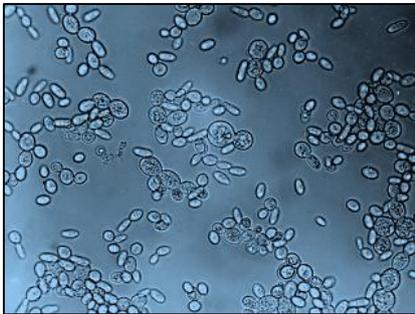
3.3.3. Identificación microscópica de cepas obtenidas por el método de fermentación

La identificación microscópica de las 18 cepas aisladas en medio Agar YPD + Na₂S₂O₅, establece células con características ovoideas o circulares con una coloración celeste o verde azulada por el uso de azul de lactofenol, a continuación se presentan las microscopias de las 3 cepas que presentaron crecimiento óptimo en las cuales la morfología presentada es característica de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Candida* confirmando la caracterización macroscópica realizada.

La tabla 28, ilustra la microfotografía tomada tras el aislamiento de la cepa C001/4/F, cuyas características son: células de 3.2 micras, ovoideas, levaduriformes la cual corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esto corroborado por la descripción dada por el manual de Merk (2000), y microscopia realizada por Dumitru (2011, pág. 473): 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo, son redondas y ovoideas, elipsoides, cilíndricas o filamentosas.

Tabla 28.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MICROSCÓPICA	D. MICROSCÓPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C001/4/F <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	 (Coronel, 2014)	 (Dumitru, 2011)

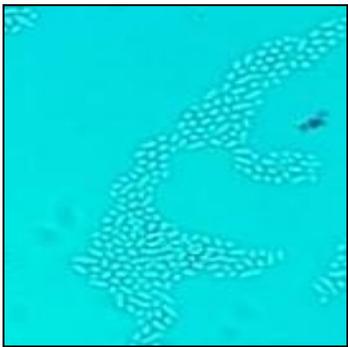
Nota: Identificación de colonias por la elevación, margen, forma, color y tamaño de

Elaborado por: Coronel, Daniel

Las tabla 29 y 30 ilustran, la microfotografía tomada tras el aislamiento de las cepas C016/2/F y C009/3/F cuyas características son: células ovoideas, alargadas, cilíndricas, de 3.2 micras la cual corresponde a *Candida*, siendo esto corroborado por la descripción dada por Cárdenas, (2006, pág. 51) y Toivola, (1984, pág. 121): células ovoideas, elongadas y cilíndricas, predominantemente pequeñas, (2.2-5.6 micras).

Tabla 29

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

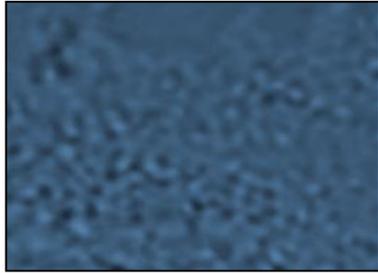
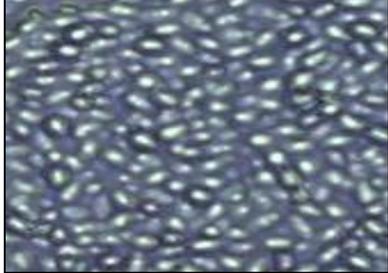
CODIGO	D. MICROSCÓPICA	D. MICROSCÓPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C016/2/F <i>Candida</i>	 (Coronel, 2014)	 (Toivola, 1984)

Nota: Identificación microscópica de células de levaduras por medio de tinción

Elaborado por: Coronel, Daniel

Tabla 30.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MICROSCÓPICA	D. MICROSCÓPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C009/3/F <i>Candida</i>	 (Coronel, 2014)	 (Agarwal, Manchanda, & Verma, 2011)

Nota: Identificación microscópica de células de levaduras por medio de tinción

Elaborado por: Coronel, Daniel

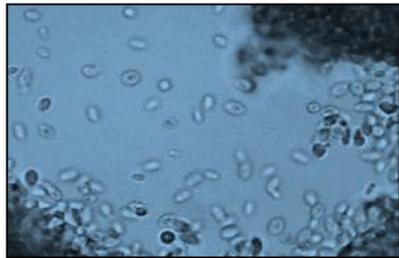
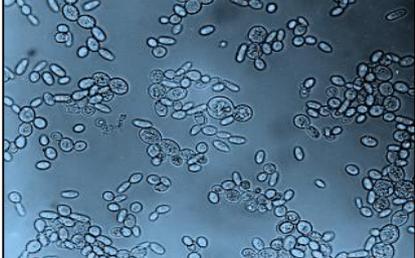
3.3.4. Identificación microscópica de cepas obtenidas por el método de dilución

La identificación microscópica de las 30 cepas aisladas en medio Agar YPD + Na₂S₂O₅, establece células de característica ovoidea o circular en una coloración celeste o verde azulada por el uso de azul de lactofenol.

La tabla 31 ilustra, la microfotografía tomada tras el aislamiento de la cepa C022/3/D, cuyas características son: células de 3.5 micras, ovoideas, levaduriformes, esta descripción es similar a la realizada en la cepa C001/4/F, y corroborada por Dumitru, (2011), lo que la identifica como *Saccharomyces cerevisiae* (pág. 473).

Tabla 31.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MICROSCÓPICA	D. MICROSCÓPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C022/3/D <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	 (Coronel, 2014)	 (Dumitru, 2011)

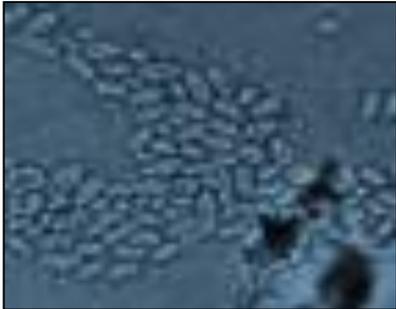
Nota: Identificación microscópica de células de levaduras por medio de tinción

Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 32, ilustra la microfotografía tomada tras el aislamiento de la cepa C009/3/D, cuyas características son: células ovaladas u ovoideas, pequeñas, con una medida menor a 2 micras, la cual corresponde a una descripción que puede corresponder a la cepa *Brettanomyces*, siendo esto ratificado por la descripción dada por Lopez, (2007, pág. 3), y Nagodawithana, (1974, pág. 387): forma ojival o cilíndrica, con gemación multipolar.

Tabla 32.

Comparación morfológica de levaduras aisladas en medio Agar YPD+Na₂S₂O₅

CODIGO	D. MICROSCÓPICA	D. MICROSCÓPICA
	FOTOGRAFÍA PRÁCTICA	FOTOGRAFÍA BIBLIOGRÁFICA
C009/3/D <i>Brettanomyces</i>	 <p>(Coronel, 2014)</p>	 <p>(Nagodawithana, 1974)</p>

Nota: Identificación microscópica de células de levaduras por medio de tinción

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.4. Aislamiento y control de crecimiento en medio Lisina con lactato de sodio

Las consideraciones que harán referencia al control de crecimiento por presencia – ausencia de colonias establecen la pertenencia o no al género *Saccharomyces*. El crecimiento positivo en el medio lisina con lactato de sodio indica que la levadura no pertenece al género *Saccharomyces*, por tanto la ausencia de colonias en este medio ubicará a las cepas dentro de este género.

3.4.1. Aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación

Las 18 cepas aisladas en medio agar YPD, fueron sembradas en medio lisina adicionado con lactato de sodio, de las cuales 15 cepas que representan 78,94% del total de cepas aisladas poseen crecimiento positivo indicando que son levaduras no-

Saccharomyces, bajo el sistema de evaluación de siembras triplicadas. Este resultado coincide con los obtenidos por Ortiz, (2013, pág. 49), en su estudio sobre viñedos, quien obtuvo el 74,00% del total de cepas aisladas con crecimiento positivo en medio Lisina, resultados similares a los obtenidos por Vallejo, Rodríguez y Rollán (2013), en su estudio sobre levaduras presentes en arándanos, en el cual se obtuvo el 82,00% de cepas con crecimiento positivo (pág. 39).

El 16,66% de las cepas aisladas no presentan crecimiento, lo que indica que pertenecen al género *Saccharomyces*, Las cepas C007/3/F; C008/3/F; C009/3/F, se las establecerá dentro de este género.

La cepa C001/4/F identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, posee crecimiento positivo en el medio lisina, lo que puede ser atribuido a compuestos nitrogenados presentes en el medio diferentes a la lisina, este medio de cultivo es selectivo para levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*, ya que el medio posee como única fuente de nitrógeno la lisina, sustancia nitrogenada que no puede ser degradada por levaduras del género *Saccharomyces* (Russo, 2011, pág. 24).

La cepa C009/3/F identificada dentro del género *Candida*, por sus características microscópicas y morfológicas de la colonia, no presentó crecimiento en el medio lisina, esto puede deberse a la adaptabilidad de la cepa al medio conforme las condiciones de pH, ya que el medio lisina posee un pH de 6.7, conforme a Toro, et al. (1999), a este rango de pH se puede presentar el fenómeno de la inhibición, afectando a la estructura y la permeabilidad de la membrana plasmática, limitando el crecimiento, por lo cual se procederá a la identificación bioquímica de esta cepa para establecer su género (pág. 380).

Tabla 33.

Cultivo de cepas en medio Lisina + C₃H₅O₃.Na y control presencia - ausencia

Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra	Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra
C001/4/F	+	+	+	C011/4/F	+	+	+
C002/2/F	+	+	+	C012/3/F	+	+	-
C003/2/F	+	+	+	C013/2/F	+	-	+
C004/2/F	+	+	+	C014/2/F	+	+	-
C005/2/F	+	+	+	C015/2/F	+	-	+
C006/3/F	+	+	+	C016/2/F	+	+	+
C007/3/F	-	-	-	C017/2/F	+	+	+
C008/3/F	-	-	+	C018/2/F	Perdida	Perdida	Perdida
C009/3/F	-	-	-	C117/5/F	+	+	+
C010/2/F	+	-	+				

Nota: Control presencia – ausencia en medio Lisina + C₃H₅O₃.Na

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.4.2. Aislamiento y control de crecimiento por el método de dilución

Las 33 cepas aisladas en medio agar YPD, fueron sembradas en medio lisina adicionado con lactato de sodio, de las cuales 30 cepas que representan 90,90% del total de cepas aisladas poseen crecimiento positivo indicando que son levaduras no-*Saccharomyces*. Al igual que las levaduras aisladas por el método de prefermentación, las levaduras no-*Saccharomyces*, presentan mayor porcentaje de crecimiento. Las cepas C010/2/D; C014/2/D; C017/2/D; representan el 9,09% de las cepas aisladas cuyo crecimiento negativo indica que estas son cepas del género *Saccharomyces*.

Tabla 34.

Cultivo de cepas en medio Lisina + C₃H₅O₃.Na y control presencia – ausencia

Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra	Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra
C001/3/D	+	+	+	C009/3/D	+	+	+
C002/2/D	+	+	+	C010/2/D	-	-	-
C003/2/D	+	+	+	C011/2/D	+	-	+
C004/2/D	+	+	+	C012/2/D	+	+	+
C005/2/D	+	+	+	C013/2/D	+	-	+
C006/2/D	+	-	+	C014/2/D	-	-	+
C007/2/D	+	+	+	C015/2/D	+	+	+
C008/2/D	+	+	+	C016/2/D	+	+	+

Tabla 34.

(Continuación) Cultivo de cepas en medio Lisina + C₃H₅O₃.Na y control presencia – ausencia

Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra	Código	1ra Siembra	2da Siembra	3ra Siembra
C017/2/D	-	-	+	C115/4/D	+	+	+
C018/2/D	+	+	+	C116/4/D	+	+	+
C019/2/D	+	+	+	C118/2/D	+	+	+
C020/2/D	+	+	+	C119/2/D	+	+	+
C021/3/D	+	+	+	C120/2/D	+	+	+
C022/3/D	+	+	+	C121/2/D	+	+	+
C024/2/D	+	+	+	C122/2/D	+	-	+
C100/3/D	+	+	+	C123/2/D	+	-	+
C114/4/D	+	+	+				

Nota: Control presencia – ausencia en medio Lisina + C₃H₅O₃.Na

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.5. Aislamiento y control de crecimiento en medio Agar YPD a diferentes concentraciones de etanol

3.5.1. Aislamiento y control de crecimiento por el método de prefermentación

Las 18 cepas aisladas que desarrollaron crecimiento positivo en medio Agar YPD, fueron sembradas en medio Agar YPD adicionando diferentes concentraciones del alcohol, de las cuales 2 cepas C001/4/F y C009/3/F que representan 10,52% del total de cepas aisladas presentan crecimiento positivo a las 24 horas en el medio con una concentración de 8,00% de alcohol. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Villar, (1992), quien menciona que las estirpes de *Candida* muestran una inhibición, por etanol al 10%, esto debido al efecto del alcohol sobre la funcionalidad de la ATP-asa de la membrana, inhibiendo el crecimiento o causando la muerte de la cepa (pág. 160). La estirpe de *Saccharomyces*, presenta una tasa de extrusión activa de protones, lo que influye en la membrana sobre la funcionalidad de la ATP-asa, haciendo a esta estirpe resistente a concentraciones de etanol mayores a 10,00%.

En la cepa C001/4/F, identificada como *Saccharomyces*, se esperó mayor resistencia alcohólica, sin embargo esta no presenta crecimiento en concentraciones de etanol

mayores a 8,00%, lo que se le puede atribuir a la inhibición no competitiva del transporte de nutrientes, por efecto de la interferencia del etanol con los procesos fisiológicos dependientes de membrana.

En la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se presentan los mismos resultados con lo cual se establece que el 84,00% de las cepas sembradas en agar YPD con etanol al 8% no poseen resistencia alcohólica. No se presenta crecimiento a las 24 horas en las 19 cepas a concentraciones de etanol del 10,00% y del 12,00%; en la segunda etapa de control correspondiente a las 48 horas se presentan los mismos resultados con lo cual se establece que las cepas sembradas en agar YPD con etanol al 10,00% y 12,00% no poseen resistencia alcohólica, Villar (1992), explica estos valores ya que el etanol afecta a las tasas específicas de crecimiento y fermentación máxima (pág. 160).

Tabla 35.
Cultivo de cepas en medio Agar YPD + Etanol y control de crecimiento

Código	8% EtOH		10% EtOH		12% EtOH	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
C001/4/F	+	+	-	-	-	-
C002/2/F	-	-	-	-	-	-
C003/2/F	-	-	-	-	-	-
C004/2/F	-	-	-	-	-	-
C005/2/F	-	-	-	-	-	-
C006/3/F	-	-	-	-	-	-
C007/3/F	-	-	-	-	-	-
C008/3/F	-	-	-	-	-	-
C009/3/F	+	+	-	-	-	-
C010/2/F	-	-	-	-	-	-
C011/4/F	-	-	-	-	-	-
C012/3/F	-	-	-	-	-	-
C013/2/F	-	-	-	-	-	-
C014/2/F	-	-	-	-	-	-
C015/2/F	-	-	-	-	-	-
C016/2/F	-	-	-	-	-	-
C017/2/F	-	-	-	-	-	-
C117/5/F	-	-	-	-	-	-

Nota: Control presencia – ausencia en medio Agar YPD + Etanol

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.5.2. Aislamiento y control de presencia ausencia por el método de dilución

Las 33 cepas aisladas que desarrollaron crecimiento positivo en medio Agar YPD, fueron sembradas en medio Agar YPD adicionando diferentes concentraciones del alcohol, de las cuales el 100% del total de cepas aisladas no presentan crecimiento en los medios con una concentración de 8, 10 y 12% de etanol. Esto se puede atribuir a la supresión total del crecimiento de levaduras, dado por la actividad del etanol sobre un determinado proceso o estructura., esto se puede explicar conforme la experimentación realizada por Nojiro y Ouchii, (1962), en la cual la presencia de etanol a una determinada concentración afecta las actividades fermentativas de la levadura, inhibiendo su crecimiento (pág. 825).

Tabla 36.
Cultivo de cepas en medio Agar YPD + Etanol y control de crecimiento

Código	8% EtOH		10% EtOH		12% EtOH		Código	8% EtOH		10% EtOH		12% EtOH	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
C001/3/D	-	-	-	-	-	-	C018/2/D	-	-	-	-	-	-
C002/2/D	-	-	-	-	-	-	C019/2/D	-	-	-	-	-	-
C003/2/D	-	-	-	-	-	-	C020/2/D	-	-	-	-	-	-
C004/2/D	-	-	-	-	-	-	C021/3/D	-	-	-	-	-	-
C005/2/D	-	-	-	-	-	-	C022/3/D	-	-	-	-	-	-
C006/2/D	-	-	-	-	-	-	C024/2/D	-	-	-	-	-	-
C007/2/D	-	-	-	-	-	-	C100/3/D	-	-	-	-	-	-
C008/2/D	-	-	-	-	-	-	C114/4/D	-	-	-	-	-	-
C009/3/D	-	-	-	-	-	-	C115/4/D	-	-	-	-	-	-
C010/2/D	-	-	-	-	-	-	C116/4/D	-	-	-	-	-	-
C011/2/D	-	-	-	-	-	-	C118/2/D	-	-	-	-	-	-
C012/2/D	-	-	-	-	-	-	C119/2/D	-	-	-	-	-	-
C013/2/D	-	-	-	-	-	-	C120/2/D	-	-	-	-	-	-
C014/2/D	-	-	-	-	-	-	C121/2/D	-	-	-	-	-	-
C015/2/D	-	-	-	-	-	-	C122/2/D	-	-	-	-	-	-
C016/2/D	-	-	-	-	-	-	C123/2/D	-	-	-	-	-	-
C017/2/D	-	-	-	-	-	-							

Nota: Control presencia – ausencia en medio Agar YPD + Etanol

Elaborado por: Coronel, Daniel

3.6. Viabilidad de las taxa de levaduras de interés por medio de cámara Neubauer

3.6.1. Tinción vital de células de levadura

Las cepas a ser tomadas en cuenta dentro del proceso de tinción vital de células fueron las que lograron crecimiento óptimo a lo largo de los aislamientos en medios selectivos, por lo cual el análisis de viabilidad fue realizado en las cepas se encontraron dentro de esta condición las que fueron C001/4/F y C009/3/F.

Tabla 37.

Porcentaje de viabilidad de las taxa de levaduras mediante cámara Neubauer

		Edad del Cultivo (Días)									
		05-nov		08-nov		12-nov		15-nov		19-nov	
		0		3		7		10		14	
		C. Vivas	C. Muertas	C. Vivas	C. Muertas	C. Vivas	C. Muertas	C. Vivas	C. Muertas	C. Vivas	C. Muertas
C001/4/F		35	3	21	0	42	4	35	2	21	0
		25	1	12	1	20	0	48	1	37	0
		18	0	40	2	50	0	23	0	12	1
		20	0	10	0	32	0	39	1	13	0
		96,07%		96,51 %		97,29%		97,31%		98,80%	
C009/3/F		12	3	17	2	31	0	17	0	42	1
		15	1	25	0	18	1	35	3	37	1
		27	2	19	3	12	1	22	1	21	0
		10	1	23	1	9	1	34	0	8	0
		90,14%		93,33%		95,89%		96,42%		98,18%	

Nota: Viabilidad celular de levaduras expresada en porcentajes

Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 37, muestra el porcentaje de viabilidad de las cepas C001/4/F y C009/3/F en un período de 14 días, en el cual se aprecia un crecimiento continuo de las levaduras conforme pasa el tiempo. Se puede observar que el porcentaje de viabilidad de la cepa C001/4/F es mayor, con relación a la cepa C009/3F (Ver Figura 13).

Gráfica de los porcentajes de crecimiento de cepas puras

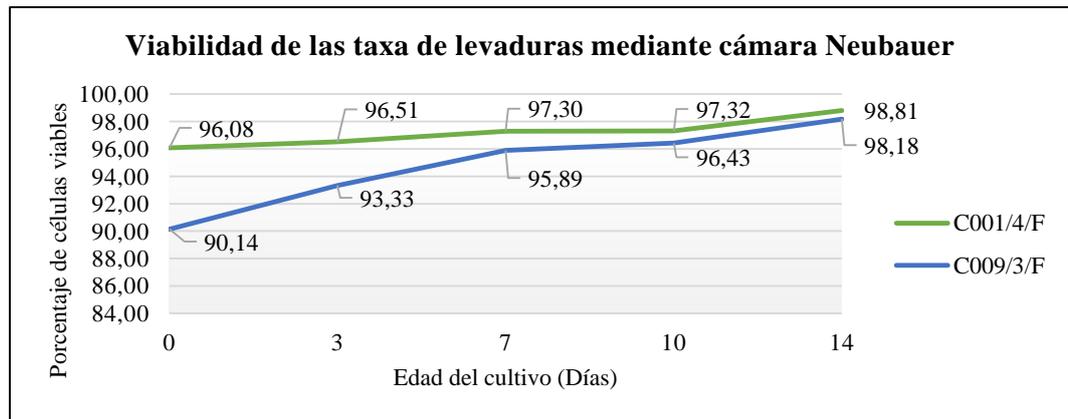


Figura 13. Gráfica comparativa de porcentajes de las dos cepas C001/4/F y C009/3F con resistencia alcohólica

Elaborado por: Coronel, Daniel

Los valores de viabilidad en el día 14 de las cepas C001/4/F y C009/3/F, son similares a los obtenidos en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* realizado por Altamirano, (2013, pág 93), en el cual el porcentaje de viabilidad es de 98,46% y la de las cepas C001/4/F y C009/3/F es de 98,80% y 98,18% respectivamente. Estos porcentajes hacen referencia a las características útiles de las cepas para ser utilizadas como inóculo para procesos industriales de fermentación de mosto, siendo estas hábiles cuando la viabilidad de las células es mayor al 98,00%.

3.7. Identificación bioquímica de cepas mediante pruebas RapID Yeast Plus

El aislamiento de cepas tras el uso de los métodos de prefermentación y dilución, dieron como resultado la obtención de 51 cepas puras, de las cuales tras los diferentes aislamientos en medios selectivos y resistencia alcohólica se establece que las cepas C001/4/F y C009/3/F, identificadas mediante microscopias comparativas y por sus características morfológicas de la colonia, se identificó como *Saccharomyces cerevisiae* a la cepa C001/4/F, y dentro del género *Candida* a la cepa C009/3/F.

La tabla 38, ilustra la identificación mediante criterios bioquímicos, conforme la reacción ya sea esta positiva o negativa, para generar criterios de identificación acorde a la sustancia de reacción.

Tabla 38
 Identificación mediante criterios bioquímicos por medio de pruebas
 RapID Yeast Plus

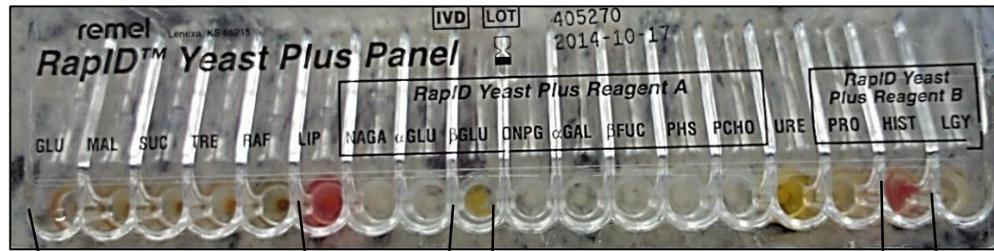
REACTIVO	CODIFICACIÓN		
	C001/4/F	C009/3/F	
Glucosa	+	+	+
Maltosa	+	-	-
Sacarosa	+	+	-
Trehalosa	+	-	-
Rafinosa	+	+	-
Éster de ácido Graso	-	-	-
p-nitrofenil-N-acetil- β , D-galactosamide	-	-	-
p-nitrofenil- α ,D-glucósido	-	-	-
p-nitrofenil- β ,D-glucósido	+	-	-
α -nitrofenil- β , D-galactósido	-	-	-
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>Rhodotorula rubra</i>	<i>Candida krusei</i>

Nota: Identificación por criterios bioquímicos de las dos cepas de interés.

Elaborado por: Coronel, Daniel

La cepa C001/4/F, se identifica como *Saccharomyces cerevisiae*, (Software ERIC®), considerando su actividad bioquímica, en cuanto a la asimilación de azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa), generando una reacción positiva en las cinco primeras celdas, con una coloración amarilla, la cepa genero reacción positiva ante la asimilación de p-nitrofenil- β ,D-glucósido e histidina β -naftilamida, siendo la coloración de reacción positiva para este último reactivo el color rojo oscuro (Figura 14). En relación con estos resultados, la investigación realizada por Hours, Ferreyra, y Schwab (2005), establece los mismos resultados en cuanto a la asimilación de reactivos mediante el uso del kit comercial (ID 32 C, Bio Merieux), en la cual se identifica a *Saccharomyces cerevisiae*, con un 100% de probabilidad, por lo cual se comprueban los resultados obtenidos en la investigación, siendo la cepa C001/4/F la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (pág. 323).

Identificación de la cepa C001/4/F, mediante criterios bioquímicos por medio de pruebas RapID Yeast Plus



Reagent / Réactif / Reagenz / Reagente / Reactivo	None / Aucun / Keine, Nessuno / Ninguno						RapID Yeast Plus Reagent A / Réactif A RapID Yeast Plus / Reagent A / RapID Yeast Plus Reagent A / Reactivo RapID Yeast Plus A						None / Aucun / Keine, Nessuno / Ninguno		RapID Yeast Plus Reagent B / Réactif B RapID Yeast Plus / Reagent B / RapID Yeast Plus Reagent B / Reactivo RapID Yeast Plus B			
Positive Reactions Réactions positives Positive Reaktionen Reazioni positive Reacciones positivas	Yellow Jaune Gelb Giallo Amarillo						Yellow Jaune Gelb Giallo Amarillo						Red or Dark red-orange Rouge ou rouge orangé foncé Rot oder dunkles Rotorange Rosso o rosso-arancione scuro Rojo o rojo-naranja oscuro		Purple, red, or dark pink Violet, rouge ou rose foncé Purpur, rot oder dunkelrosa Porpora, rosso o rosa scuro Morado, rojo o rosa oscuro			
Cavity #, No cavité / Kammer-Nr. / Cavità N. / N° de cavidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Test Code Code du test Testcode Codice esame Código de prueba	GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA	αGLU	βGLU	ONPG	αGAL	BFUC	PHS	PCHO	URE	PRO	HIST	LGY
Value / Valeur / Wert Valore / Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Result / Résultat Ergebnis / Risultato Resultado	+	+	+	+	+				+								+	

Figura 14. : Fotografía tomada por Coronel (2014). Cuadro de reporte para resultados de RapID Yeast Plus (Remel, 2005)

Elaborado por: Coronel, Daniel

Con relación a la cepa C009/3/F, *Candida krusei*, posee características de identificación bioquímica con reacción positiva (glucosa, urea y leucil-glicina β-naftilamida), que son similares a *Rhodotorula rubra*, exceptuando la asimilación de reactivos como sacarosa, rafinosa y prolina-β-naftilamida, que generan reacción positiva en el caso de *Rhodotorula rubra*. La identificación para *Candida krusei* y *Rhodotorula rubra* establecida en el instructivo Krug, (2009, pág. 43) y en la investigación de Hernández, (2001, pág. 505), establece la reacción positiva de asimilación en glucosa, urea y leucil-glicina β-naftilamida, siendo estos dos últimos reactivos de asimilación variable conforme a la diversificación de las especies en cada género. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación, siendo

Rhodotorula rubra, quien genera mayor variabilidad en las pruebas bioquímicas dada la gran diversificación de esta especie conforme las condiciones de crecimiento (Krug, 2009, pág 43).

La cepa C009/3/F, corresponde a *C. krusei* con una probabilidad del 86,00%, sin embargo existe una probabilidad del 14,00% que esta cepa sea *Rhod. rubra*, aunque este es un porcentaje bajo hay que considerar que *C. krusei*, no posee alta resistencia alcohólica; ya que estudios realizados por Kilian, *et al.* (1981) establecen que *C. krusei*, es resistente a concentraciones de alcohol de 3.60% (pág. 270), mientras que *Rhod. Rubra*, posee una resistencia alcohólica de 28,00% (Li, 2004, pág. 129).

Bajo estas consideraciones, se establece que la cepa C009/3/F pertenece al género *Candida*, especie *krusei*, aunque en las pruebas bioquímicas como en el aislamiento por resistencia alcohólica se presenten dos posibles cepas, la comparación de colonias y las microscopias realizadas encajan dentro del perfil de *Candida krusei*.

Tabla 39
Identificación de cepas mediante el sistema RapID
Yeast Plus de Remel

CÓDIGO	CONSIDERACIÓN			
C009/3/F	<i>C. krusei</i>	86%	Rhod. rubra	14%
C001/4/F	<i>S. cerevisiae</i>	100%		

Nota: Identificación por criterios bioquímicos de las dos cepas de interés.

Elaborado por: Coronel, Daniel

La tabla 39, presenta la identificación de las cepas considerando la probabilidad de la cepa, conforme a la bioquímica de la levadura. Los resultados obtenidos, indican que pese al uso del medio lisina con lactato de sodio para determinar cepas fermentativas de géneros no *Saccharomyces* se establece que la cepa C001/4/F, mediante el uso del micrométodo RapID Yeast Plus, es *S. cerevisiae* con una probabilidad del 100%. Esto puede atribuirse a cantidades de nitrógeno asimilable en el medio, ya que las levaduras del género *Saccharomyces*, no pueden asimilar lisina como fuente de nitrógeno (Russo, 2011, pág. 24).

CONCLUSIONES

- El mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), por su posición geográfica donde se desarrolla, posee una microbiota abundante sin alteración antropogénica, bajo estas circunstancias se establecen procesos de exosmosis, fenómeno por el cual migran nutrientes del interior al exterior de la fruta, las fermentaciones espontáneas generadas por este fenómeno, inducen el desarrollo de levaduras nativas, siendo estas de gran interés para la industria enológica bajo procedimientos de aislamiento e identificación.
- La variabilidad en el tiempo de crecimiento en las etapas, de aislamiento en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio y en el medio Agar YPD sin conservante generan porcentajes de 94,73% y 57,89% respectivamente; y en el porcentaje de crecimiento dado en el aislamiento en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio y en el medio Agar YPD sin conservante, establece porcentajes de 90,90% y 30,30% respectivamente. Estos valores permiten concluir que un óptimo crecimiento de las cepas tras el aislamiento se establece en medio Agar YPD con metabisulfito de sodio, partiendo de cultivos puros previos, para evitar la competencia y baja adaptabilidad de las cepas.
- El aislamiento de cepas en medio lisina con lactato de sodio bajo los métodos de prefermentación y dilución, establecen un alto porcentaje de cepas no pertenecientes al género *Saccharomyces*, presentando 78,94% por el método de prefermentación y el 90,90% por el método de dilución, bajo esta consideración se concluye que el porcentaje de cepas pertenecientes al género *Saccharomyces*, a quienes se les atribuye la mayoría de procesos fermentativos se encuentran en menor porcentaje de la microbiota total de la baya de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*).
- La identificación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas, concluye que la morfología tanto de las colonias como de las células de levaduras con crecimiento óptimo en un período de 24 horas, pertenecen a los géneros *Saccharomyces* y

Candida, siendo estos géneros comunes en la microbiología presente en frutos por su alta cantidad de compuestos carbonados básicos en la nutrición de estas.

- El aislamiento y control de crecimiento en agar YPD a una concentración de etanol del 8,00% es del 10,52%, no se presentó crecimiento de las cepas a concentraciones de etanol del 10% y 12%, por el método de prefermentación, el crecimiento de cepas por el método de dilución a las mismas concentraciones de etanol fue nula; conforme esto se concluye que las cepas aisladas del fruto de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), no poseen alta resistencia alcohólica, pero el crecimiento de estas en los medios selectivos, establecen su poder fermentativo; además de esto, las pruebas de resistencia alcohólica, permiten concluir que las cepas aisladas por el método de prefermentación, se adaptan a cantidades de alcohol propias de su entorno desde la etapa de aislamiento, lo que permite establecer que este método es el mejor para aislar cepas con resistencia alcohólica.
- El análisis de viabilidad de las taxa de levaduras de interés por medio de pruebas Neubauer, estableció un porcentaje de viabilidad mayor al 98,00%, la cepa C001/4/F, presentó viabilidad del 98,80% y la cepa C009/3/F de 98.18%, estos valores permiten considerar a estas cepas como útiles para procesos industriales.
- La identificación bioquímica mediante pruebas RapID Yeast Plus estableció, que las cepas C001/4/F y C009/3/F, degradan compuestos carbonados principalmente azúcares simples y dobles, además de la asimilación de p-nitrofenil- β ,D-glucósido e histidina β -naftilamida, siendo estos compuestos degradados característicos de cepas utilizadas en la industria enológica, lo que nos permite concluir que los métodos de aislamiento e identificación utilizados fueron adecuados.
- Se afirma la hipótesis alternativa, la cual establece que existen diversas taxa de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica, presentes en el fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), sin embargo estas cepas de levaduras no presentan alta resistencia alcohólica como lo presentaron los aislamientos en medio agar YPD con etanol a diferentes concentraciones.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda modificar la metodología de aislamiento utilizada, en cuanto a la concentración de metabisulfito de sodio la cual fue de 0,15 g/L a concentraciones que oscilen los 0,2 a 0,5 g/L, ya que esta concentración utilizada en la investigación no generó inhibición para los hongos pertenecientes al género de los mucorales.
- Para el aislamiento de cepas en medio lisina con lactato de sodio, se debe considerar la pureza del medio y su preparación, para limitar la presencia de trazas de nitrógeno, así se tendrán resultados inmediatos conforme a la identificación de levaduras del género *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.
- La variabilidad en el tiempo de crecimiento de las cepas, se atribuye a un proceso de adaptación de las levaduras al medio y al pH del mismo, siendo estos puntos específicos que afectan en el tiempo de crecimiento, generando en algunas cepas inhibición de crecimiento por afectación en los centros activos enzimáticos y fallos en la permeabilidad de la membrana plasmática; esto se refleja en el porcentaje de crecimiento dado en

GLOSARIO

- **Ácido propiónico:** es un ácido carboxílico monoprótico que puede encontrarse naturalmente, de fórmula molecular $C_3H_6O_2$. Son elementos fundamentales de la composición de los vinos, otorgándoles sus cualidades y sus defectos eventuales.
- **Ascospora:** espora de origen sexual, meióspora, en los ascomicetos, que se forma en las ascas. Esta clase de espora es específica de los hongos clasificados como ascomicetes.
- **Cepa:** conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias.
- **Coenzimas:** molécula orgánica pequeña necesaria para la actividad de una enzima. Las coenzimas son cofactores de naturaleza orgánica.
- **Fenol:** sustancias con uno o más anillos aromáticos (benceno) y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos de compuestos fenólicos: los ácidos fenólicos y los flavonoides.
- **Fermentación:** proceso mediante el cual las sustancias orgánicas siendo estas el sustrato sufren una serie de cambios químicos (reducciones y oxidaciones), que producen energía: al finalizar la fermentación, se presenta una acumulación de varios productos
- **Flor:** conjunto de levaduras responsable de la crianza biológica de los vinos, el término también se refiere al velo que se desarrolla en la superficie del vino de forma espontánea, a modo de capa flotante de color blanco grisáceo, generado por el conjunto de 4 levaduras pertenecientes principalmente al género *Saccharomyces*.
- **Mosto:** zumo fresco de uva que no ha iniciado la fermentación. Mosto flor o mosto yema: es el mosto que fluye de la uva estrujada por simple gravedad, sin presión mecánica alguna.
- **Starter:** es un inóculo microbiológico sofisticado, por ejemplo una cepa de levadura identificada.
- **Tanino:** sustancia química natural en el vino, de acción astringente y curtiente, que procede de las partes sólidas del racimo.
- **Taxa:** cada grupo de organismos de cualquier nivel taxonómico creado por las clasificaciones se denomina genéricamente taxón y plural es taxa o taxones.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abad, E. (2006). *Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo*. Madrid - España: Universidad Politécnica de Madrid.
- Adarme, T., & Rincones, M. (2008). *Evaluación de cuatro antimicobinaos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Agarwal, S., Manchanda, V., & Verma, N. (2011). Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. *Indian Journal of microbiology*. Volume: 29, 172-177.
- Agudo, L. (2014). *Fundamentos de la fermentación alcohólica*. España: IES Cencibel.
- Altamirano, C. (2013). *Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de Saccharomyces cerevisiae empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto*. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ariza, B., & Gonzales, L. (1997). *Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. Bogotá - Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Barrachina, C. (2007). *Fundamentos de bioquímica. Volumen 96 de Educació (Universitat de Valencia)*. Valencia - España: Universitat de València.
- Bely, M., Sablayrolles, J., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng*, 246-252.
- Bernal, H., & Correa, J. (1990). *Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello*. Bogotá - Colombia: SECAB ciencia y tecnología. Tomo VII.
- Bernardi, A. (2013). *Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza*. Mendoza - Argentina: Universidad Nacional de Cuyo - Facultad de Ciencias Agrarias.

- Bial, & Aréstegui. (2002). *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 39.
- Brown, C., Campbell, I., & Priest, F. (1989). *Introducción a la Biotecnología*. Zaragoza - España: Editorial Acribia.
- Bruzzese, J. (2011). *Vinos del mundo by Wine Select*. Uruguay: RIEDEL.
- Busturia, A., & Lagunas, R. (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Journal of General Microbiology*, 379 - 385.
- Cannon, P. (26 de Diciembre de 2014). *Aspergillus niger, colony on MEA*. Obtenido de Fungi of Great Britain and Ireland: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/aspergillus-niger>
- Carballo, F. (2000). *Microbiología Industrial: microorganismos de interés industrial*. España: Editorial Acribia.
- Cárdenas, C. (2006). *Levaduras del género candida de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación*. San Cristóbal de La Laguna - España: Universidad de la Laguna.
- Cárdenas, E. (2004). *Contaminación atmosférica y medios de transporte en la Ciudad de Toluca. Volumen 4 de Cuadernos de investigación*. México: UAEM.
- Cardona, A. (2014). *Las levaduras*. México: Universidad Autónoma de Aguas Calientes.
- CESA. (1993). *Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador*. Quito - Ecuador: Editorial Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas.
- Cordero, R. (2007). Revisión bibliográfica de las levaduras genéticamente modificadas para reducir el alcohol en vinos . *Revista ACE de enología - RUBES EDITORIAL*, N° 85.
- Coronel, M. (2010). *Los vinos de frutas*. Quito - Ecuador: Universidad Tecnológica Equinoccial.

- Dijken, J., & Scheffers, W. (1996). Redox balances in the metabolism of sugar yeast. *Journal of Microbiology. Vol. 32*, 199 - 224.
- Dumitru, C. (2011). 'Synthetic' chromosome permits rapid, on-demand 'evolution' of yeast; Artificial system has built-in diversity generator. *Science Daily - Johns Hopkins Medical Institutions. Nature Journal of Science*, 471–476.
- Estrella, E. (1986). *El pan de América: etnohistoria de los alimentos aborígenes en el Ecuador Publicaciones del C.S.I.C. conmemorativas del V centenario del descubrimiento de América*. Ecuador: Digitalización 2009. Tercera Edición, Centros de Estudios Históricos.
- Fernández, J. (2013). La evolución reciente del sector vitivinícola internacional . *GeoGraphos*, 173-194.
- Fisher, F. (1998). *Fundamental of Diagnostic Mycology*. Pennsylvania: Saunders Company.
- Fleet, G. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal Food Microbiology. Sep 15; 50 (1-2)*, 101-117.
- Folch, J., Garay, A., Iledías, F., & Cavarrubias, A. (2004). La respuesta a estrés en la levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología. Volumen 46*, 24 - 46.
- Gallego, J. (2012). *Servicio de vinos*. Madrid - España: Editorial Paraninfo.
- García, J. (2001). *Estudio de distintos tiempos de maceración carbónica para la vinificación en tinto en tres variedades de vid. (V. Vinifera L.) establecidas en el centro de la república mexicana*. México: Universidad de Querétaro.
- García, J. (2008). *Maridaje, enología y cata de vinos*. Málaga - España: Innovación Y Cualificación.
- García, J. (2011). *Enología avanzada*. Málaga - España: Editorial Vértice.
- García, M. (1993). *Biotecnología alimentaria*. Balderas - México: Editorial Limusa.
- García, M., Quintero, R., & López, A. (1993). *Biotecnología alimentaria*. México D.F. - México: Editorial Limusa.

- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología - Segunda Edición*. Costa Rica: EUNED.
- Garzón, S., & Hernández, C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Pereira - Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Tecnología Química.
- Gil, M., García, F., & García, P. (2009). *Hostelería el vino y su servicio*. Madrid - España: Editorial Parainfo.
- González, J., & Calvo, A. (2005). Despertar de la era antibiótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 247-251.
- Guillem, P. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid - España: Ed. Médica Panamericana.
- Gutiérrez, A., & Garijo, E. (2001). Killer yeast: Incident in the ecology of spontaneous fermentation. *A. Journal. Enol. Vitic. Vol. 54*, 352 - 356.
- Halasz, A., & Laszlitzy, R. (1991). *Use of yeast biomass in food production*. Boston - Estados Unidos: CRS Press. Boca Raton Ann Arbor.
- Hernández, A. (2001). *Microbiología y parasitología médicas, Volumen 3*. México: Editorial Ciencias Médicas.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial, Primera Edición*. San José - Costa Rica: EUNED.
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología, Segundo Tomo*. Madrid - España: Mundi-Prensa Libros.
- Hoog de Guarro, J. (1995). *Atlas of Clinical Fungi*. Netherlands and Spain: Centralbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili.
- Hours, R., Ferreyra, M., & Schwab, M. (2005). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Ciencia, Docencia y Tecnología, vol. XVI, núm. 31*, , 319 - 239.

- INIAP. (2006). *Informe del análisis bromatológico realizado en el departamento de nutrición y calidad del instituto nacional de investigaciones agropecuarias*. INIAP.
- IOVW. (2012). Compendium of International Methods of Analysis -OIV. *Method OIV-MA-AS311-01A* .
- Jørgensen, P., & León, Y. (1999). Catalogue of vascular plants of Ecuador. *Syst. Bot*, 1181.
- Jorgensen, P., Ulloa, C., & Valencia, R. (1995). A floristic analyses of the high Andes of Ecuador. *Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forest.*, 221-237.
- Kilian, S., Antes, B., Lategan, P., & Kruger, W. (Article first published online: 2004. Published1981). Temperature effects on ethanol and isopropanol utilization by *Candida krusei*. *Biotechnology and Bioengineering*, 267–275.
- Kish, S., Sharf, R., & Margalith, P. (1983). A note on a selective medium for wine yeast. . *Journal. Appl. Bacteriol. Vol 55*, 177-179.
- Koneman, E. A. (2008). *Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis, Sexta Edición*. Buenos Aires - Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Krug, R. (2009). *Auxanograma colorimétrico para la indentificación de las principales levaduras de interés médico - AUXACOLOR 2 - 56513*. BIORAD.
- Kurtzman, C., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study, Volumen 1, Quinta Edición*. London: Elsevier.
- Lasso, G. (2009). *Guía Turística de la Reserva Ecológica Cayamabe - Coca*. Ecuador: Ministerio del Ambiente .
- Li, J. (2004). *Contemporary Drug Synthesis. Wiley Series on Drug Synthesis*. New Jersey - EEUU: John Wiley & Sons.
- Linares, M., & Solís, F. (2011). *Identificación de levaduras. Capítulo 11*. España: Asociación Española de Micología.

- Loján, L. (2003). *El verdor de los Andes Ecuatorianos: realidades y promesas. Proyecto de Desarrollo Forestal Participativo en los Andes*. Texas - USA: Universidad de Texas.
- Lopez, E. (2007). Brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodegas. *Revista de Enología. Ciencia y Tecnología*. No 78, 3.
- Luteyn, J. (1996). *Flora of Ecuador. Vol. 54*. Berlín - Alemania: Editorial Borrad.
- Madigan, M. (2009). *Brock, biología de los microorganismos*. Talca - México: Pearson Educación.
- MAGAP, M. d. (1998). *Hoja técnica de Mortiño-Blueberry*. Quito-Ecuador: MAGAP.
- Malherbe, D., Cordero, O., van Rensburg, P., & Pretorius, S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 61, Issue 5-6*, 502-511.
- Mas, A., Torija, M., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., & Poblet, M. (21 de Noviembre de 2012). *Selección de levaduras*. Obtenido de Tecnología del vino. Fermentos. : <http://www.alcion.es>
- MAST. (2004). *CRYOBANK*. England: MASTGRP.
- McGinnis, M. (1980). *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York-USA: Academic Press INC.
- Medina , C., Sánchez , M., & et. al. (1999). Algunas consideraciones sobre la tolerancia alcohólica en levaduras. *Revista avanzada científica: IDICT*, 9.
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 15-23 .
- Mosquera, C. (2012). *Aprovechamiento del Suero de Quesería en la Obtención de una Bebida Fermentada a Partir de Mezclas con Jugo de Caña de Azúcar Saccharum officinarum*. Ambato - Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.

- Nagodawithana, T. (1974). Effect of Dissolved Oxygen, Temperature, Initial Cell Count, and Sugar Concentration on the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in Rapid Fermentations. *American Society for Microbiology*. vol. 28, 383-391.
- Navarre, J. (1998). *L'oenologie*. Paris - Francia: Editorial Lavoisier.
- Nojiro, K., & Ouchii, K. (1962). The fermenting ability of the sake yeast and its alcohol tolerance. The relationship between the fermenting ability and alcohol. *J. Soc. Brew*, 824-830.
- OEMV, O. E. (2012). *El vino en cifras*. Vinos de España - España Importaciones e Inversiones.
- Oficina Comercial de ProChile, G. (2011). *Estudio de Mercado Vinos en Ecuador*. Santiago de Chile: ProChile.
- OIV. (2014). *International Organisation of Vine and Wine*. Obtenido de World Situation and Statistics of the Vitiviniculture Sector.
- Orberán, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam. Micol*. Vol. 21, 15-19.
- Ortiz, E. (2013). *Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas no-Saccharomyces en viñedos establecidos en Querétaro*. Querétaro - México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Palacios, A., Krieger, S., & Suárez, C. (2006). La Fermentación Maloláctica: Objetivos y Variables de Control. *Ponencias del V Curso de verano Viticultura y Enología*, 45 - 54.
- Panaretou, B. (1990). Plasma-membrane ATP-ase actions affect several stress tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as the extent and duration of the heat shock response. *J. Gen.Microbiol.*, 1763 - 1770.
- Parés, R., & Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. España: Reverte.
- Pazmiño, A., & Aguiar, M. (2009). *Proyecto de elaboración artesanal y comercialización del vino de naranja San Marcos en la ciudad de Guayaquil*. Guayaquil - Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

- Pérez, A. (2009). Introducción a la Cata de Vinos. En A. Pérez, *Manual del Vino*. España.
- Pretorius, E. (2000). Adaptación de la levadura del vino para el nuevo milenio: nuevos enfoques para el antiguo arte de la elaboración del vino. *Yeast*. Vol 16. No 8, 675-729.
- Pretorius, I. (1999). Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. *Journal. Enol. Vitic.* Vol. 2. No 2, 61 -70.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Zamora, E., Sánchez, P., & Hernández, L. (2014). Producción de levaduras "killer *Torulaspota*" para vinificación. En *Nuevas perspectivas en la investigación vinícola - La Semana vitivinícola* (págs. 1350-1355). Extremadura - España.
- Regodón, J. A. (2004). *Obtención y caracterización de cepas autoctonas de levadura para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. Cáceres - España: Universidad de Extremadura.
- Remel. (2005). *RapID™ Yeast Plus System. Para la identificación de levaduras y organismos levaduriformes medicamente importantes*. USA: Remel.
- Rousseau, S., & Doneche, B. (2001). Effect of water activity (aw) on the growth of some epiphytic microorganisms isolated from grape berry. *Vitis*, 75 - 78.
- Ruiz, H. (2011). *Desarrollo de un vino de mortiño (arándanos en la Corporación grupo Salinas de Ecuador*. Navarra - España: Universidad Pública de Navarra.
- Russo, V. (2011). *Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a Botrytis cinerea*. Uruguay: Universidad de la República de Uruguay. Facultad de Química.
- Sáez, A., Flórez, L., & Cadavid, A. (2012). Caracterización de una Cepa Nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico. *Revista Universidad EAFIT*. Vol. 38, 33-42.

- Salmon, J., Vincent, O., Bely, M., & Barre, P. (1993). Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Journal Enol Vitic*, 56 - 64.
- Santamarina, P. (1997). *Biología y Botánica. Volumen 2*. Valencia - España: Ed. Univ. Politéc. Valencia.
- SBI, & Industrial, S. d. (2005). *Desarrollo de una Agenda de Investigación Estratégica (AIE) para la Biotecnología Industrial*. España: Plataforma Tecnológica Española de Química Sostenible.
- Senses, E., Agoston, R. B., & Deák, T. (2005). Characterization of some yeast isolated from food by traditional and molecular test. *International Journal Of Food Microbiology*, 120-124.
- Suárez, J., Gonzáles, V., Torrens, J., Polo, C., & Gonzáles, M. (2002). *Análisis sensorial (vino)*. Barcelona - España: Encuentro Nacional de Ciencias Sensoriales y de la Percepción.
- Tapia, R. (2011). *Proyecto de factibilidad para la puesta en marcha de una empresa comunitaria dedicada a la producción de pulpa de mortiño y su exportación al mercado de los Estados Unidos ubicada en la parroquia rural de Alóag*. Quito - Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Toivola, A. (1984). Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. *American Society for Microbiology. vol. 47 no. 6* , 1221-1223.
- Toro, B., Girón, J., Fernández, P., López, J., & Besada, E. (2003). Multiobjective optimization and multivariable control of the beer fermentation process with the use of evolutionary algorithms . *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 378 - 389.
- Torres, M., & Trujillo, D. (2010). Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 9-15.
- USDA. (04 de 05 de 2014). *National nutrient database for standard*. Obtenido de <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2184?fg=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Stats&new=>

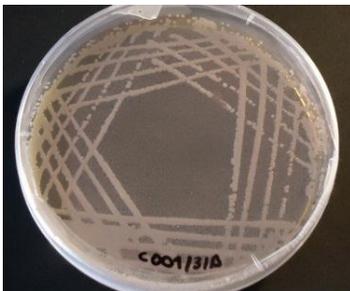
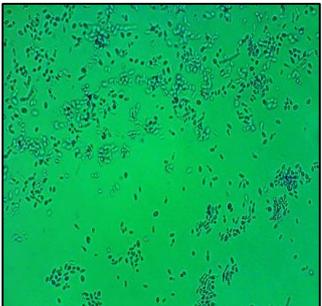
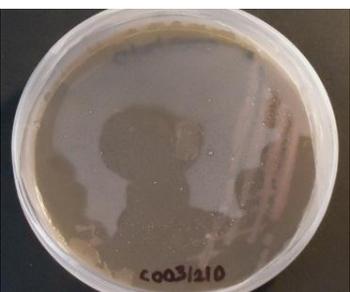
- UTP. (2009). Resistencia alcohólica. En S. Garzón , & C. Hernández, *Estudio comparativo de la producción de etanol entre Saccharomyces serevisiae silvestre y Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950* (pág. 132). PEREIRA : Escuela tecnológica química .
- Vallejo, C., Rodríguez, V., & Rollán, G. (2013). Congresos y Reuniones Científicas. *Estudio comparativo de levaduras presentes en berries de la región del noreste argentino* (pág. 39). Rosario. Santa Fé: Congreso; XIV Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2012). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Universidad de la República.
- Vasco, C. (2009). *Phenolic compounds in ecuadorian fruits*. Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Vasco, C., Rihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium Floribundum*. *Agric. Food Chem*, 8274–8281.
- Vásquez, V. (2009). *Determinación de la presencia de levaduras Brettanomyces spp. y Candida spp. en vinos chilenos y su relación con características organolépticas*. Santiago - Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Verduyn, C., Zomerdijk, T., & Kijkens, J. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 19*, 181-185.
- Villacrés, G., Martínez, G., & 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. Quito-Ecuador: Universidad Central del Ecuador.*
- Villanueva, J. (1996). *Microbiología - Tercera Edición* . España: Reverte.

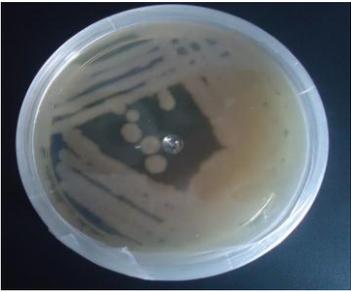
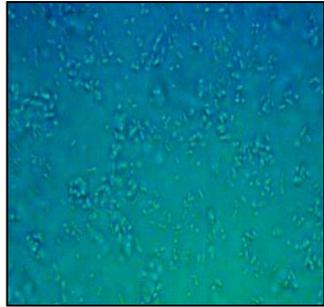
- Villar, A. (1992). *Sensibilidad a etanol en levaduras: Bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación*. Madrid - España: Universidad Complutense de Madrid.
- Voet, D., & Pratt, C. (2007). *Fundamentos De Bioquímica*. Madrid - España: Ed. Médica Panamericana.
- WTCS, W. T. (2013). *Vino Chileno: Mercado Reino Unido. Comercio Exterior*, 80.
- Yépez, Y. (1995). *Selección de una cepa de Saccharomyces cerevisiae con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la planta de Alcoquímica Sucromiles S.A.* Bogotá - Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

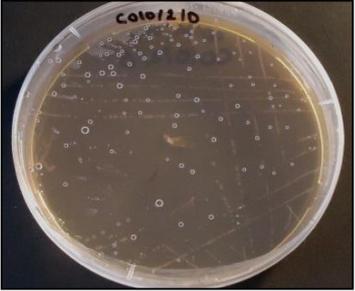
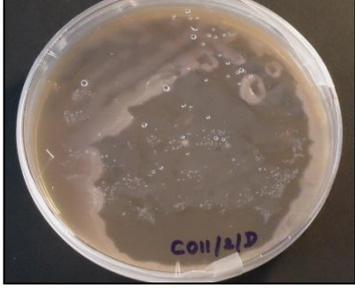
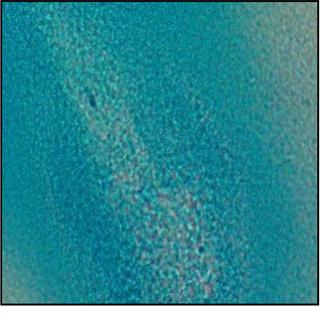
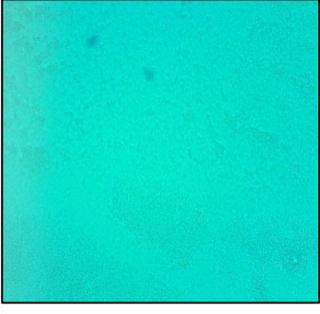
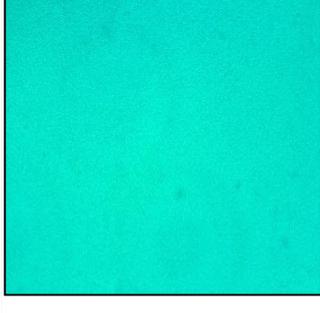
ANEXOS

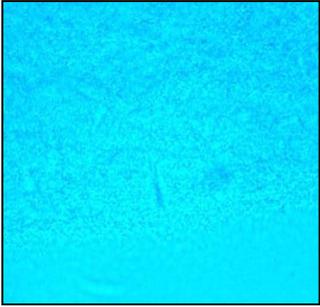
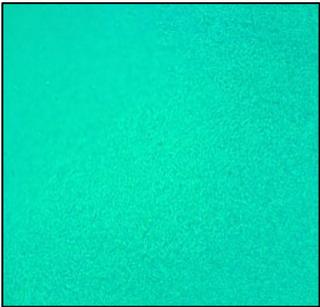
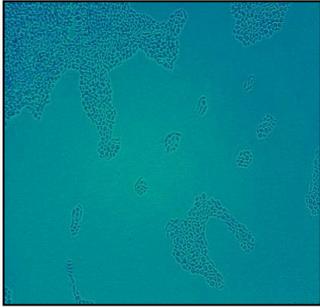
Anexo 1.

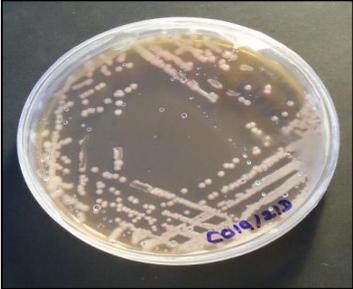
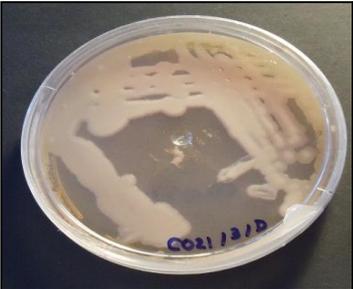
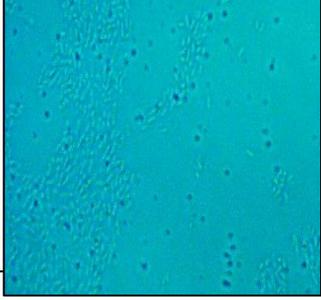
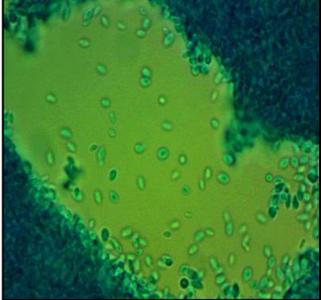
Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas por el método de dilución

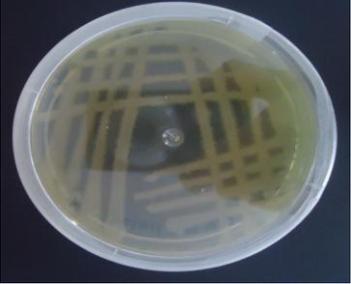
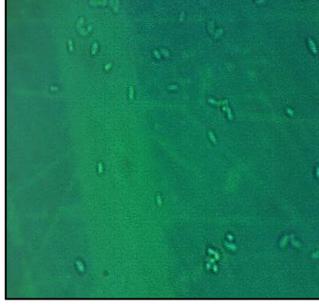
C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 0 1/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Puntiforme	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 0 2/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Rizoide	
		COLOR:	Salmon	
		TAMAÑO:	3 mm	
C 0 0 3/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 0 4/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	1 mm	

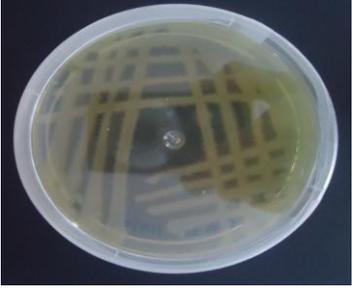
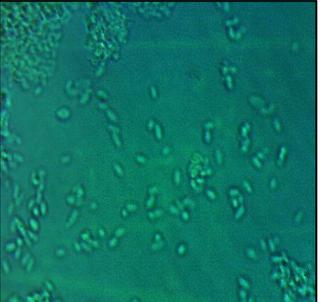
C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 0 5/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 0 0 6/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	2 mm	
C 0 0 8/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Salmón	
		TAMAÑO:	3 mm	
C 0 0 9/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	3 mm	

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 1 0/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Puntiforme	
		MARGEN:	Redondeado	
		COLOR:	Salmón	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 1 1/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Acuminada	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 0 1 2/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 0 1 4/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Blanco	
		TAMAÑO:	3 mm	

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 1 5/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	7 mm	
C 0 1 6/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	2 mm	
C 0 1 7/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Blanco	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 0 1 8/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	2 mm	

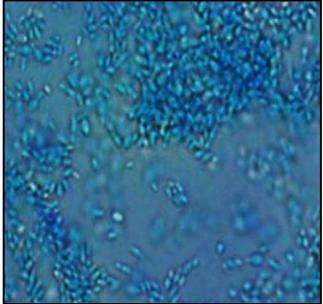
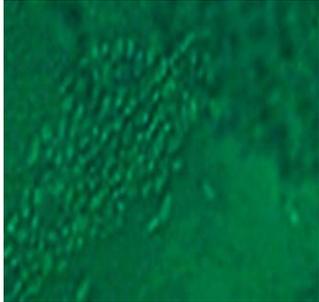
C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 1 9/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Redondo	
		COLOR:	Blanco	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 2 0/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	3 mm	
C 0 2 1/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 0 2 2/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Pulvinada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Blanco	
		TAMAÑO:	2 mm	

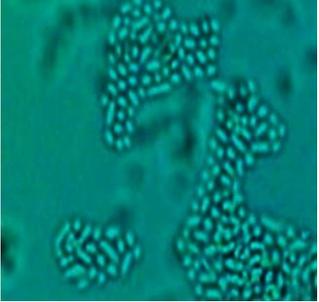
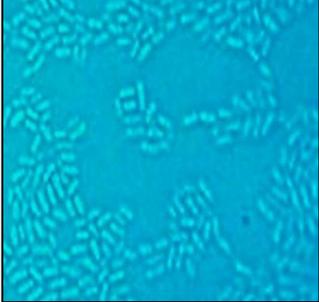
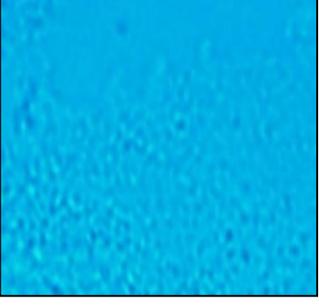
C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 2 3/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Lobulada	
		COLOR:	Naranja	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 1 0 0/ 3/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Beige	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 1 1 4/ 4/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Fusiforme	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Hialino	
		TAMAÑO:	2 mm	
C 1 1 5/ 4/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Fusiforme	
		MARGEN:	Ondulado	
		COLOR:	Hialino	
		TAMAÑO:	2 mm	

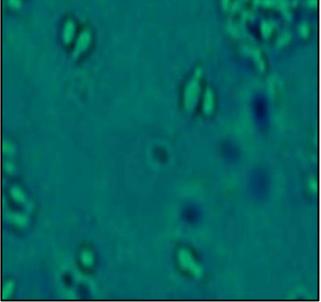
C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 1 1 6/ 4/ D		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Puntiforme	
		MARGEN:	Lobulado	
		COLOR:	Hialino	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 1 1 8/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 1 2 1/ 2/ D		ELEVACIÓN:	Elevada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Blanco	
		TAMAÑO:	3 mm	

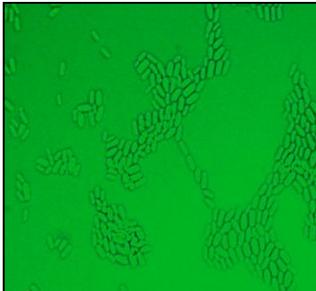
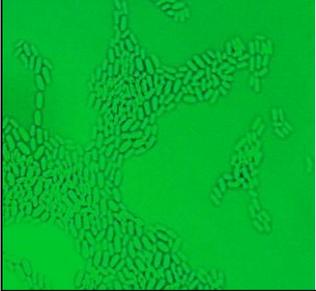
Anexo 2.

Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas por el método de prefermentación

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN	MICROSCOPIA										
C 0 0 1/ 4/ F		<table border="1"> <tr> <td>ELEVACIÓN:</td> <td>Convexa</td> </tr> <tr> <td>FORMA:</td> <td>Circular</td> </tr> <tr> <td>MARGEN:</td> <td>Entero</td> </tr> <tr> <td>COLOR:</td> <td>Crema</td> </tr> <tr> <td>TAMAÑO:</td> <td>2 mm</td> </tr> </table>	ELEVACIÓN:	Convexa	FORMA:	Circular	MARGEN:	Entero	COLOR:	Crema	TAMAÑO:	2 mm	
ELEVACIÓN:	Convexa												
FORMA:	Circular												
MARGEN:	Entero												
COLOR:	Crema												
TAMAÑO:	2 mm												
C 0 0 2/ 2/ F		<table border="1"> <tr> <td>ELEVACIÓN:</td> <td>Plana</td> </tr> <tr> <td>FORMA:</td> <td>Puntiforme</td> </tr> <tr> <td>MARGEN:</td> <td>Ondulado</td> </tr> <tr> <td>COLOR:</td> <td>Beige</td> </tr> <tr> <td>TAMAÑO:</td> <td>5 mm</td> </tr> </table>	ELEVACIÓN:	Plana	FORMA:	Puntiforme	MARGEN:	Ondulado	COLOR:	Beige	TAMAÑO:	5 mm	
ELEVACIÓN:	Plana												
FORMA:	Puntiforme												
MARGEN:	Ondulado												
COLOR:	Beige												
TAMAÑO:	5 mm												
C 0 0 4/ 2/ F		<table border="1"> <tr> <td>ELEVACIÓN:</td> <td>Pulvinada</td> </tr> <tr> <td>FORMA:</td> <td>Circular</td> </tr> <tr> <td>MARGEN:</td> <td>Entero</td> </tr> <tr> <td>COLOR:</td> <td>Crema</td> </tr> <tr> <td>TAMAÑO:</td> <td>5 mm</td> </tr> </table>	ELEVACIÓN:	Pulvinada	FORMA:	Circular	MARGEN:	Entero	COLOR:	Crema	TAMAÑO:	5 mm	
ELEVACIÓN:	Pulvinada												
FORMA:	Circular												
MARGEN:	Entero												
COLOR:	Crema												
TAMAÑO:	5 mm												
C 0 0 5/ 2/ F		<table border="1"> <tr> <td>ELEVACIÓN:</td> <td>Convexa</td> </tr> <tr> <td>FORMA:</td> <td>Circular</td> </tr> <tr> <td>MARGEN:</td> <td>Entero</td> </tr> <tr> <td>COLOR:</td> <td>Crema</td> </tr> <tr> <td>TAMAÑO:</td> <td>3 mm</td> </tr> </table>	ELEVACIÓN:	Convexa	FORMA:	Circular	MARGEN:	Entero	COLOR:	Crema	TAMAÑO:	3 mm	
ELEVACIÓN:	Convexa												
FORMA:	Circular												
MARGEN:	Entero												
COLOR:	Crema												
TAMAÑO:	3 mm												

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 0 6/ 3/ F		ELEVACIÓN:	Pulvinada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 0 0 7/ 3/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Salmon	
		TAMAÑO:	3 mm	
C 0 0 8/ 3/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Puntiforme	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 0 9/ 3/ F		ELEVACIÓN:	Plana	
		FORMA:	Irregular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	1 mm	

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 1 0/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Pulvinada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 0 1 2/ 3/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Salmon	
		TAMAÑO:	1 mm	
C 0 1 3/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	5 mm	
C 0 1 4/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Pulvinada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	4 mm	

C	MACROSCOPIA	CARACTERIZACIÓN		MICROSCOPIA
C 0 1 5/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	6 mm	
C 0 1 6/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	3 mm	
C 0 1 8/ 2/ F		ELEVACIÓN:	Pulvinada	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	4 mm	
C 1 1 7/ 5/ F		ELEVACIÓN:	Convexa	
		FORMA:	Circular	
		MARGEN:	Entero	
		COLOR:	Crema	
		TAMAÑO:	3 mm	

Anexo 3.

Zona de muestreo, recolección de bayas y aislamiento de cepas

Zona de muestre Reserva Cayambe - Coca Bayas de Mortiño (*Vaccinium floribundum*)



Foto: Coronel, Daniel



Foto: Coronel, Daniel

Muestreo de bayas de Mortiño



Foto: Coronel, Daniel

Aislamiento de cultivos puros



Foto: Coronel, Daniel

Anexo 4.

Conservación en el cepario

Código	FACTOR PÉRDIDA		Presencia en cepario	Código	FACTOR PÉRDIDA		Presencia en cepario
	ºT Variación	Contaminación			ºT Variación	Contaminación	
C001/4/F			x	C001/3/D			x
C002/2/F			x	C002/2/D			x
C003/2/F			x	C003 2 D			x
C004/2/F			x	C004 2 D			x
C005/2/F			x	C005 2 D			x
C006/3/F			x	C006 2 D			x
C007/3/F			x	C007 2 D			x
C008/3/F			x	C008 2 D			x
C009/3/F			x	C009 3 D			x
C010/2/F			x	C010 2 D			x
C011/4/F			x	C011 2 D			x
C012/3/F			x	C012 2 D			x
C013/2/F			x	C013 2 D			x
C014/2/F			x	C014 2 D	x		
C015/2/F			x	C015 2 D			x
C016/2/F			x	C016 2 D			x
C017/2/F			x	C017 2 D			x
C018/2/F		x		C018 2 D			x
C117/5/F			x	C019 2 D			x
				C020 2 D			x
				C021 3 D			x
				C022 3 D			x
				C024 2 D			x
				C100 3 D			x
				C114 4 D			x
				C115 4 D			x
				C116 4 D			x
				C118 2 D			x
				C119 2 D			x
				C120 2 D			x
				C121 2 D			x
				C122 2 D			x
				C123 2 D			x

Elaborado por: Coronel, Daniel

Anexo 5.

Planta de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) antes de su caracterización botánica



Foto: Coronel, Daniel

Anexo 6.

Identificación botánica del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Herbario QCA

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Apartado postal 17-01-2184
Fax: 593 - 2 - 2991 - 687
Telf: 593 - 2 - 2991 - 714
Quito - Ecuador

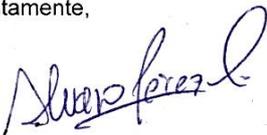
Quito, 16 de abril del 2013

A QUIEN INTERESE

Por medio de la presente me permito certificar que se identificó la siguiente muestra:

ERICACEAE - *Vaccinium floribundum* Kunth

Muy atentamente,



Dr. Álvaro Pérez
Profesor-Curador del Herbario QCA
Escuela de Ciencias Biológicas



Foto: Coronel, Daniel