



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Evaluación del Potencial Hidrolítico y Fermentativo de
Levaduras Antárticas.”

EXAMEN COMPLEXIVO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Leonor Mariella Tacury Mendoza

GUAYAQUIL –ECUADOR

AÑO: 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios que ha sido mi guía y fortaleza. A mis padres por su apoyo y comprensión. Al Ph. D. Juan Manuel Cevallos, mi director de tesis, por su invaluable ayuda. Al CIBE por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y realizar esta investigación, así como también a mis compañeros de laboratorio y a todas las personas que de uno u otro modo colaboraron con la

realización y culminación de
este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

A MI NOVIO

A MIS AMIGOS

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Juan Manuel Cevallos C. PhD.
DIRECTOR DEL EXAMEN
COMPLEXIVO

M.Sc. Natasha Coello G.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Examen Complexivo me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Leonor Mariella Tacury Mendoza

RESUMEN

En las industrias cerveceras, de panadería, de derivados de productos cárnicos, entre otros, existen procesos fermentativos e hidrolíticos cuya temperatura óptima está muchas veces por encima de la temperatura ambiente, lo que puede también provocar la iniciación de procesos indeseables. La formación de ácido acético durante el proceso de elaboración del vino, se lleva a cabo a temperatura ambiente. Otro ejemplo se da en la industria cervecera cuando las temperaturas de fermentación son muy altas y se forman alcoholes superiores que son tóxicos y provocan sabores indeseables; estos son solo un par de ejemplos de las causas que ocasionan pérdidas económicas y mermas en la calidad de los productos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos procesos de fermentación e hidrólisis a bajas temperaturas.

El objetivo de este trabajo de graduación es aislar y caracterizar levaduras del suelo antártico así como también evaluar el potencial fermentativo e hidrolítico de las mismas, para de esta manera establecer un posible uso potencial en la industria alimentaria.

Para esto se recolectaron muestras de suelo antártico de las Expediciones a las islas Torres y Greenwich, que posteriormente fueron trasladadas al laboratorio del CIBE. Se obtuvieron los aislados de levaduras los cuales

fueron identificados molecularmente tomando en consideración su morfología microscópica.

Entre las metodologías que se emplearon en el proceso se utilizaron protocolos de aislamiento de levaduras mediante el uso de medios de cultivo selectivos y universales; estos medios inoculados se mantuvieron a la temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Las colonias obtenidas se evaluaron mediante métodos visuales macroscópicos y microscópicos de identificación morfológica, tinción de Gram, y métodos bioquímicos basados en el uso de azúcares y sus derivados. Además se realizó una caracterización molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN de las levaduras aisladas. Finalmente se llevó a cabo una evaluación del potencial de fermentación de azúcares e hidrolítico mediante el uso de medios específicos.

Al finalizar el proyecto encontramos levaduras como la *Candida sake* que presenta resultados positivos frente a la actividad fermentativa de azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa y para la hidrólisis de proteínas como caseína, que puedan ser útiles en la industria alimentaria por su potencial fermentativo y de hidrólisis debido a que estos aspectos fueron desarrollados a temperaturas de refrigeración.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vii
SIMBOLOGÍA.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	4
1.1. Fuentes de Microorganismos.....	4
1.1.1. Aire.....	5
1.1.2. Suelo.....	6
1.1.3. Agua.....	7
1.1.4. Plantas.....	8
1.1.5. Seres Vivos	9
1.2. Microorganismos Extremófilos y Psicrófilos.....	9
1.2.1. Microorganismos Extremófilos.....	10
1.2.2. Microorganismos Psicrófilos	14
1.3. Levaduras.....	16

1.3.1. Caracterización Morfológica	17
1.3.2. Fisiología	21
1.3.3. Uso en Alimentos	24
1.4. Hipótesis y Objetivos.....	27

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA.....	30
2.1. Obtención de Muestras Antárticas	30
2.2. Aislamiento e Identificación de Levaduras	32
2.2.1. Identificación Macroscópica	33
2.2.2. Identificación Microscópica	34
2.2.3. Identificación Bioquímica	37
2.2.4. Identificación Molecular	40
2.3. Evaluación del Potencial de Levaduras en la Industria de los Alimentos.....	49
2.3.1. Potencial Fermentativo	51
2.3.2. Potencial Hidrolítico	52

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS.....	54
3.1. Identificación de Levaduras	54
3.2. Evaluación del Potencial Fermentativo.....	68

3.3. Evaluación del Potencial Hidrolítico 72

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 78

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucléico
ATP	Adenosin Tri Fosfato
AW	Actividad de Agua
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
dNTP	Deoxynucleotide
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FRU	Fructosa
GLI	Glicerol
GLU	Glucosa
Ident	Identidad
INAE	Instituto Antártico Ecuatoriano
ITS	Internal Transcribed Spacer
LAC	Lactosa
MAL	Maltosa
MEGA6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR Polimerasa	Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial Hidrógeno
SAB	Sabouraud Agar
SAC	Sacarosa
SENESCYT	Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación
TRIS	Hidroximetil Aminometano
TSA	Trycase Soya Agar
UV	Ultra Violeta
YNB	Yeast Nitrogen Base

SIMBOLOGÍA

-	Menos
±	Más Menos
%	Por Ciento
β	Beta
O ₂	Oxígeno
Zn	Zinc
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
Pb	Plomo
Ni	Níquel
Cr	Cromo
I ₂	Yodo
CO ₂	Dióxido de Carbono
H ₂ O	Agua
NaCl	Cloruro de Sodio
IK	Yoduro de Potasio
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
C ₆ H ₁₂ O ₆	Monosacárido
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Disacárido
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C ₃ H ₈ O ₃	Glicerol
100X	Objetivo de Inmersión
x g	Unidades de Centrifugación
-OH	Grupo Hidroxilo
-NH ₄	Grupo Amonio
°C	Grados Centígrados
M	Molar
mM	Mili Molar
m	Metros
μm	Micrómetros

atm	Atmósferas
MPa	Mega Pascales
KGy	Kilo Grays
t□	Tiempo
hr	Horas
s	Segundos
g	gramos
l	Litros
ml	Mililitros
μl	Microlitros
g/l	gramos por litro
mg/l	miligramos por litro
ng/μl	nanogramos por microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1.1	Célula de Levadura	16
Figura 2.1	Toma de Muestras de Suelo en la Antártida	30
Figura 2.2	Medios de Cultivo para Aislamiento de Microorganismos de la Antártida	31
Figura 2.3	Identificación Macroscópica de los Aislados de Levaduras Antárticas	34
Figura 2.4	Microscopio con Lente de Inmersión 100X y Tinción Gram	35
Figura 2.5	Frotis de Aislados previo a Tinción Gram	36
Figura 2.6	Adición del Colorante Verde Malaquita – Tinción de Esporas	37
Figura 2.7	Medios de Cultivos con Diferentes Carbohidratos	38
Figura 2.8	Prueba de la Catalasa en Levadura PDA 12.1 -2 6	40
Figura 2.9	Reactivos del Kit para Extracción de ADN	41
Figura 2.10	Preparación de Suspensión de Aislado de Levadura previo al Protocolo de Extracción de ADN	44
Figura 2.11	Cebadores ITS 1 – ITS4 – ITS3 – ITS5	45
Figura 2.12	Reactivos de PCR	45
Figura 2.13	Termociclador Eppendorf con Perfil Térmico para PCR	46
Figura 2.14	Programa MEGA6	47
Figura 2.15	Ingreso de la Secuencia de ADN de PDA 9 -3 1c en MEGA6	48
Figura 2.16	MEGA6 Árbol Filogenético de <i>Rhodotorula glacialis</i>	49
Figura 3.1	Ejemplos de Morfología Macroscópica de Levaduras Antárticas	57 58
Figura 3.2	Frotis de Muestras Previas a Tinción Gram	59
Figura 3.3	Tinción Gram de Levadura PDA 4 -1 3c <i>Cryptococcus sp.</i>	59
Figura 3.4	Tinción Gram de Levadura PDA 3 -3 1b.1 <i>Rhodotorula sp.</i>	60
Figura 3.5	Tinción Gram de Levadura PDA 12.2 -2 12 <i>Candida sp.</i>	60
Figura 3.6	Tinción Gram de Levadura PDA 12.1 -2 6 <i>Candida sake</i>	61

Figura 3.7	Tinción de Esporas de Levadura PDA 9 -3 1c <i>Rhodotorula glacialis</i>	62
Figura 3.8	Gel de ADN	63
Figura 3.9	Gel de Agarosa	63
Figura 3.10	Gel de PCR	64
Figura 3.11	Árbol Filogenético <i>Rhodotorula glacialis</i> PDA 9 -3 1c	65
Figura 3.12	Árbol Filogenético <i>Rhodotorula sp.</i> PDA 3 -3 1b.1	65
Figura 3.13	Árbol Filogenético <i>Candida sake</i> PDA 12.1 -2 6	66
Figura 3.14	Árbol Filogenético <i>Candida sp.</i> PDA 12.2 -2 12	66
Figura 3.15	Árbol Filogenético <i>Cryptococcus gastricus</i> PDA 8 -2 1e	66
Figura 3.16	Árbol Filogenético <i>Cryptococcus sp.</i> PDA 4 -1 3c	67
Figura 3.17	Árbol Filogenético <i>Cryptococcus sp.</i> PDA 12.2 -3 2	67
Figura 3.18	Resultados de PDA 12.1 -2 6 <i>Candida sake</i> – Prueba de Potencial Fermentativo	70
Figura 3.19	Prueba de Catalasa en Levadura <i>Candida sp.</i> PDA 12.2 -2 12	71
Figura 3.20	Prueba de Ureasa en <i>Rhodotorula sp.</i> PDA 3 -3 1b.1	72
Figura 3.21	Actividad Amilolítica en Almidón de Maíz (Negativo)	73
Figura 3.22	Control Positivo <i>Bacillus subtilis</i> en Actividad Amilolítica (Lugol)	74
Figura 3.23	Resultado de Actividad Amilolítica (Lugol)	74
Figura 3.24	Actividad Proteasa – Caseína de PDA 9 -3 1c y PDA 4 -1 3c	75
Figura 3.25	Actividad Proteasa – Caseína de PDA 12.2 -2 12 y PDA 3 -3 1b.1	75
Figura 3.26	Actividad Proteasa - Caseína de PDA 12.2 -3 2 y PDA 12.1 -2 6	76
Figura 3.27	Resultados de Actividad Lipolítica	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Muestras de Levaduras Seleccionadas	55
Tabla 2	Morfología de Levaduras	56
Tabla 3	Tinciones	61
Tabla 4	Identificación Molecular – Afinidad	68
Tabla 5	Resultados de Pruebas de Fermentación	69
Tabla 6	Resultados de las Pruebas de Ureasa y Catalasa	71
Tabla 7	Resultados de la Evaluación del Potencial Hidrolítico	73

INTRODUCCIÓN

Las levaduras tienen una vasta aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde tiempos antiguos se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación.

Si bien la aplicación en el campo biotecnológico son variadas, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, tal es el caso de los ambientes fríos como la Antártida que posee factores ambientales y climáticos a considerar, como son los fuertes vientos, la baja disponibilidad de agua, las radiaciones UV, muy aparte de las bajas temperaturas, y que juntos conforman un escenario agresivo que limita la vida de flora y fauna.

Por este motivo, las levaduras antárticas representan un objeto de estudio de tal forma que puedan diseñarse nuevas tecnologías aplicadas en la industria alimentaria.

El presente trabajo forma parte del proyecto “Microorganismos Antárticos: Aislamiento, Identificación, Preservación y Evaluación de su Potencial Biotecnológico” dirigido por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), que cuenta con el auspicio de la Secretaría Nacional de Educación Superior,

Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) y del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE).

En este trabajo de investigación se evaluó el potencial fermentativo e hidrolítico de levaduras extremófilas procedentes de aislados del suelo antártico, para un posible uso en la industria de alimentos.

En el capítulo 1 se definen las generalidades como los conceptos relativos a la ubicuidad de los microorganismos, así como también los conceptos de microorganismos extremófilos y psicrófilos, y una breve reseña acerca de las levaduras su morfología, fisiología y su empleo en la industria de los alimentos.

En el capítulo 2 se detalla la metodología empleada, la obtención de las muestras procedentes de la Expedición a las Islas de la Antártida, su aislamiento e identificación en medios de cultivo selectivos y universales como el PDA; los criterios empleados: macroscópicos y microscópicos de identificación morfológica, la tinción de Gram, los métodos bioquímicos como la asimilación de azúcares y pruebas como actividad ureasa y catalasa; así como también la caracterización molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN de las levaduras aisladas. Finalmente la evaluación del potencial fermentativo frente a diferentes clases de hidratos de carbono y el potencial hidrolítico evaluado mediante el uso de

diferentes sustratos para detectar actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica de las levaduras antárticas.

En el capítulo 3 se detallan los resultados obtenidos, las levaduras identificadas a través de su morfología macro y microscópica, tinciones de Gram y de esporas, así como también los resultados de la extracción y la secuenciación del ADN de los aislados de levaduras, finalmente los resultados de las pruebas bioquímicas y de evaluación de su potencial fermentativo e hidrolítico.

El capítulo 4 trata de las recomendaciones y conclusiones con respecto al trabajo de investigación acerca de las levaduras antárticas.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Fuentes de Microorganismos.

En el ambiente natural es muy raro que los microorganismos se encuentren en cultivo puro; en realidad, la población normal de un hábitat abarca un gran número de especies microbianas diferentes (1).

Pueden encontrarse microorganismos vivos en una gran diversidad de hábitats, por lo tanto una de sus principales características es la ubicuidad, y se encuentran desde lo más frío de las lagunas saladas de las regiones polares, y hasta el agua casi en ebullición de manantiales de aguas termales (2).

1.1.1 Aire.

La flora microbiana del aire es transitoria y variable. El aire no es un medio en el que los microorganismos puedan desarrollarse pero es portador de materia particulada, polvo y gotas, que pueden estar cargados de microbios (1). Para algunos microorganismos, la atmósfera es considerada el medio más desfavorable, ya que al estar suspendidos en el aire pueden ser sometidos a desecación así como también a los efectos perjudiciales de la energía solar, y la actividad química del oxígeno O₂ (2).

Algunos microorganismos realmente mueren muy rápidamente cuando se hallan suspendidos en el aire e incluso, aunque ninguna es capaz de crecer y multiplicarse en la atmósfera, un número importante de estos microorganismos son capaces de sobrevivir y usar la turbulencia del aire como medio de propagación, pero su destino final depende de un sistema de complejas circunstancias que incluye las condiciones atmosféricas como humedad, luz solar, temperatura, el tamaño de la partícula que los transportan, y su propia naturaleza (1, 2).

Las esporas de hongos constituyen la mayor parte de la microflora suspendida en el aire y las predominantes fueron de la especie

Cladosporium (1). En algunas épocas del año, de modo especial durante las horas centrales del día, es posible que las esporas de *Cladosporium* sean las más corrientes de las esporas existentes en el aire. Algunas especies, por ejemplo *Cladosporium herbarum*, germinan perfectamente a temperaturas de refrigeración y pueden formar colonias negras antiestéticas en la superficie de algunos productos, por ejemplo en la carne refrigerada (2).

1.1.2 Suelo.

El suelo debe ser considerado como la capa del planeta que provee el sustrato que hace posible la vida (1), por tanto es un medio reservorio de microorganismos tan vasto, que de él se han obtenido algunas de las cepas que se usan en la producción industrial de antibióticos, de enzimas, de aminoácidos, de vitaminas y de otros productos que se usan tanto en la industria farmacéutica como en la industria alimentaria (2).

El suelo y sus características biológicas varían según su localización y clima (1) por lo tanto, es un medio extremadamente complejo en el que los parámetros físico-químicos pueden cambiar muy rápidamente. En respuesta a esto algunos microorganismos como los *Bacillus* y *Clostridium* producen estructuras resistentes,

como son las esporas, que pueden soportar la desecación y una amplia escala de fluctuaciones de la temperatura (2).

Los microorganismos del suelo participan en el reciclado de los compuestos orgánicos y nitrogenados, pero esta capacidad de degradar materiales orgánicos complejos convierte a estos mismos organismos en potentes organismos de alteración (2).

Por ejemplo el *Clostridium thermosaccharolyticum*, produce alteración, con producción de gas, de conservas vegetales enlatadas (3).

1.1.3 Agua.

El agua representa aproximadamente el 70.9% del planeta (4) y por este motivo constituye un ecosistema en el cual se desarrollan muchos microorganismos, algunos son habitantes naturales y otros son transitorios (1) que penetran a este medio llevado por otros vectores.

Los microorganismos que se aíslan en las aguas de los océanos con frecuencia tienen una necesidad fisiológica de sal, crecen mejor a temperaturas relativamente bajas y en el aspecto nutritivo están adaptadas a la concentración relativamente baja de compuestos orgánicos y nitrogenados existentes en estas aguas (2).

Por ejemplo el *Vibrio parahaemolyticus*, es una parte fija de la flora entérica de algunos mariscos. Este organismo puede ser responsable de brotes de intoxicación alimentaria (2).

1.1.4 Plantas.

Todas las superficies de las plantas poseen una flora de microorganismos propia que puede ser lo suficientemente especializada como para ser denominada flora filoplana, la correspondiente a la superficie de hojas y flora rizoplana la que se refiere a la superficie de las raíces (2). Bacterias heterótrofas y fotosintéticas, hongos (particularmente levaduras), líquenes y algunas algas se desarrollan regularmente en estas superficies aéreas de las plantas (5).

Tal es el caso del *Aureobasidium pullulans*, denominada levadura negra que cubre la superficie de las hojas con un sedimento fuliginoso negro (2). O el de las bacterias simbióticas fijadoras de N_2 como *Rhizobium*, efectúan su relevante función en la rizosfera de plantas de interés tanto en agrosistemas como en ecosistemas naturales (6).

1.1.5 Seres Vivos.

Todos los seres vivos llevan consigo una compleja flora microbiana, una parte de la cual puede ser muy especializada y adaptada al crecimiento y supervivencia, reflejando las interacciones inmediatas con el medio que lo rodea (2).

Los seres vivos son una fuente importante de contaminación alimentaria ya que tienen una microflora propia que desde el nacimiento se instaura externa e internamente en su cuerpo.

Estos albergan microorganismos en el tracto intestinal, la piel, las mucosas, plumas, etc. La presencia de los mismos en los alimentos puede suponer un riesgo para la salud pública si son patógenos para el hombre o un riesgo para el valor comercial del alimento (7).

Se puede citar como ejemplo al *Staphylococcus aureus*, presente en las mucosas de las fosas nasales (2).

1.2 Microorganismos Extremófilos y Psicrófilos.

La temperatura es el factor que más afecta en el crecimiento (8) y reproducción de los microorganismos en general. En algún punto

entre las temperaturas máximas y mínimas de viabilidad de los microorganismos, se encuentra la temperatura óptima de desarrollo de éstos. Esta es la temperatura a la cual las colonias desarrollan con más vigor.

Las temperaturas por debajo del mínimo hacen que el crecimiento se detenga, pero no matan a los microorganismos. Sin embargo, las bacterias pueden ser dañadas por procesos repetidos de congelación y descongelación (9). Las funciones vitales de los microorganismos se detienen casi completamente a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua, ya que las células tienen un alto contenido de agua que se congelaría. Cuando ocurre esto, no puede absorber nutrientes a través de sus paredes celulares (10).

1.2.1 Microorganismos Extremófilos.

Los Microorganismos Extremófilos son aquellos que han colonizado y se desarrollan en condiciones de ambientes extremos, hostiles y que difieren a las que normalmente se desarrollan la gran mayoría de microorganismos. Y muchos no podrían sobrevivir en ambientes considerados como normales (11).

Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas de 55 a 121°C o bajas -2 a 20°C, alta salinidad NaCl 2 – 5 M y alta alcalinidad pH arriba de 8 o alta acidez pH menor a 4 (12,13).

Entre ellos se encuentran los microorganismos:

Acidófilos; son los microorganismos que viven en medios con pH menor a 5 (14). Entre los cuales se tiene al *Ferroplasma acidarmanus*, es una arquea que crece en ambientes de pH cercanos a cero con pH de 0.5 a 1 (11).

Alcalófilos; son los microorganismos que viven en ambientes con pH por encima de 9 (14). *Arthrospira platensis* es una cianobacteria, que vive en el Lago Natron que tiene pH 10.5 (11, 15).

Halófilos; son los microorganismos que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento. Se tiene halófilos extremos que toleran concentraciones superiores a 20%, los halófilos moderados con concentraciones entre los 10 – 20%, y los halófilos débiles que toleran concentraciones entre los 0.5 – 10%. Por ejemplo se puede mencionar a la *Halobacterium*

halobium, es una arquea que se adapta a la alta concentración de sal y escasez de oxígeno. Su crecimiento óptimo se da a 50°C, un pH 7.2 y concentraciones de NaCl de 3.5 a 4.3 M (11).

Hipertermófilos; su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C. Como ejemplo se puede mencionar que *Pyrolobus fumarii*, tiene una temperatura óptima de crecimiento de 105°C pero puede crecer hasta los 113°C, sin embargo su crecimiento se detiene cuando la temperatura disminuye a menos de 90°C. Crece en las paredes de los volcanes (11).

Metalófilos; son los microorganismos capaces de crecer en la presencia de altas concentraciones de metales. Como el Zinc (Zn), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Plomo (Pb), Cobre (Cu), Níquel (Ni) y Cromo (Cr). Dentro de este grupo se puede mencionar a la *Ralstonia metallidurans*, que se desarrolla en concentraciones milimolares (mM) de metales pesados tóxicos (11, 16).

Piezófilos; son microorganismos que requieren condiciones de alta presión (superior a 1 atm) para su desarrollo y crecimiento. Son

también llamados Barófilos. Como ejemplo se puede mencionar a la *Moritella profunda*, que se encontraron en sedimentos del océano Atlántico a una presión de 0.1 MPa a una profundidad de 2815 m y temperaturas de 2°C (11, 17).

Psicrófilos; son microorganismos que resisten temperaturas por debajo de los 5°C, y su rango de temperatura de crecimiento pueden ir desde los 20°C hasta menos de 0°C (11). Este tema será detallado a continuación en el siguiente punto.

Radiófilos; son microorganismos que soportan gran cantidad de radiación. Dentro de los cuales se encuentra el *Thermococcus gammatolerans*, que es un arquea que resiste irradiación de rayos gamma de 30 KGy (19).

Termófilos; que son aquellos microorganismos que crecen a temperaturas por encima de los 65°C. Las temperaturas para un crecimiento óptimo se encuentran entre 70 - 80°C y la máxima entre 80 – 113°C. Como ejemplo se puede citar a la *Thermus acuaticus*, crece a temperaturas mayores de 70°C y es ampliamente utilizada en la industria para la tecnología PCR (11).

Xerófilos; son microorganismos capaces de sobrevivir a una extrema desecación o en ausencia de agua, con Aw muy bajos (menores a 0.75), incluso durante largos periodos de tiempo. Entre ellos se puede mencionar a la *Trichosporonoides nigrescens*, que es una levadura que crece en Aw menores a 0.75 (11, 18).

1.2.2 Microorganismos Psicrófilos.

Los ambientes fríos son actualmente mucho más comunes y extensos en la tierra. Los principales ambientes habitados por los microorganismos psicrófilos incluyen regiones polares, montañosas, glaciares, el fondo de los océanos, sistemas de agua subterráneos, la atmósfera superior y las superficies de flora y fauna que viven en ambientes fríos, donde las temperaturas nunca exceden a los 5°C (11).

Los microorganismos Psicrófilos son tolerantes al frío y resisten bajas temperaturas. Son aquellos capaces de crecer entre -5 a 5°C y reproducirse a temperaturas de 7°C o incluso menores, independientemente de su temperatura óptima. Por lo general su temperatura óptima de crecimiento está por debajo de los 20°C (2, 11, 20, 23). Por ejemplo, se tiene al *Botrytis cinerea* que se

desarrolla con normalidad a -1°C , hongo patógeno que causa podredumbre en frutas (2, 21, 22).

Existen dos tipos de Microorganismos Psicrófilos (23):

- **Los Psicrófilos Obligados**, cuya temperatura óptima está entre los $15 - 18^{\circ}\text{C}$, como ejemplo se tiene a la *Polaromonas vacuolata*, que vive en las aguas de la Antártida, su temperatura óptima es de 0 a 4°C y la máxima es de 15°C (24).
- **Los Psicrófilos Facultativos**, cuya temperatura óptima está entre los $20 - 30^{\circ}\text{C}$, tal es el caso del *Penicillium roqueforti* cuya temperatura óptima bordea los 30°C pero resiste temperaturas hasta los 5°C (25, 26).

Los microorganismos psicrófilos son conocidos por sus actividades de degradación en los alimentos. Algunos son patógenos como es el caso de las esporas del *Clostridium botulinum* tipo *B* que sobreviven en frutas y vegetales congelados a -16°C por un año; o como *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir en la leche a -18°C por más de siete meses, u otro ejemplo es el de la *Salmonella enteritidis* que sobrevive en helados a temperaturas de -23.2°C hasta por siete años, y por último se tiene al *Staphylococcus*

aureus que sobrevive en los pollos congelados a una temperatura de almacenamiento de -18°C por 168 días (27).

Como ejemplos de microorganismos psicrófilos que aportan un beneficio se tiene a las levaduras crio-tolerantes denominadas *Saccharomyces eubayanus sp. nov.*, la levadura *Saccharomyces pastorianus* o también llamada *Saccharomyces carlsbergensis*, presentes en las cervezas tipo Lager (28) y a la *Saccharomyces bayanus*, presente en el vino desarrollando a temperaturas de 6 - 12°C (29).

1.3 Levaduras.

Las levaduras son microorganismos eucarióticos unicelulares y están clasificadas dentro del Reino Fungi. Se reproducen por gemación, o por formación de esporas. Su identificación se basa no tanto en criterios morfológicos, sino generalmente en criterios fisiológicos (30). Especialmente por su capacidad para transformar los hidratos de carbono en alcohol y CO₂ a través de fermentación, que es uno de sus principales usos en la industria de los alimentos (1, 2, 3)

El desarrollo y crecimiento de las levaduras siempre dependerá de ciertos parámetros tales como Temperatura, Aw, pH, propiedades nutritivas del sustrato, disponibilidad de oxígeno, y presencia de sustancias inhibidoras (3).

Estos microorganismos, las levaduras, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y juega un papel importante en la dinámica biológica y química de los seres vivos, agua y suelos (1).

1.3.1 Caracterización Morfológica.

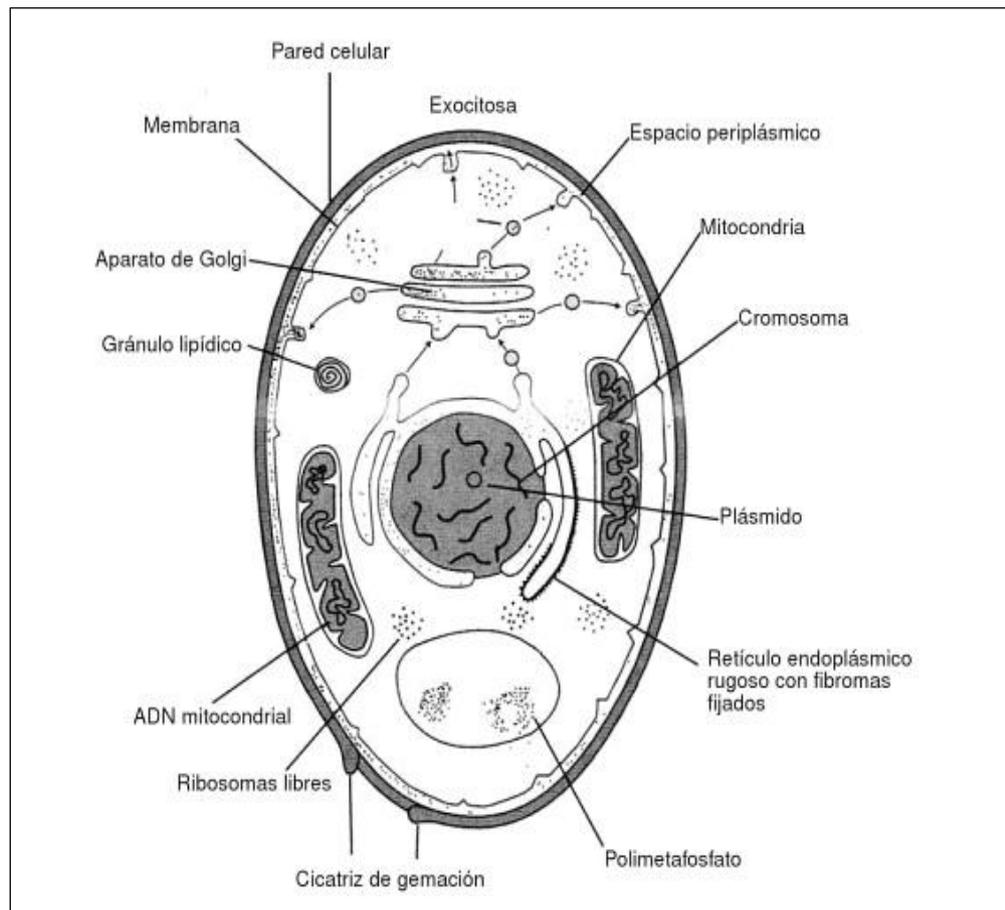
Las características macro y micromorfológicas son importantes para la identificación de las levaduras (31). Bajo el criterio macroscópico se toma en consideración el aspecto que toman las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. Las levaduras son colonias más cremosas y de diferentes colores que van desde el blanco hasta el naranja, esto se debe a que algunas contienen carotenoides (32). Las colonias de levaduras suelen ser completas ligeramente abombadas, de consistencias mantecosas, lisas o rugosas, cambiando su consistencia con la edad (32).

Desde su punto de vista microscópico, sus células tienen forma y dimensiones diversas, desde las esféricas ovoides y elipsoidales, a

las cilíndricas que pueden ser muy alargadas y filamentosas. Y en un tamaño de alrededor de 5 a 10 μ m de longitud, de 5 a 7 μ m de ancho, pero hay ciertas excepciones en el rango desde 2.5 a 21 μ m (33). Aunque el tamaño promedio varía de acuerdo a la etapa del ciclo de crecimiento, las condiciones de crecimiento y la edad de la célula (1).

Para poder apreciar los tipos de esporas, se les brinda el medio y las condiciones óptimas para su desarrollo con el objeto de fomentar la esporulación.

Las levaduras están compuestas de las siguientes partes: Pared Celular, Membrana Plasmática, Citoplasma y Núcleo, partes que se observan en la figura 1.1.



Fuente (34)

Figura 1.1 Célula de la Levadura

Algunas levaduras están cubiertas con una material extracelular limoso, viscoso, grueso, que es la sustancia capsular compuesto por polisacáridos (1).

Es importante mencionar que la pared celular en las levaduras, no solo les brinda la forma y estabilidad sino que también constituye una barrera permeable que juega un papel importante en el

intercambio de nutrientes y desechos. Esta está compuesta de β -glucanos y manoproteínas; y es en este lugar donde se encuentran numerosas enzimas que son responsables de un gran número de fenómenos (33).

La membrana citoplasmática funciona como una barrera osmótica, y está compuesta por fosfolípidos, proteínas y polisacáridos. El citoplasma contiene una sustancia citoplasmática de base o citosol, dentro del cual se encuentran los organelos como: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, las vacuolas, las mitocondrias y el núcleo y en él se encuentran las enzimas (1, 5).

El núcleo ha sido considerado como el centro de gobierno de las funciones celulares (5); se encuentra ubicado en el citoplasma y es un organelo protegido y bien definido por una membrana nuclear semipermeable, la que es funcional en el metabolismo y reproductor de la levadura (1).

La reproducción puede ser asexual por gemación, mediante la cual la célula progenitora reparte sus constituyentes celulares con una célula hija; y estas son iguales en madurez. O la reproducción sexual por formación de ascosporas que contienen esporas que

posteriormente se unirán a su otro par para formar una nueva célula (33, 34).

1.3.2 Fisiología.

Todo microorganismo tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones de ambiente, y las levaduras no son la excepción estas pueden metabolizar diversos nutrientes para asegurar de esta manera su viabilidad.

El catabolismo de azúcares es anaerobio (fermentación) o aerobio (respiración). El proceso más común es el catabolismo anaeróbico, también llamado fermentación alcohólica; cuyos productos finales son alcohol etílico y dióxido de carbono (35):



En condiciones aeróbicas, el catabolismo supone la utilización de oxígeno atmosférico.



En la respiración, la oxidación completa de la glucosa produce dióxido de carbono y agua mientras que la oxidación incompleta da lugar a la acumulación de ácidos y productos intermediarios. Cabe recalcar que la degradación de los diferentes sustratos orgánicos va a depender de las especies de levaduras (1).

La temperatura de crecimiento de la mayoría de levaduras está comprendida entre los 5 y 45°C; pero este trabajo el enfoque está en las levaduras psicrófilas, debido a que se desarrollan en un hábitat dónde predominan las temperaturas bajas. Por ejemplo *Cryptococcus albidus* que crece a temperaturas de hasta -18°C (5).

La mayoría de las levaduras se desarrolla de manera óptima en medios que disponen de gran cantidad de agua. Algunas son osmotolerantes y soportan una Actividad de Agua (Aw) del orden de 0.65, que es un valor al cual ningún otro microorganismo puede desarrollarse, este es el caso de la levadura *Zygosacharomyces rouxii*. (5, 36).

Las levaduras en su gran mayoría son aeróbicas, y aunque la disponibilidad de oxígeno afecta a todos los microorganismos y cuando no hay suficiente, las levaduras cambian a metabolismo anaeróbico. Y este es el caso de la *Kloeckera apiculata* que en

ambientes donde el oxígeno disminuye su metabolismo anaeróbico se manifiesta durante la fermentación alcohólica temprana en la elaboración de vinos (5, 34).

El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía de 4.5 a 6.5, aunque muchas especies toleran grandes variaciones de pH 2.8 – 3 a 2 – 8.5. El pH óptimo para que se realice la fermentación alcohólica es de 3.5 en el caso de la *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de cerveza (5, 34).

Las levaduras para su crecimiento necesitan fuentes de carbono y nitrógeno, y la asimilación de los mismos dependerá de la capacidad de estas para metabolizarlos (5, 35). El carbono se puede suministrar en forma de hidratos de carbono, y el nitrógeno en forma de ión amonio ($-NH_4$), también se puede adicionar peptona, urea, etc. El fósforo es otro elemento importante para procesos vitales de las levaduras, especialmente para la producción de etanol a partir de hidratos de carbono. Así mismo, como los anteriormente mencionados se tiene al potasio, ya que cumple funciones reguladoras en las levaduras, además de estimular la fermentación y la respiración. Por otro lado, se tiene al magnesio necesario para el funcionamiento de las enzimas durante el metabolismo, sobretodo activa enzimas glicolíticas (5, 35).

1.3.3 Uso en Alimentos

Desde tiempos ancestrales, el ser humano ha empleado sin saberlo a las levaduras y lo hizo fermentando de forma natural sus bebidas alcohólicas, panes, productos lácteos y cárnicos, etc. Recién a mediados del siglo XIX, Louis Pasteur explicó científicamente el fenómeno de la fermentación alcohólica, llevado a cabo por las levaduras y cuyo trabajo consistía en reducir los hidratos de carbono a CO_2 y alcohol (37).

Las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* son las responsables de la fermentación de las bebidas alcohólicas, tal es el caso de la producción de cerveza, que es una bebida alcohólica de sabor amargo que se fabrica con granos germinados, principalmente de cebada y centeno, a los que se le adiciona lúpulo, cuyos hidratos de carbono son fermentados en agua con levaduras de este género y su elaboración se basa en dos etapas, siendo la primera la obtención del mosto de la cerveza, previo a la inoculación de las levaduras; y la segunda la fermentación. Previo a la fermentación se macera la malta, que no es otra cosa que los granos de cebada y centeno germinados a los cuales se les adiciona agua hasta formar una pasta consistente. Esta mezcla acuosa se la calienta y se la filtra y se la hierve con el objeto

proporcionar aroma característico al mosto, frenar procesos enzimáticos anteriores y esterilizarlo de bacterias que hayan podido aparecer durante estas etapas que interferirían en la fermentación. Después de esto se clarifica el mosto y se enfría y es en esta etapa cuando el mosto se encuentra entre los 15 – 20°C se inoculan las levaduras, además de que se airea el mosto para que comience la fermentación que dura varios días, este es un proceso exotérmico por lo que las cubas deben estar refrigeradas para mantener una temperatura constante y estable. Existen dos tipos de fermentación: la Fermentación Alta que corresponde a las levaduras flotantes como la *S. cerevisiae* tiene mayor actividad a temperaturas altas cercanas a los 25°C generando cervezas tipo Ale. Y la Fermentación Baja que corresponde a las levaduras que van al fondo como es el caso de la *S. carlsbergensis* la que mantiene la actividad fermentativa a temperaturas entre los 5 – 10°C por periodos de hasta más de una semana; produciendo cervezas tipo Lager. La maduración tiene un periodo de duración de tres a cuatro semanas, llegando hasta dos o tres meses; y una vez acabado el proceso de maduración, antes de ser envasada la cerveza es filtrada para eliminar los residuos sólidos que pueda llegar a tener (38).

En el caso de la elaboración de vino, el sustrato a fermentar ahora se trata de jugo de uva, la fermentación tiene como efecto la conversión de los carbohidratos del mosto en alcohol etílico. Los microorganismos capaces de realizarlo son las levaduras del género *Saccharomyces* y las especies más abundantes son la *S. cerevisiae* y la *S. bayanus*, otra levadura que interviene en el proceso de la fermentación primaria del mosto para la elaboración del vino es la *Kloeckera apiculata*, pero su población disminuye con la elevada concentración de alcohol etílico debido a la reducción de los carbohidratos. Las levaduras tales como la *Saccharomyces bayanus* que es la responsable de la producción de Sidra o la *Saccharomyces sake* una de las levaduras que interviene en la fermentación para obtener Sake, son ejemplos de fermentaciones alcohólicas sobre diferentes sustratos (39).

En la producción del Kéfir, que es una bebida hecha a partir de leche fermentada, ligeramente alcoholizada y espumante, donde las levaduras fermentan la lactosa con la subsecuente producción de alcohol y CO₂. La fermentación láctica de la leche es ocasionada por la *Saccharomyces kefir* y *Candida kefir*, quiénes junto con la *Kluyveromyces marxianus* que es una de las responsables de la formación de CO₂ proporcionándole al Kéfir sabor y aroma característico (40, 41).

En la industria de panificación, durante la fermentación del pan los carbohidratos son convertidos en CO₂ y alcohol etílico por las levaduras. El CO₂ formará las burbujas que posteriormente serán atrapadas por el gluten de trigo haciendo que la masa leude y aumente su volumen; siendo este el principal objetivo de la fermentación (42).

Las levaduras más reconocidas son las de la familia *Saccharomycetaceae*, que se las emplea industrialmente en la fabricación de cerveza, pan y vino. Estas levaduras han ganado protagonismo en la investigación biotecnológica que ha mantenido su uso tradicional, y ha innovado y mejorado los procesos de panificación y de producción de bebidas alcohólicas en la actualidad.

1.4 Hipótesis y Objetivos.

La hipótesis en este trabajo de graduación es que existen levaduras antárticas capaces de realizar procesos de fermentación e hidrólisis enzimáticas para degradar los sustratos Urea, Glucosa, Maltosa, Fructosa, Sacarosa, Lactosa, Glicerol, Almidón, Gluten, Caseína y Lípidos.

El objetivo principal es identificar por lo menos una cepa de levadura antártica con capacidad fermentativa o hidrolítica para degradar los diferentes sustratos.

El presente trabajo comprende el aislamiento, la caracterización y finalmente la identificación de las levaduras procedentes de muestras del suelo antártico; así como también, la determinación de su posible uso en la industria alimentaria evaluando su perfil hidrolítico y fermentativo frente a diferentes sustratos.

Para lograr el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener aislados de levaduras a partir de muestras ambientales de la Antártida, utilizando protocolos basados en el empleo de medios de cultivos selectivos tales como Patata Dextrosa Agar (PDA) más el uso de antibióticos como el cloranfenicol.
2. Caracterizar los aislados de levaduras utilizando métodos visuales macroscópicos y microscópicos, así como también pruebas bioquímicas.
3. Identificar los aislados de levadura mediante el uso de protocolos de biología molecular para la extracción de ADN y técnicas como el PCR y su posterior secuenciación

mediante el empleo de herramientas informáticas como BLAST.

4. Evaluar el potencial fermentativo e hidrolítico empleando los métodos del Auxonograma modificado y el Método de Yarrow.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención de Muestras Antárticas.

Muestras de suelo fueron recolectadas en las Islas Torres y Greenwich provenientes de la expedición a la Antártida, como se observa en la figura 2.1, y se transportaron a las instalaciones de los laboratorios del CIBE.



Figura 2.1 Toma de Muestras de suelo en la Antártida.

Para el aislamiento de levaduras se sembró 1g de muestras de suelo en los medios de cultivo: Trycase Soya Agar (TSA), Potato Dextrosa Agar (PDA), Saboraud Dextrosa Agar (SAB) y Yeast Extract Agar, los cuales se observan en la figura 2.2.

Se obtuvieron 27 aislados de levaduras de los cuales fueron identificados molecularmente en base a su morfología microscópica.

De los cuales solo se utilizaron 7 para el trabajo de graduación, debido a la extensión de su desarrollo y a la repetición de las especies.



Figura 2.2 Medios de Cultivo para Aislamiento de Microorganismos de la Antártida.

2.2. Aislamiento e Identificación de Levaduras.

Para el estudio se utilizó muestras sembradas en el medio Patata Dextrosa Agar a pH 4.6 también conocido como PDA, que promueve el crecimiento de levaduras debido a que su pH inhibe parcialmente el crecimiento de la flora bacteriana. Luego se procedió a re-sembrarlas en el mismo medio de PDA adicionándole Cloranfenicol, este último fue empleado como antibiótico para inhibir crecimiento bacteriano permitiendo de esta manera realizar el recuento colonial de levaduras.

Medio de Cultivo

Se preparó PDA utilizando lo establecido por la casa comercial, 39 g/l, se disolvió el PDA en agua ultra pura, se agitó y calentó a 80°C, cuando estuvo disuelto y tomó un color traslúcido, se autoclavó a 121°C por 15 minutos. La solución obtenida tuvo un pH de 4.6 ± 0.2 a 20°C.

Luego, se dejaba enfriar y se dosificaba en cajas Petri, el agar tomaba un color marrón amarillento traslúcido y era rotulado con la fecha y el nombre del medio.

Las cajas se incubaron a $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante cinco días, hasta obtener colonias de levaduras.

Siendo el PDA el medio de cultivo que se empleó para el crecimiento de levaduras, a este se le adicionó una solución de antibiótico, cloranfenicol al 5%.

Y la solución de antibiótico se preparó, disolviéndolo en agua ultra-pura hasta obtener una solución que luego era filtrada con un nanofiltro y posteriormente era adicionada al medio de cultivo antes de ser dosificado en las cajas Petri.

Luego de la dosificación en cajas, el agar tomaba un color marrón amarillento traslúcido y era rotulado con la fecha y el nombre del medio.

2.2.1. Identificación Macroscópica.

Los parámetros que se observaron en las colonias fueron el tamaño, aspecto, consistencia y coloración. Todo esto se realizó de manera visual; así como se observa en la figura 2.3.



Figura 2. 3 Identificación Macroscópica de los Aislados de Levaduras

En términos generales las colonias de levaduras presentaron una forma circular ligeramente abombadas, con los bordes continuos y bien definidos además, se percibieron con una consistencia cremosa, lustrosa que se volvió rugosa a medida que envejecían, presentando también colores y su crecimiento en placa se vio en alto relieve, presentando una textura poco elevada.

2.2.2. Identificación Microscópica.

Para esto se empleó el microscopio óptico y su objetivo de inmersión, como se puede apreciar en la figura 2.4, lo que permitió determinar características microscópicas relacionadas con la forma de la célula, morfología, tamaño, etc.

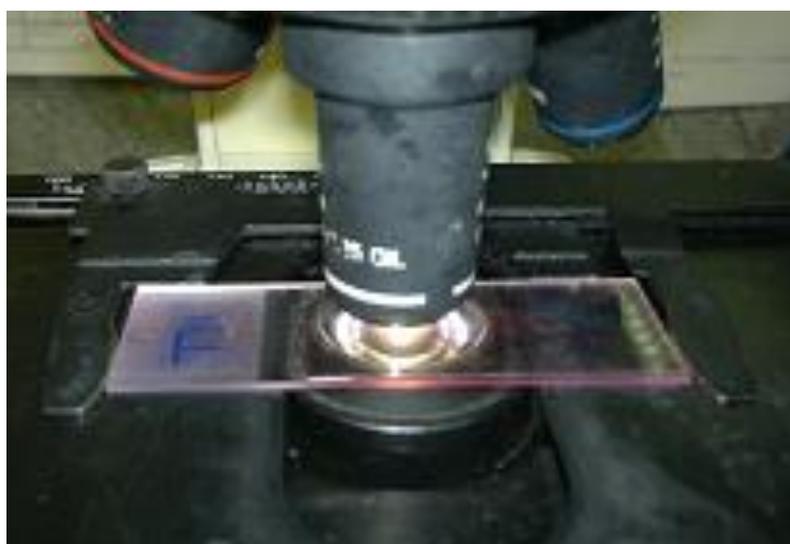


Figura 2.4 Microscopio con Lente de Inmersión 100x y Tinción GRAM.

Tinción GRAM

Permitió determinar diferentes formas, agrupaciones y dimensiones. Se fijaron las muestras al calor, como se aprecia en la figura 2.5 y se tiñeron con los colorantes cristal violeta (1%) y safranina (0.5%), así como también, se adicionó una solución mordiente de lugol (1% I₂ y 2% IK) y una solución decolorante de etanol-acetona (1:1), en el orden detallado a continuación: se aplica sobre el frotis, cubriendo la solución de cristal violeta (60 segundos), se enjuaga con agua ultrapura y posterior a esto se aplica sobre este, lugol (60 segundos) y este es lavado con la solución de etanol-acetona (20 segundos). Posteriormente, se enjuaga con agua ultra pura y se adiciona sobre el frotis la solución de safranina (60 segundos) que a su vez será enjuagada finalmente con agua ultrapura.

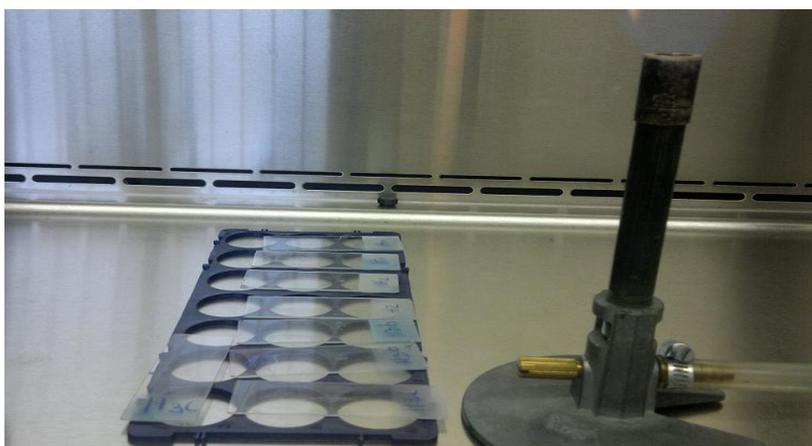


Figura 2.5 Frotis de los Aislados previo a Tinción GRAM

Luego del secado de la lámina portaobjeto, se coloca el cubreobjeto con una gota de aceite de inmersión para observarlo en el microscópico con el objetivo de 100x (30).

Tinción de Esporas

El método empleado fue el de Wirtz-Conklin, que se fundamenta en los contrastes brindados por los colorantes verde malaquita (5%) y safranina (0.5%); el primero tiñe las esporas en caliente y el segundo crea contraste y tiñe las formas vegetativas.



**Figura 2.6 Adición del Colorante Verde Malaquita
Tinción de Esporas.**

Se preparó un frotis, el cual se cubre con papel filtro y se adiciona colorante verde malaquita, como se puede apreciar en la figura 2.6 y se lo calienta sobre el mechero por 5 minutos. Después de que

se enfrió el portaobjeto se lo enjuaga con agua ultrapura, para eliminar residuos visibles del colorante, posterior a esto se le agregó el colorante safranina por un minuto de exposición, después se enjuagó con agua ultrapura y se dejó secar para visualizarlo en el microscopio con el objetivo de 100x (30).

2.2.3 Identificación Bioquímica.

La identificación bioquímica se basó en la asimilación de nutrientes, estuvo basado en el método del Auxonograma (30, 32), el cual se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, sobre un medio base para apreciar el crecimiento selectivo de las levaduras en presencia de los nutrientes necesarios para su desarrollo y evolución, como es el caso de los hidratos de carbono; como se observa en la figura 2.7.



Figura 2.7 Medios de Cultivo con diferentes Carbohidratos.

Se preparó el medio de cultivo líquido utilizando agua ultra pura y disolviendo en ella Sulfato Amónico (5 g/l), Fosfato Monopotásico (1 g/l), Sulfato de Magnesio (0.5 g/l), se agitó y calentó a 80°C, cuando estuvo disuelto y tomó un color traslúcido, se agregó la fuente de carbono en una concentración de 20 g/l.

Como fuentes de carbono, se utilizaron azúcares simples tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos como sacarosa, maltosa y lactosa, y polisacáridos como el glicerol que es un alcohol.

La fermentación de los azúcares se la evaluó utilizando campanas de Durham y la hidrólisis se la evaluó mediante la aparición de halos en un medio de cultivo sólido. La incubación se realizó por 21 días a temperatura de 20°C±5°C.

Adicional a esto, se realizaron las pruebas de actividad enzimática, la ureasa y actividad de la catalasa, enzimas presentes en ciertos microorganismos. Para determinar la ureasa se empleó un medio con la siguiente composición: Nutrient Broth 6.7g/l, Glucosa 20g/l, Agar 18 g/l, ClNa 18 mg/l, Urea 1 g/l, Rojo de Fenol 10 mg/l. Teniendo un pH de 6.8±0.2 a 20°C, autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Después de la inoculación en las cajas Petri, se incubaron a $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, las mismas que fueron monitoreadas cada 6 horas por un lapso de 2 días (30).

Para determinar la actividad de la catalasa se empleó una placa con colonias de levaduras y se aplicaron un par de gotas de peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, 10 volúmenes sobre la colonia de levadura, y se observaron la presencia o ausencia de burbujas (30).

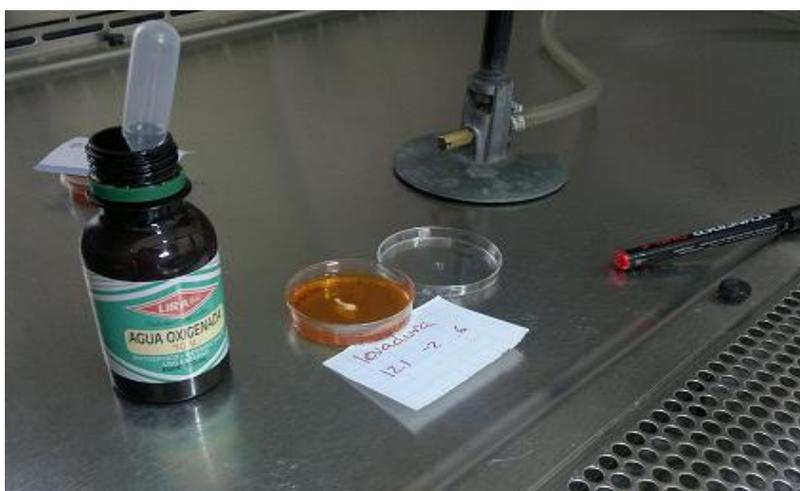


Figura 2.8 Prueba de la Catalasa en Levadura PDA

12.1 -2 6.

2.2.4 Identificación molecular.

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit UltraClean® de MO BIO Laboratories, Inc. Las Regiones ITS1 e ITS2 fueron amplificadas por PCR (43) y secuenciadas en un laboratorio externo. La secuencia de nucleótidos fue alineada usando BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La identificación se basó en un nivel de identidad de mínimo 98%.

Extracción de ADN

El Kit de UltraClean® de MO-BIO Laboratories, Inc. fue empleado para la extracción de ADN, en donde las células de las levaduras se suspenden en una solución y son añadidas a un tubo que contiene perlas y estas logran la lisis de las células mediante una combinación de calor, químicos y fuerza mecánica. El material genético liberado de las células es llevado a un filtro giratorio de sílica donde es lavado y recuperado en un buffer de Tris libre de ADN. Este kit contiene los siguientes compuestos: MicroBead solution, solution MD1, solution MD2, solution MD3, solution MD4 y solution MD5, como se aprecia a continuación en la figura 2.9.



Figura 2.9 Reactivos del Kit para Extracción de ADN.

Se utilizaron cepas de levaduras que estaban sembradas en Cajas Petri con PDA, tomando las muestras necesarias a emplear en el Kit de UltraClean® para la extracción de ADN, y se siguieron los pasos a continuación:

1. Adicionar 1.8 ml de cultivo microbiano en un Tubo recolector de 2 ml que será centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y volver a centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos.
2. Resuspender el sedimento de células en 300 µl de MicroBead Solution y agitar en el vortex. Transferir el sedimento de células al MicroBead Tube.
3. Adicionar 50 µl de Solution MD1 en el MicroBead Tube.

4. Asegurar el MicroBead Tubes y agitar horizontalmente a máxima velocidad por 10 minutos.
5. Centrifugar los tubos a 10.000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a un Tubo Colector de 2 ml. Espere 300 o 350 μ l de sobrenadante.
7. Adicionar 100 μ l de Solution MD2 al sobrenadante. Agite en un vortex por 5 segundos y luego refrigerar a 4°C por 5 minutos.
8. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por un minuto a 10.000 x g.
9. Transferir el volumen completo de sobrenadante a un tubo colector de 2 ml limpio, evitando el sedimento. Espere aproximadamente 450 μ l de sobrenadante.
10. Agitar para mezclar la Solution MD3 antes de usarla y agregar 900 μ l al sobrenadante para luego agitar en el vortex por 5 segundos.
11. Cargar unos 700 μ l en el Spin Filter y centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Adicionar el sobrenadante remanente al Spin Filter y centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.

12. Adicionar 300 μ l de Solution MD4 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g.
13. Descarte el líquido y centrifugar a temperatura ambiente por un minuto a 10.000 x g.
14. Tener cuidado de no salpicar el líquido en la canasta del filtro de centrifugación, trasladar el Spin Filter en un nuevo Tubo colector.
15. Adicionar 50 μ l de Solution MD5 en el centro del filtro de membrana blanco.
16. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g.
17. Descargar el Spin Filter. El ADN contenido en el tubo está ahora listo para su cuantificación o puede ser almacenado a 4°C si se realiza la cuantificación de inmediato o se lo guarda a -20°C.



**Figura 2.10 Preparación de Suspensión de Aislado de Levadura
Previo al Protocolo de Extracción de ADN**

La cuantificación de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con solución SYBR Safe®. El gel se reveló bajo una lámpara UV, equipo transiluminador ChemiDoc XRS System de BIO-RAD.

PCR

Se emplearon cebadores ITS1 (59 –TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 39) e ITS4 (59–TCCTCCGCTTATTGATATGC–39), como se puede apreciar en la figura 2.11. La reacción de amplificación se

realizó según el protocolo de Invitrogen® para PCR donde se obtuvo un volumen final de 25 µl a las siguientes condiciones conteniendo 2 µl de ADN (10 – 50 ng/µl), 10X PCR buffer conteniendo 1.5 mM MgCl₂ y 0.02% BSA, 0.2 mM de dNTP, 0.4 µM de cada cebador y 0.5 U de Taq polimerasa, como se observa en la figura 2.12.

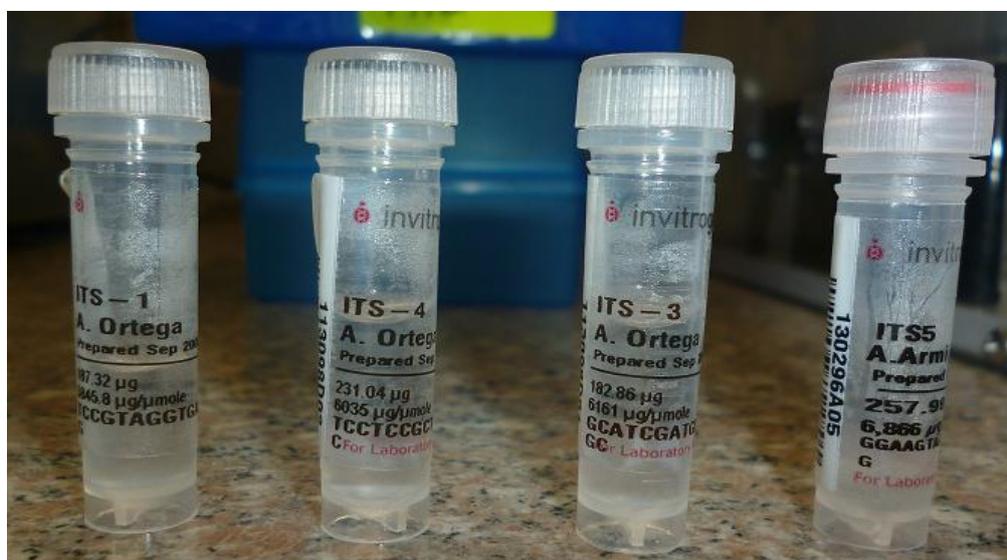


Figura 2.11 Cebadores ITS1 – ITS4 – ITS3 – ITS5.



Figura 2.12 Reactivos de PCR.

El perfil térmico empleado en el PCR fue paso de desnaturalización de 1 minuto a 94°C, seguido por 30 ciclos de 94°C por un minuto, 58°C por un minuto, 68°C por un minuto y una extensión final de 68°C por dos minutos; se lo realizó en un termociclador Eppendorf.

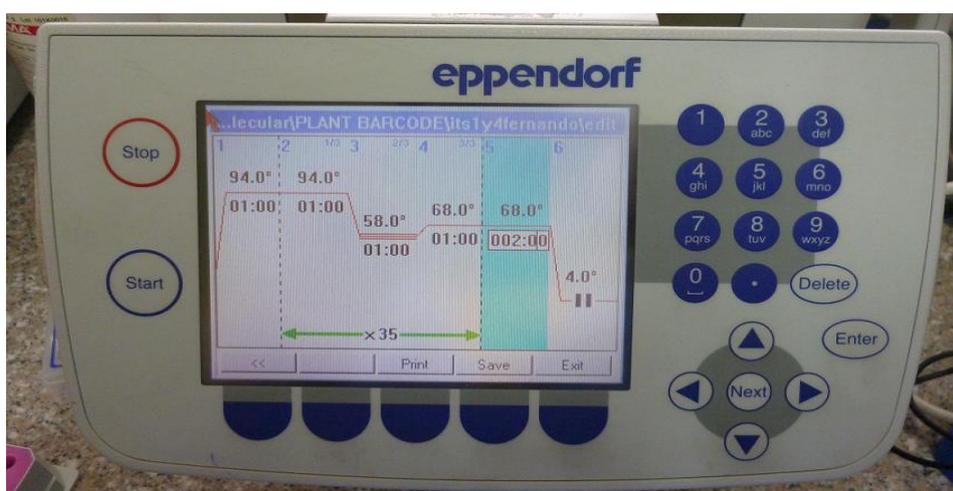


Figura 2.13 Termociclador Eppendorf con Perfil Térmico para PCR.

La longitud de los productos de PCR se visualizó en gel de agarosa al 1.5%, con solución SYBR Safe®. El gel se reveló bajo una lámpara UV, equipo transiluminador ChemiDoc XRS System de BIO-RAD.

Secuenciación

Los productos de PCR se secuenciaron en el laboratorio y se hizo a través de la secuenciación Sanger en los laboratorios de Cáncer and Genetics Research Center del Department of Molecular

Genetics & Microbiology del College of Medicine de la University of Florida.

Luego se empleó el software de MEGA6 o Molecular Evolutionary Genetics Analysis, que es una herramienta integrada para la realización de la alineación de secuencias, inferir árboles filogenéticos, así como muchas otras aplicaciones.

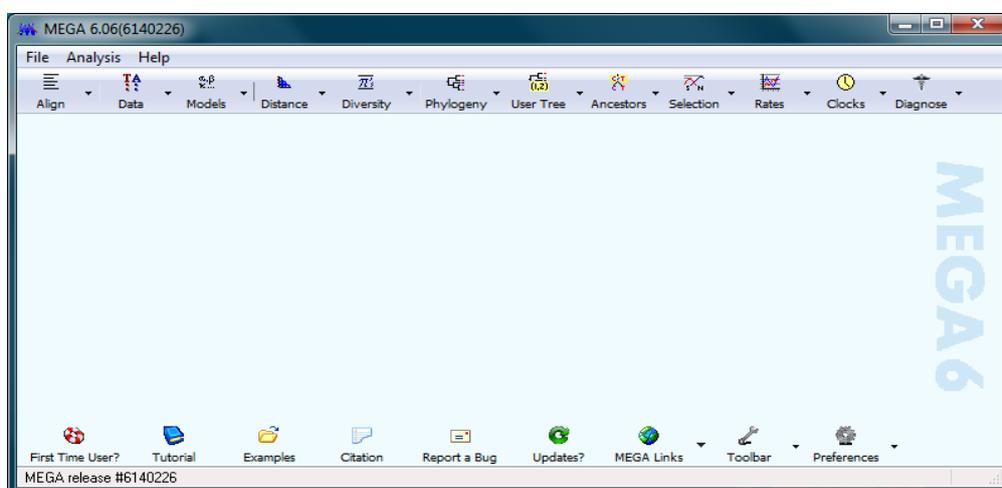


Figura 2.14 Programa MEGA6.

Las secuencias fueron ingresadas en el MEGA6, en la opción Align, donde se escoge Edit/View Sequencer Files (trace), para introducir la información que una vez que está ingresada, se muestra en una pestaña diferente el gráfico de la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN, como se aprecia en la figura 2.15, que posteriormente es trasladada al programa online BLAST,

Basic Local Alignment Search Tool, que es una herramienta informática que permite el alineamiento de secuencias de ADN, ARN o de proteínas. En este caso se escogió la opción nucleótidos de ADN para que compare la secuencia o query contra las secuencias indexadas en una base de datos de la NCBI, que es el National Center for Biotechnology Information que provee la información genómica mediante el acceso online.

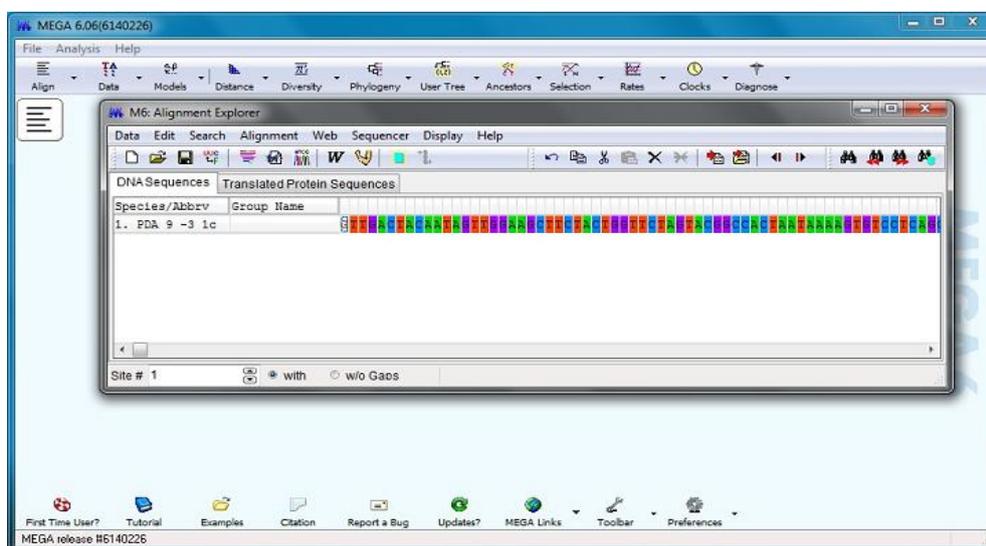


Figura 2.15 Ingreso de la secuencia de ADN de PDA 9 -3 1c.

Del BLAST se obtuvieron los resultados de la comparación de las secuencias para identificar a cual género y especie pertenece la levadura aislada. De esta manera se seleccionó un banco de secuencias que tienen hasta un 98% de nivel de identidad, los

cuales son agregados para elaborar un árbol filogenético en el programa MEGA6, como se observa en la figura 2.16.

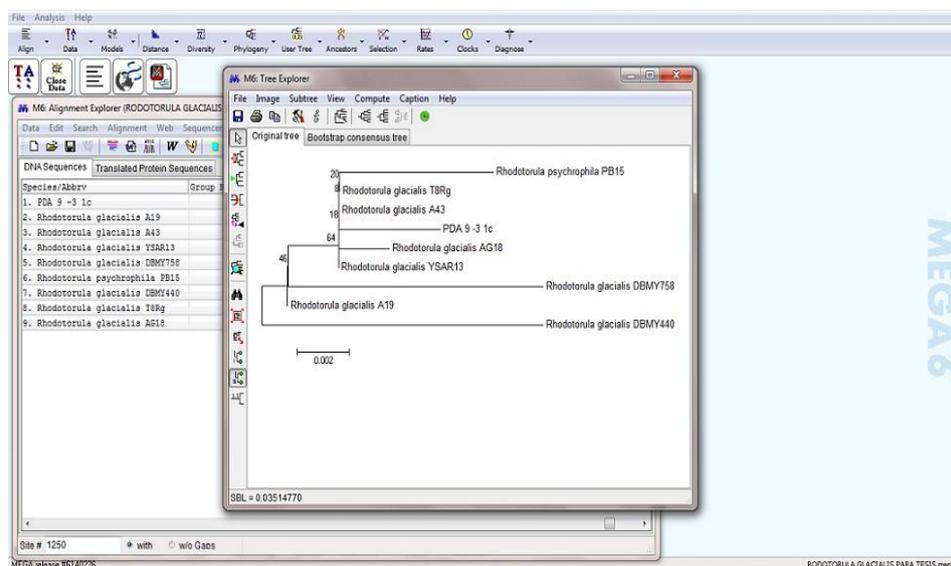


Figura 2.16 MEGA6 Árbol Filogenético de *Rhodotorula glacialis*.

2.3 Evaluación del potencial de las levaduras en la industria de los alimentos.

Las levaduras poseen una gran importancia en la industria de los alimentos por su estrecha relación con el ser humano desde hace aproximadamente 5.000 años (44), todo esto debido a la producción de pan, cerveza, vinos, embutidos, quesos, etc.

Estos microorganismos aportan características organolépticas, en muchas ocasiones útiles, como es el caso en la elaboración de bebidas alcohólicas o en la industria de la panificación.

Las levaduras son capaces de transformar los hidratos de carbono en alcohol y esto lo logran mediante la fermentación alcohólica, que es un bio-proceso, donde los carbohidratos o azúcares son convertidos en alcohol (etanol), dióxido de carbono (CO_2) y ATP.

Para evaluar el potencial fermentativo se emplearon seis hidratos de carbono:

1. **Glucosa.**- Monosacárido con fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
2. **Fructosa.**- Monosacárido isómero de la glucosa.
3. **Sacarosa.**- Disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de fructosa con fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.
4. **Maltosa.**- Disacárido formado por dos moléculas de glucosa. Isómero de la sacarosa.
5. **Lactosa.**- Disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa. Isómero de la sacarosa
6. **Glicerol.**- Es un alcohol de tres grupos hidroxilos (-OH), también llamado propanotriol o glicerina con fórmula molecular ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), es un producto obtenido de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo al Ciclo de Krebs y también se genera en la fermentación alcohólica.

Se realizaron pruebas bioquímicas en diferentes medios de cultivo para cada sustrato a evaluar, los sustratos empleados fueron: almidón de yuca, almidón de Maíz, gluten, caseína y marva, para evidenciar la capacidad hidrolítica de las levaduras.

2.3.1 Potencial Fermentativo.

Se emplearon las cepas de levaduras obtenidas y se utilizó como control positivo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que sigue un metabolismo fermentativo cuando está en condiciones anaeróbicas. Se utilizó el método del Auxonograma modificado (30, 32), el cual se empleó para la identificación bioquímica y fue tratado en el punto 2.2.3.

2.3.2 Potencial Hidrolítico.

Para evidenciar la presencia de amilasas, se emplea el siguiente medio sólido: Yeast Nitrogen Base (YNB) 6.7 g/l, Almidón 2 g/l, Agar 18g /l a un pH de 6.0 (45, 46).

Para evidenciar la presencia de proteasas, se emplea el siguiente medio sólido: Yeast Nitrogen Base (YNB) 6.7 g/l, Glucosa 20 g/l, Gluten/Caseína 20 g/l, Agar 18 g/l a un pH de 6.5 (45, 46).

Para evidenciar la presencia de lipasas, se emplea el siguiente medio sólido: Peptona 5 g/l, Yeast Extract 3 g/l, Margarina 10 g/l, Agar 18 g/l a un pH de 6.0 (45, 46).

Estos diferentes medios fueron preparados en agua ultrapura, posteriormente se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. El llenado de cajas Petri se lo realizó en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.

Se realizaron pruebas bioquímicas en diferentes medios de cultivo para cada sustrato a evaluar. Se empleó como control positivo *Bacillus subtilis*, para evidenciar la capacidad hidrolítica de las levaduras sobre los diferentes sustratos.

Se inoculó la muestra de levaduras en una cámara de flujo laminar, por duplicado, y después se incubaron las cajas Petri a 20°C ± 5°C, los mismos que fueron monitoreados cada 24 horas por un lapso de dos semanas. Para luego volver a repetir la prueba por duplicado.

Dentro de las pruebas enzimáticas para determinar la actividad lipolítica, donde se usó como sustrato marva, no se pudo realizar a cabalidad porque no se contó con un control positivo y se evidenció un escaso crecimiento de las diferentes especies de levaduras.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de Levaduras.

Se seleccionaron los siguientes cultivos, tal como es detallado a continuación en la tabla N° 1, donde los códigos fueron asignados por CIBE, para poder identificar las muestras obtenidas de los años 2011 y 2012, respectivamente.

Se utilizaron 7 aislados para el presente trabajo, debido a la extensión de su desarrollo y a la repetición de las especies.

TABLA N° 1
MUESTRAS DE LEVADURAS SELECCIONADAS

N°	Medio de Cultivo	Año	Código CIBE			Código de Caja Petri
			N° Muestra/Año	Dilución	Submuestra	
1	PDA	2011	9	10 ⁻³	1c	PDA 9 -3 1c
2	PDA	2011	3	10 ⁻³	1b.1	PDA 3 -3 1b.1
3	PDA	2012	12.2	10 ⁻²	12	PDA 12.2 -2 12
4	PDA	2012	12.1	10 ⁻²	6	PDA 12.1 -2 6
5	PDA	2011	8	10 ⁻²	1e	PDA 8 -2 1e
6	PDA	2012	12.2	10 ⁻³	2	PDA 12.2 -3 2
7	PDA	2011	4	10 ⁻¹	3c	PDA 4 -1 3c

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

Las levaduras presentaron características morfológicas similares en este medio de cultivo. Las colonias de levaduras presentaron características tales como colonias ligeramente abombadas o planas, de consistencia rugosa o lisa, y la similitud es que a medida de que transcurre el tiempo se vuelven más pastosas, esto se debe a su envejecimiento. A continuación, se presenta la tabla N°2 con las apreciaciones.

TABLA N° 2
MORFOLOGÍA DE LEVADURAS

Levadura	Morfología				Observaciones
	Forma	Textura	Color	Consistencia	
PDA 9 -3 1c	Redonda	Rugosa	Naranja Pálido	Cremosa	Colonias Abombadas
PDA 3 -3 1b.1	Redonda	Rugosa	Amarillo Pálido	Cremosa	Colonias Abombadas
PDA 12.2 -2 12	Redonda	Lisa	Blanco Amarillento	Mucoide	Colonias Planas
PDA 12.1 -2 6	Redonda	Lisa	Blanco	Cremosa	Colonias Planas
PDA 8 -2 1e	Redonda	Lisa	Blanco Amarillento	Mucoide	Colonias Planas
PDA 12.2 -3 2	Redonda	Lisa	Blanco	Mucoide	Colonias Planas
PDA 4 -1 3c	Redonda	Lisa	Blanco Amarillento	Mucoide	Colonias Planas

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

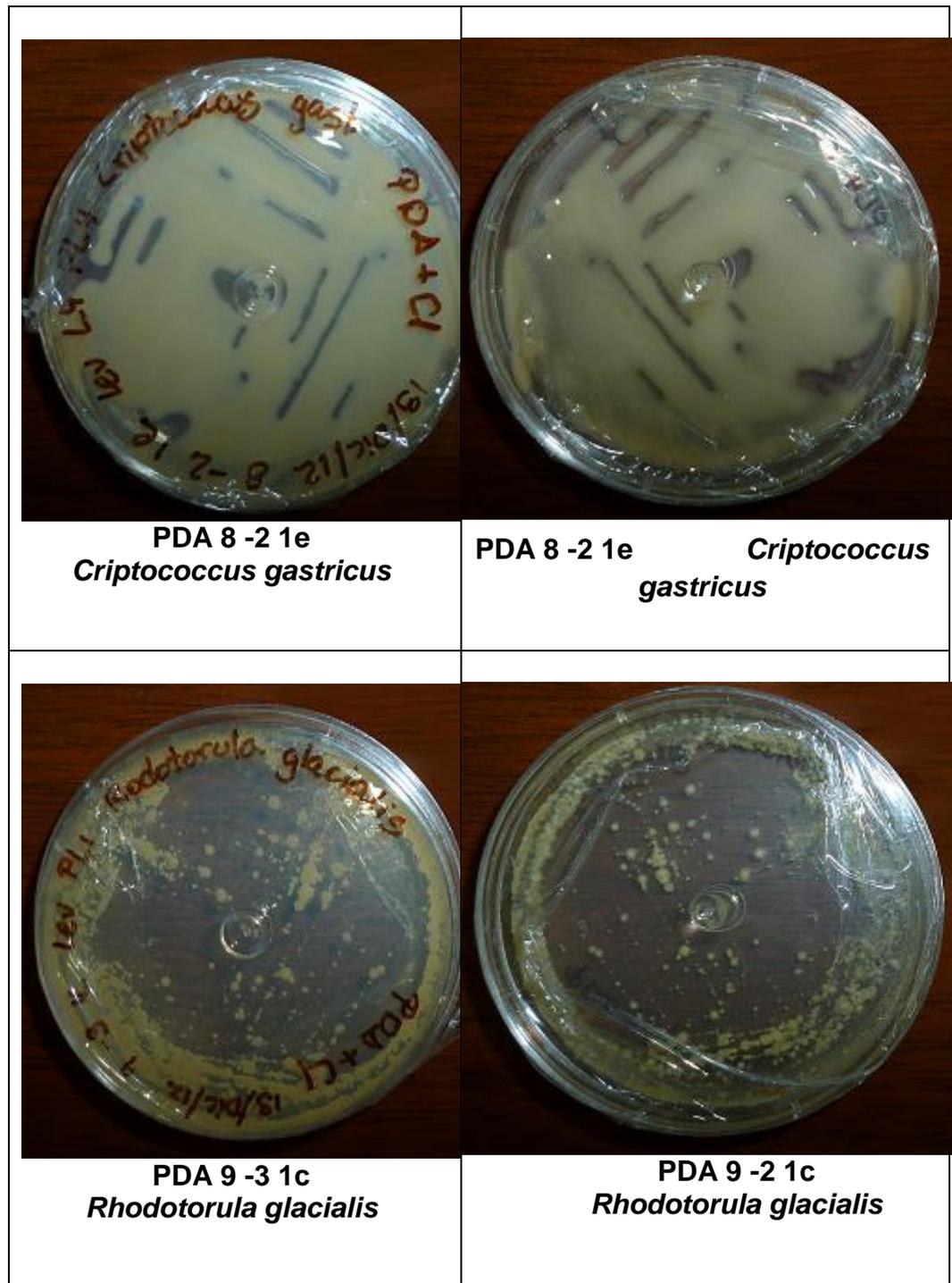


Figura 3.1 Ejemplos de Morfología Macroscópica de Levaduras.

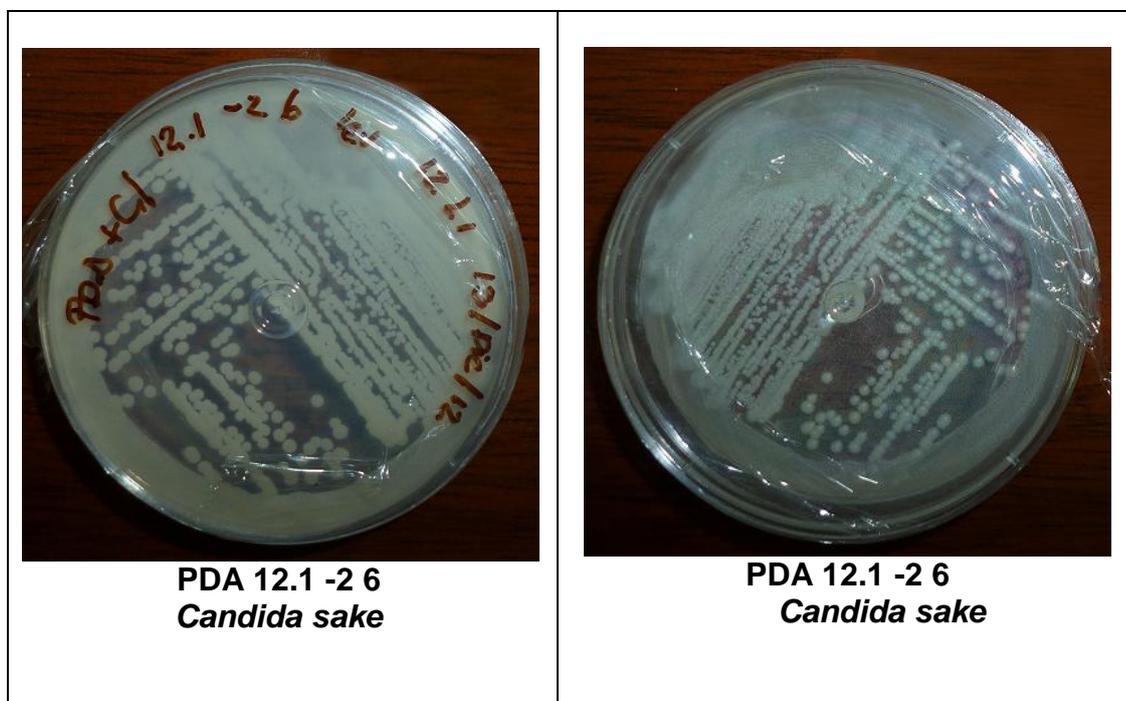


Figura 3.1 Ejemplos de Morfología Macroscópica de Levaduras

Aunque la tinción GRAM es específica para bacterias, se pudo visualizar que las levaduras se teñían de ambos colores, aunque la gran mayoría se tiñó de color violeta, dando un resultado dual. También a través de esta tinción se apreció el tamaño, como se puede apreciar en las figuras a continuación.

En cuanto a sus características microscópicas, las levaduras presentaron una forma ovoide, además se demostró la presencia de cápsula, que es de naturaleza polisacárida, que envuelve el conidio y que puede ser apreciada al hacer una tinción Gram, así como también una tinción

de esporas. La levadura de *Cryptococcus sp.* Y *Candida sp.* Se diferencian por tener células de forma ovoide que las del género *Rhodotorula sp.* que resultaron más alargadas.



Figura 3.2 Frotis de Muestras Previas a Tinción GRAM.

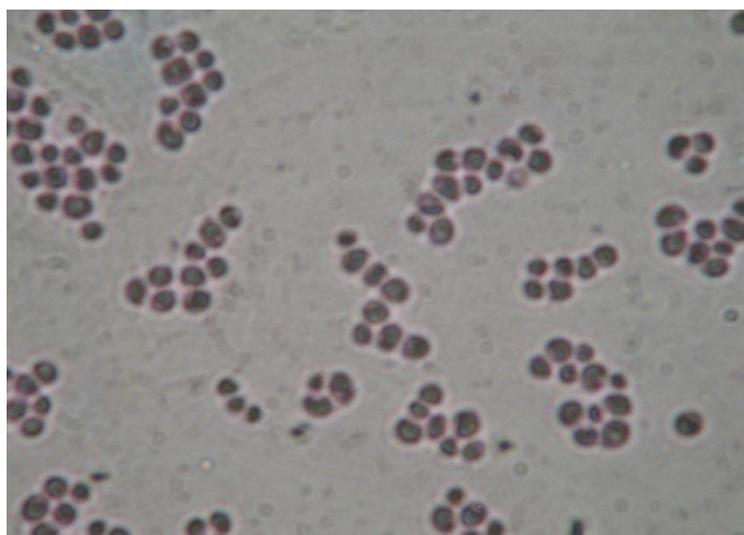


Figura 3.3 Tinción Gram de Levadura PDA 4 -1 3c.
Criptococcus sp.

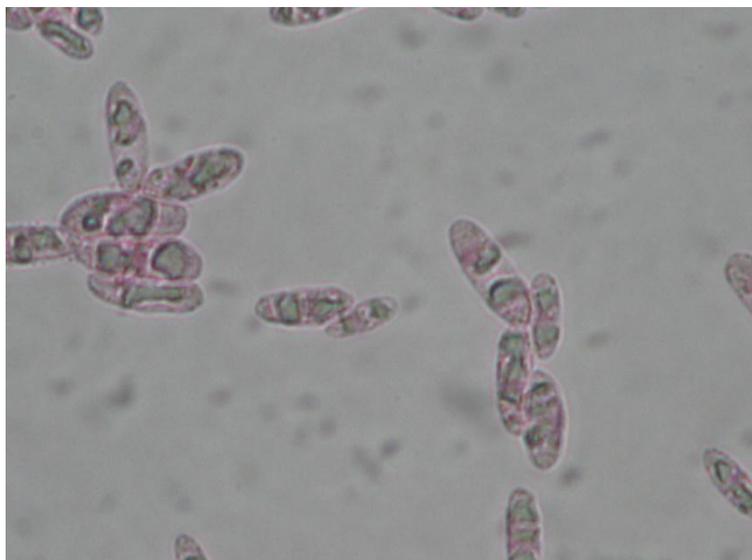


Figura 3.4 Tinción Gram de Levadura PDA 3 -3 1b.1
Rhodotorula sp.

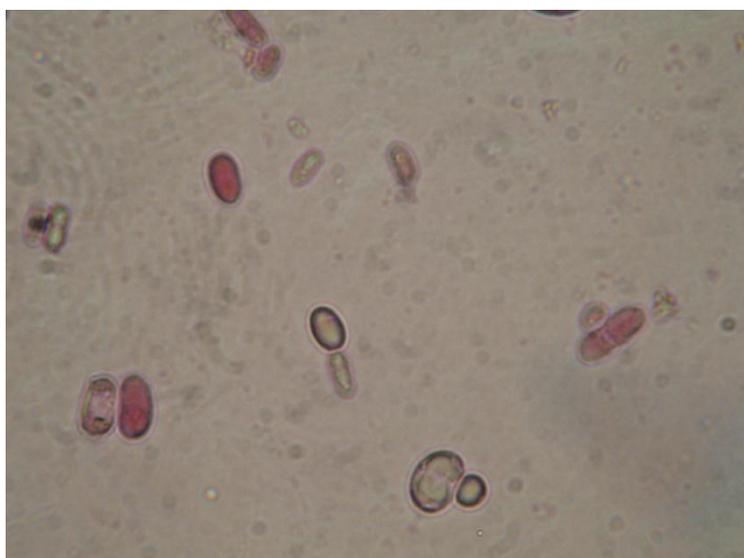


Figura 3.5 Tinción Gram de Levadura PDA 12.2 -2 12
Candida sp.



**Figura 3.6 Tinción Gram de Levadura PDA 12.1 -2 6
Gemación de *Candida sake*.**

Como parte del análisis de la morfología de las levaduras, se procedió a hacer tinción de esporas obteniendo los siguientes resultados, expuestos en la siguiente tabla N° 3.

TABLA N° 3

TINCIONES

N°	Levadura	Tinción	
		GRAM	Esporas
1	PDA 9 -3 1c	Dual	Si
2	PDA 3 -3 1b.1	Dual	Si
3	PDA 12.2 -2 12	Dual	Si
4	PDA 12.1 -2 6	Dual	Si
5	PDA 8 -2 1e	Dual	Si
6	PDA 12.2 -3 2	Dual	Si
7	PDA 4 -1 3c	Dual	Si

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

Como ejemplo de la formación de esporas se muestra la figura 3.7 donde se observa a la Levadura PDA 9 -3 1c.

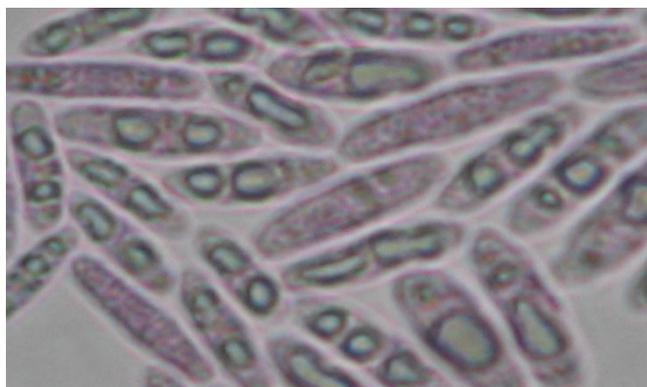


Figura 3.7 Tinción de Esporas de Levadura PDA 9 -3 1c
***Rhodotorula glacialis*.**

Identificación Molecular

La extracción de ADN de los aislados fue evaluada y cuantificada a través de la elaboración de un gel, cuyo resultado se lo puede apreciar en la figura 3.8. Posterior a eso se realizó el perfil térmico del PCR, como se observa el gel de agarosa en la figura 3.9; para obtener el mayor número de copias de un fragmento de ADN; cuyo resultado se muestra en la figura 3.10.

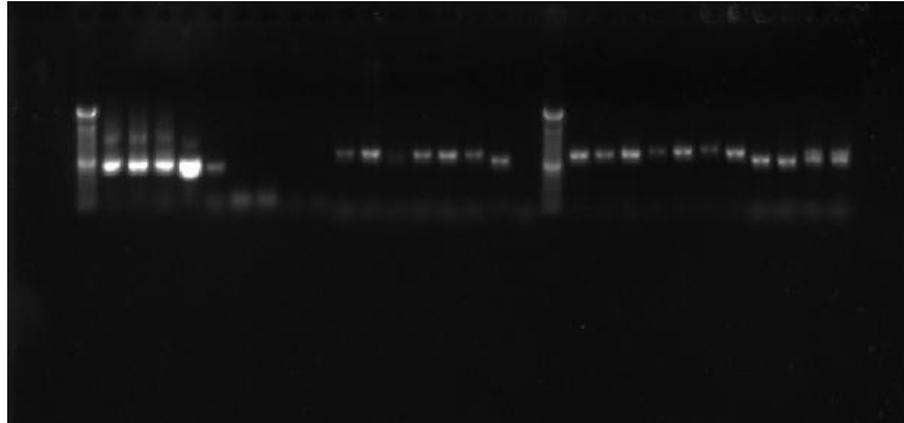


Figura 3.8 Gel de ADN.

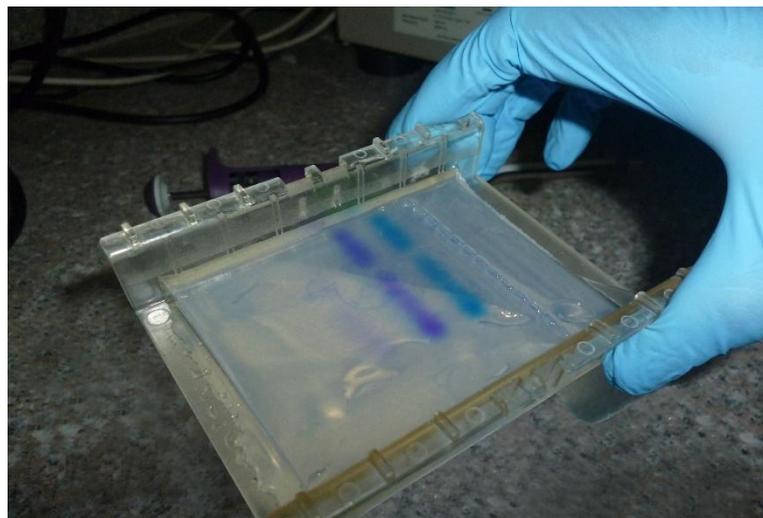


Figura 3.9 Gel de Agarosa.

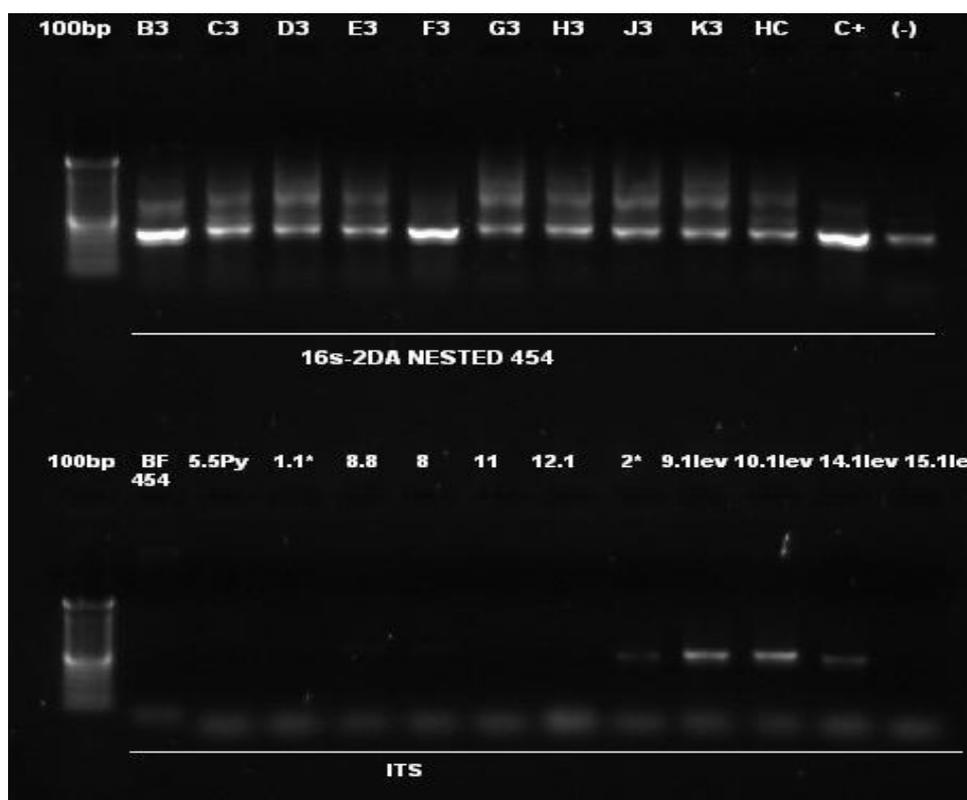
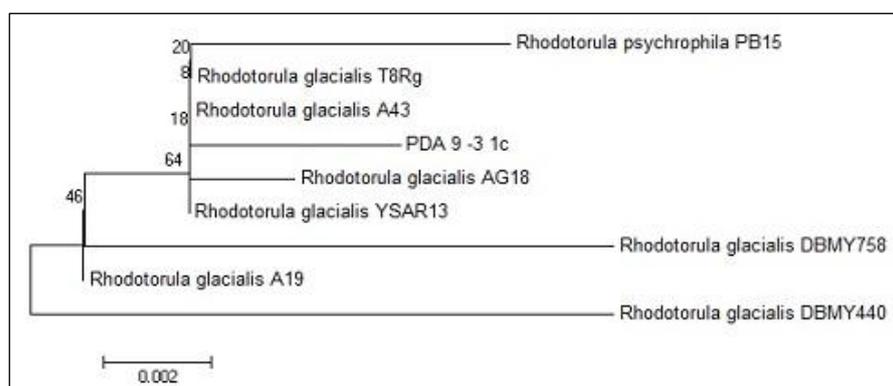


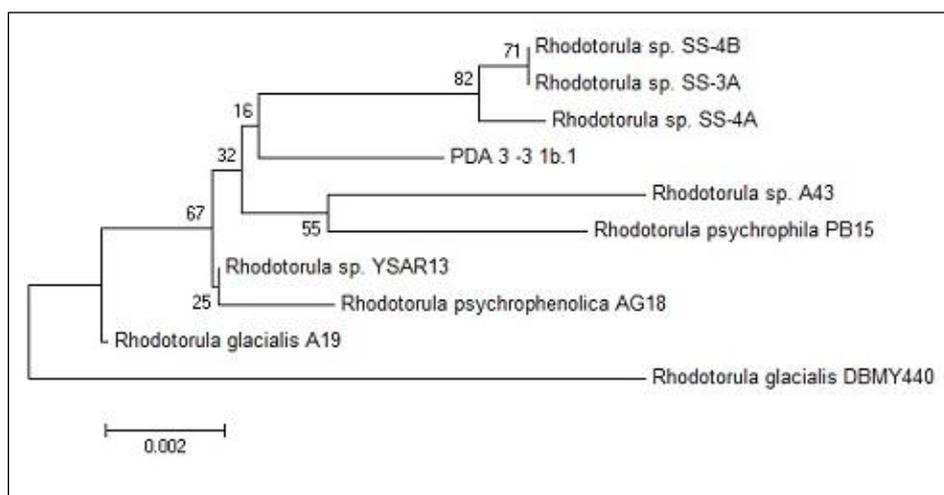
Figura 3.10 Gel de PCR.

Luego de obtener los resultados de la secuenciación de ADN de los diferentes aislados de levaduras antárticas enviados al laboratorio Cancer and Genetics Research Center del Department of Molecular Genetics & Microbiology del College of Medicine de la University of Florida, se procedió a compilar los datos en el programa Mega6 que es un software que permite realizar la alineación de las secuencias de nucleótidos e inferir árboles filogenéticos usando BLAST del National Center for Biotechnology

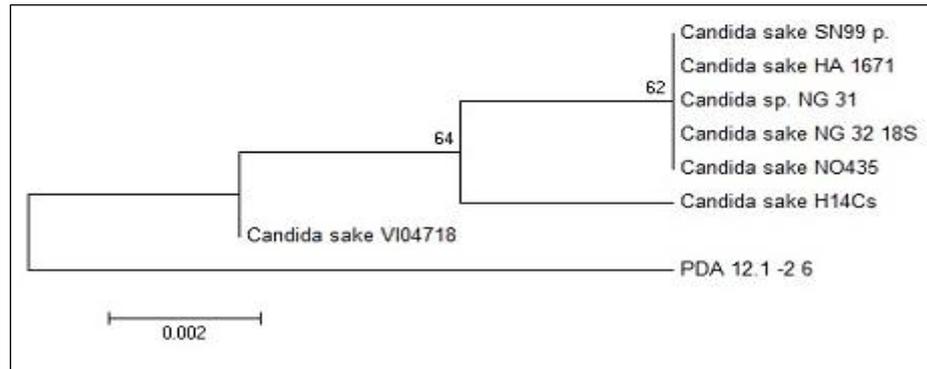
Information (NCBI). La identificación se basó en un nivel de identidad de mínimo 98%. Obteniéndose los siguientes resultados de los árboles filogenéticos que se muestran en las figuras subsecuentes 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 y 3.17.



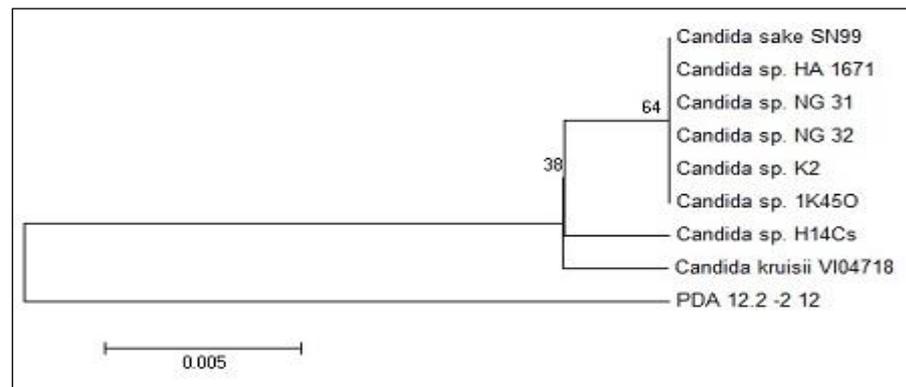
**Figura 3.11 Árbol Filogenético *Rhodotorula glacialis*
PDA 9 -3 1c**



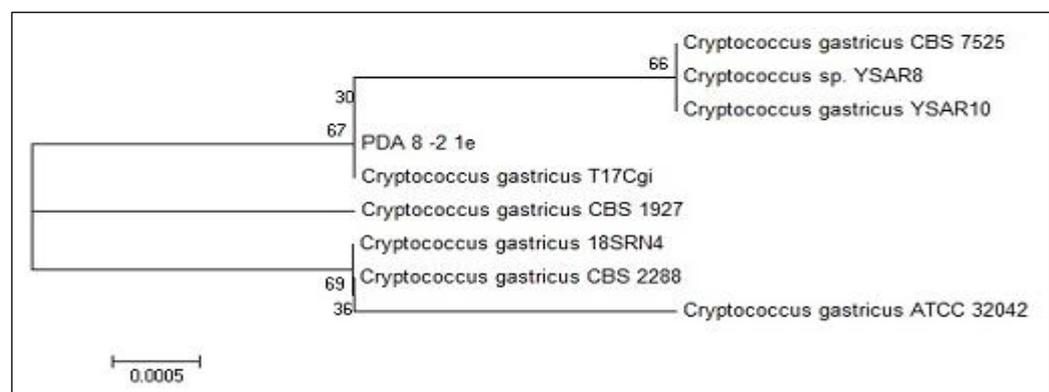
**Figura 3.12 Árbol Filogenético *Rhodotorula sp.*
PDA 3 -3 1b.1**



**Figura 3.13 Árbol Filogenético de *Candida sake*
PDA 12.1 -2 6**



**Figura 3.14 Árbol Filogenético de *Candida sp.*
PDA 12.2 -2 12**



**Figura 3.15 Árbol Filogenético *Cryptococcus gastricus*
PDA 8 -2 1e**

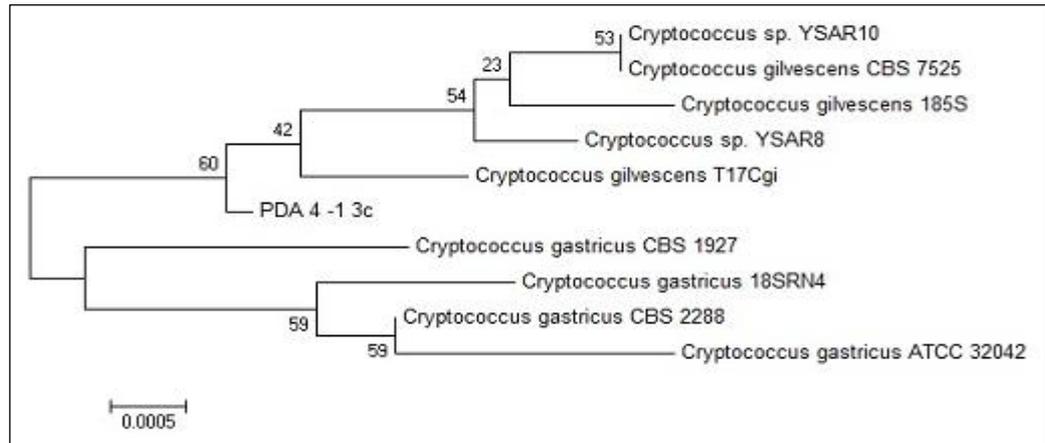


Figura 3.16 Árbol Filogenético *Cryptococcus* sp.
PDA 4 -1 3c

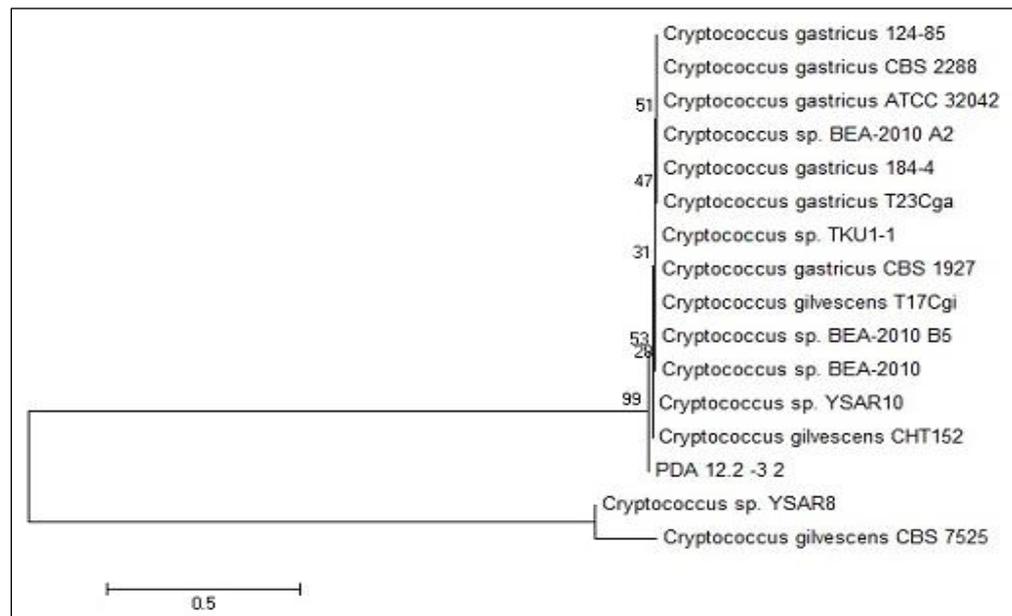


Figura 3.17 Árbol Filogenético *Cryptococcus* sp.*

PDA 12.2 -3 2

Cryptococcus gastricus, *Rhodotorula sp.*, *Rhodotorula glacialis*, *Candida sp.* y *Candida sake*. Siendo el aislado PDA 12.2 -3 2 el que no logró tener un porcentaje representativo de afinidad con una identidad del 96% y un query cover de 93%, por lo que es dudosa su especie y es clasificado como sp. En la tabla N°4, a continuación se detalla esta información:

TABLA N° 4

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR - AFINIDAD

N°	Levadura	Nombre	Porcentaje de Afinidad	
			Query Cover	Ident
1	PDA 9 -3 1c	<i>Rhodotorula glacialis</i>	98%	99%
2	PDA 3 -3 1b.1	<i>Rhodotorula sp.</i>	99%	99%
3	PDA 12.2 -2 12	<i>Candida sp.</i>	99%	100%
4	PDA 12.1 -2 6	<i>Candida sake</i>	98%	100%
5	PDA 8 -2 1e	<i>Cryptococcus gastricus</i>	100%	99%
6	PDA 12.2 -3 2	<i>Cryptococcus sp.*</i>	93%	96%
7	PDA 4 -1 3c	<i>Cryptococcus spp.</i>	99%	100%

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

3.2 Evaluación del Potencial Fermentativo.

Durante las Pruebas de Evaluación de Potencial Fermentativo se emplearon diferentes tipos de hidratos de carbono, tales como glucosa (GLU), fructosa (FRU), sacarosa (SAC), maltosa (MAL), lactosa (LAC) y glicerol (GLI), se adjunta tabla N°5 con los resultados.

TABLA N° 5
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE FERMENTACIÓN

N°	Azúcares						
	Levaduras	GLU	FRU	SAC	MAL	LAC	GLI
1	PDA 9 -3 1c	-	-	-	-	-	-
2	PDA 3 -3 1b.1	-	-	-	-	-	-
3	PDA 12.2 -2 12	-	-	-	-	-	-
4	PDA 12.1 -2 6	+	+	+	+	-	-
5	PDA 8 -2 1e	-	-	-	-	-	-
6	PDA 12.2 -3 2	-	-	-	-	-	-
7	PDA 4 -1 3c	-	-	-	-	-	-
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	+

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

La levadura con código PDA 12.1 -2 6 o *Candida sake*, fermenta los azúcares: glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, evidenciándose la formación de gas atrapado en el tubo o campana de Durham. Se utilizó como control positivo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que da resultados positivos para glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y glicerol; así como está detallado en la tabla N° 5 anteriormente expuesta.

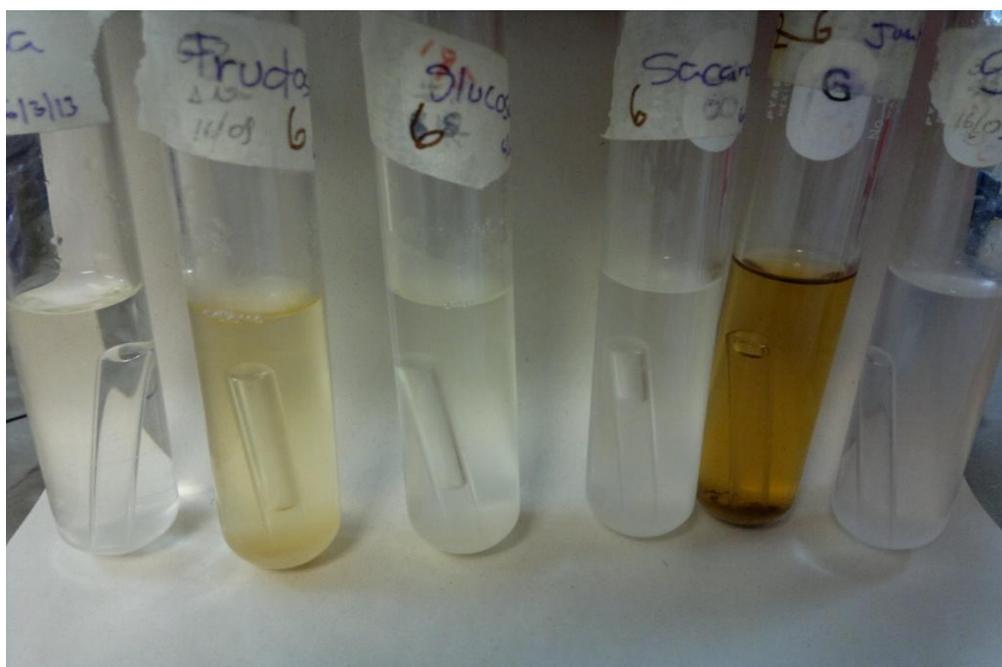


Figura 3.18 Resultados de PDA 12.1 -2 6, *Candida sake*

Prueba de Potencial Fermentativo

Los resultados de la actividad enzimática de ureasa y catalasa en las levaduras antárticas son descritos en la tabla N°6, donde todas las levaduras manifiestan una actividad catalasa positiva mientras que en la prueba de la ureasa el indicador rojo de fenol indicó como positivo tornándose rojo para las siguientes levaduras: *Rhodotorula sp*, *Rhodotorula glacialis*, *Cryptococcus sp.* y *Cryptococcus gastricus* y negativo para *Candida sp.* y *Candida sake*, tal como se lo detalla a continuación:

TABLA N° 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE UREASA Y CATALASA

N°	Levadura	Actividad			
		Ureasa	t' hr	Catalasa	t' s
1	PDA 9 -3 1c	Positiva	2	Positiva	60
2	PDA 3 -3 1b.1	Positiva	2	Positiva	30
3	PDA 12.2 -2 12	Negativa	2	Positiva	30
4	PDA 12.1 -2 6	Negativa	2	Positiva	30
5	PDA 8 -2 1e	Positiva	2	Positiva	60
6	PDA 12.2 -3 2	Positiva	2	Positiva	0
7	PDA 4 -1 3c	Positiva	2	Positiva	60

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

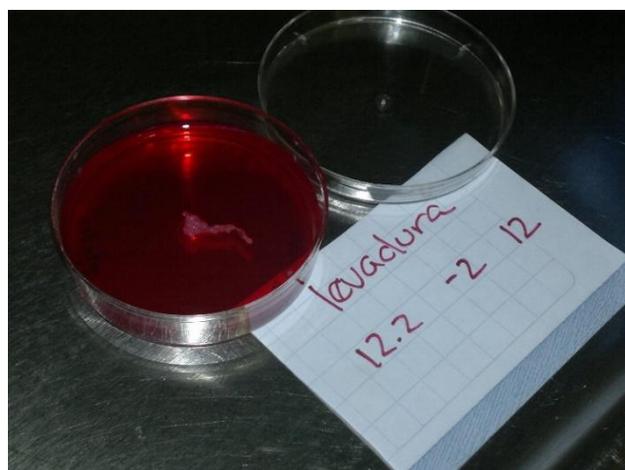


Figura 3.19 Prueba de Catalasa en Levadura *Candida sp.*

PDA 12.2 -2 12

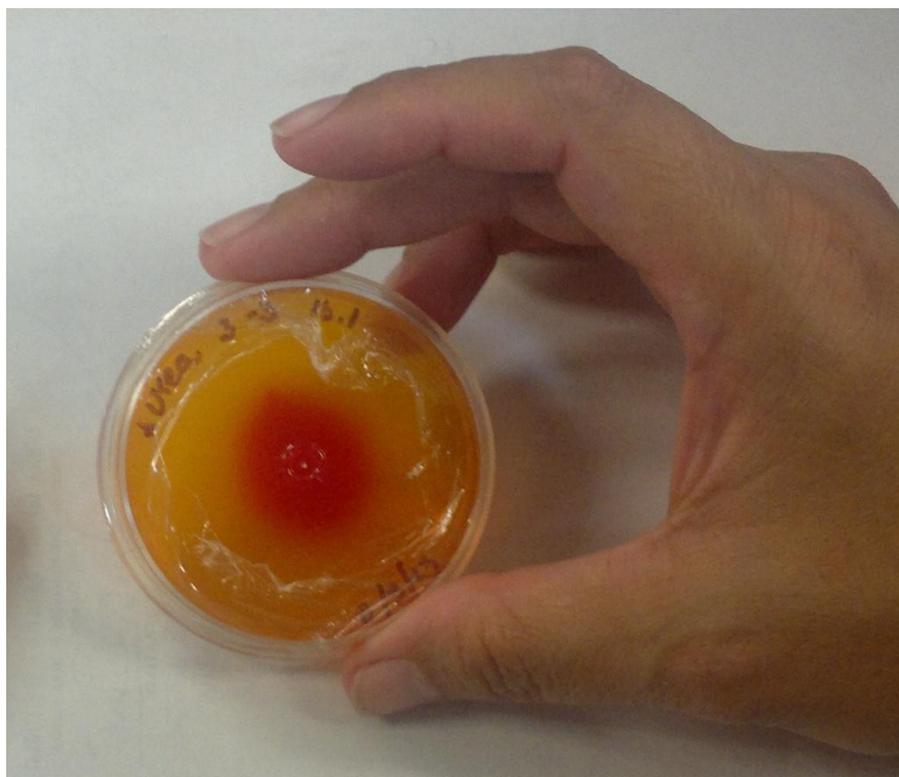


Figura 3.20 Prueba de Ureasa en *Rhodotorula sp.* o PDA 3 -3 1b.1

3.3 Evaluación del Potencial Hidrolítico.

Los resultados obtenidos en esta evaluación fueron comparados versus el control positivo *Bacillus subtilis* que tiene propiedades hidrolíticas.

Los sustratos sobre los que se evaluó el potencial hidrolítico fueron almidón de yuca, almidón de maíz, caseína, gluten y marva.

Obteniéndose los siguientes resultados que son detallados en la tabla N° 7.

TABLA N° 7
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
HIDROLÍTICO

N°	Levaduras	Sustratos		Caseína	Gluten	Marva
		Maíz	Yuca			
1	PDA 9 -3 1c	-	-	+	-	-
2	PDA 3 -3 1b.1	-	-	-	-	-
3	PDA 12.2 -2 12	-	-	+	-	-
4	PDA 12.1 -2 6	-	-	+	-	-
5	PDA 8 -2 1e	-	-	-	-	-
6	PDA 12.2 -3 2	-	-	-	-	-
7	PDA 4 -1 3c	-	-	+	-	-
8	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	-

Elaborado por: Leonor Tacury M., 2014

Pudiendo evidenciar que las levaduras no poseen actividad amilolítica debido a que no formaron el halo alrededor de la colonia versus el control positivo, *Bacillus subtilis*.



Figura 3.21 Actividad Amilolítica en Almidón de Maíz (negativo).

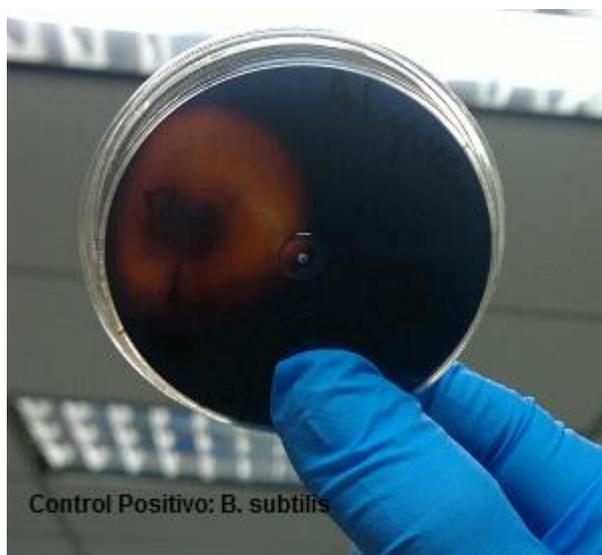


Figura 3.22 Control Positivo *B. subtilis* en Actividad Amilolítica (Lugol).

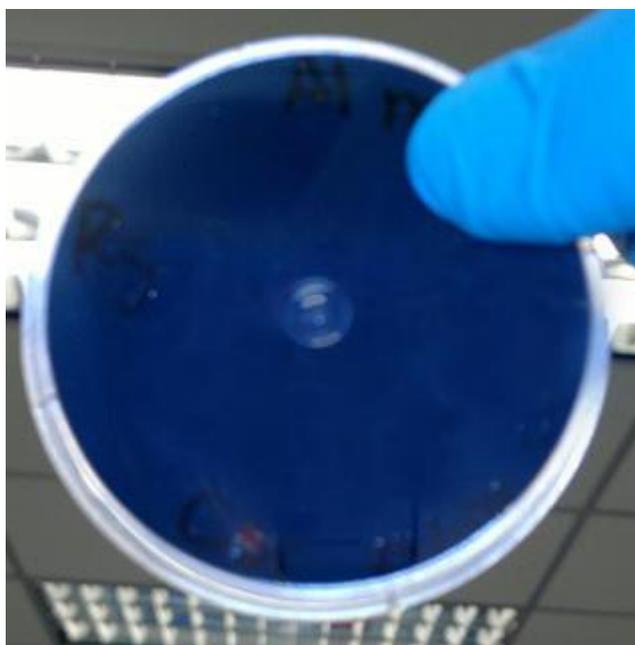


Figura 3.23 Resultado de Actividad Amilolítica (Lugol)

Actividad proteasa es positivo con formación de halo para las siguientes levaduras: PDA 9 -3 1c (*Rhodotorula glacialis*), PDA 4 -1 3c (*Cryptococcus sp.*), PDA 12.2 -2 12 (*Candida sp.*), PDA 3 -3 1b.1 (*Rhodotorula sp.*) y PDA 12.1 -2 6 (*Candida sake*), sobre el sustrato caseína mientras que sobre el gluten no se evidenció actividad frente al control positivo *Bacillus subtilis*.



Figura 3.24 Actividad Proteasa.- Caseína de PDA 9 -3 1c y PDA 4 -1 3c



Figura 3.25 Actividad Proteasa.- Caseína de PDA 12.2 -2 12 y PDA 3 -3 1b.1



Figura 3.26 Actividad Proteasas.- Caseína de PDA 12.2-3 2 y PDA 12.1-2 6

Actividad lipolítica es negativa, no se evidenciaron cambios en el medio, debido a que esta prueba no se pudo realizar a cabalidad ya que no se contó con un control positivo y se evidenció además un escaso crecimiento de las diferentes especies de levaduras, como se puede apreciar en la figura 3.27.



Figura 3.27 Resultados de Actividad Lipolítica.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se identificaron 6 especies de un total de 27 aislados de levaduras antárticas que correspondieron a las siguientes especies: *Rhodotorula glacialis*, *Rhodotorula sp.*, *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus sp.*, *Candida sake*, *Candida sp.*
2. Las colonias de color naranja, con aspecto cremoso y rugosos, son características de *Rhodotorula sp.*, *Rhodotorula glacialis*, mientras que las colonias blancas y cremosas, son características de las especies *Cryptococcus sp.*, *Cryptococcus gastricus*, *Candida sake* y *Candida sp.*
3. Las levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus sp.* y *Rhodotorula sp.* tienen una reacción positiva a la prueba de la

Ureasa; mientras que el género *Candida sp.* presentan una reacción negativa. Así como todas presentan reacción catalasa positiva.

4. De los siete aislados de levaduras antárticas, se pudo evidenciar la fermentación por parte de la levadura, PDA 12.1 -2 6 o *Candida sake*. Esta levadura fermentó los sustratos: glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. Siendo los tres primeros los que fermentó en mayor proporción frente a la maltosa, esto se evidenció en la cantidad de gas contenido en la campana de Durham.
5. De los siete aislados de levaduras antárticas, se pudo evidenciar actividad proteolítica frente al sustrato caseína de las siguientes levaduras: *Rhodotorula glacialis*, *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.* y *Candida sake*.
6. De los siete aislados de levaduras antárticas, se pudo evidenciar poca actividad amilolítica y lipolítica.
7. El potencial fermentativo e hidrolítico de *Candida sake* servirá de línea base para estudios posteriores, sobretodo en procesos de fermentación en la elaboración de bebidas alcohólicas ya que

degrada sustratos como glucosa, maltosa, sacarosa y fructosa; también es importante mencionar su actividad proteolítica degradando caseína, lo que puede potenciar su uso en la industria alimenticia.

Recomendaciones

- ❖ Utilizar medios de cultivos selectivos para levaduras, de manera que permitan su adecuado desarrollo, evitando la contaminación; también es necesario el empleo de medios de cultivos sólidos para una mejor visualización de la formación de colonias lo que facilitará el recuento de las mismas; un ejemplo es el Agar Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol; exclusivo para el aislamiento de levaduras y hongos a partir de muestras polimicrobianas.

- ❖ Emplear pruebas de asimilación rápidas para la evaluación de la absorción de nutrientes de los cultivos aislados, ya que permiten una mejor interpretación favoreciendo la identificación de un mayor número de especies con márgenes de equivocaciones

mínimos ya que constan con controles positivos y negativos, y de esta manera simplifican su uso y ahorran tiempo.

- ❖ Realizar un estudio más detallado y específico sobre la fermentación de la levadura antártica *Candida sake* a bajas temperaturas evaluándolas contra los parámetros de temperatura referenciales durante el proceso de producción de bebidas alcohólicas industrial; así como también la investigación de la producción de metabolitos tóxicos que podrían afectar la inocuidad evitando así su uso en la industria alimentaria.

- ❖ Contar con el stock adecuado de los reactivos para realizar el perfil bioquímico y de esta manera evidenciar la eficacia de estas pruebas, así como también contar con controles positivo y negativo para evitar lo ocurrido en la prueba de actividad de lipasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. PELCZAR M.; REID R.; CHAN E., Microbiología, Editorial Mc Graw Hill. México D. F. – México, 1982.
2. ADAMS M.; MOSS M., Microbiología de los Alimentos, Editorial Acribia, S. A., Zaragoza – España, 1997.
3. FRAZIER W.; WESTHOFF D., Microbiología de los Alimentos, Editorial Acribia, S. A., Zaragoza – España, 1993.
4. CIA, The World Factbook, Central Intelligence Agency.
5. URIBE GUTIERREZ L., Caracterización Fisiológica de Levaduras Aisladas de la Filósfera de Mora, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Microbiología Industrial, Bogotá – Colombia, 2007.
6. FRANCO M., Utilización de Actinomicetos en Procesos de Biofertilización, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú, 2009.
7. HERNÁNDEZ M.; SASTRE A., Tratado de Nutrición, Ediciones Díaz de Santos S. A., Madrid – España, 1999.
8. REVILLA A., Tecnología de la Leche, Editorial Zamorano, Honduras, 1996.

9. MONCADA REYES M., Efecto de la Acidez y Cantidad de Suero en las Características Físico-químicas y Sensoriales del Quesillo Zamorano. Facultad de Agroindustrias, Universidad Zamorano, Honduras 2005.
10. LÓPEZ A.; BYLUND G., Manual de Industrias Lácteas, Editorial Mundi Prensa, Madrid – España, 2003.
11. RAMÍREZ N.; SERRANO J.; SANDOVAL H., Microorganismos Extremófilos, Actinomicetos Halófilos en México, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, 2006.
12. MADIGAN M.; MARRS B., Extremophiles, Scientific American, 1997.
13. ROTHSCHILD L.; MANICINELLI R.; Life in Extreme Environments, Nature, 409. 2001.
14. MADIGAN M.; MARTINKO J.; PARKER J., Microbiología de los Microorganismos, Editorial Pearson - Prentice Hall, Madrid – España, 2003.
15. CIFERRI O., SPIRULINA, The Edible Microorganism. Department of Genetics and Microbiology, University of Pavia, Italy.
16. MERGEAY M.; MONCHYA S.; VALLAEYS T.; AUQUIER V.; BENOTMAN A.; BERTIN P.; TAGHAVI S.; DUNN J.; VANDER LELIE D.; WATTIEZ R., *Ralstonia metallidurans*, A Bacterium Specifically Adapted to Toxic Metals: Towards a Catalogue of Metal - re-sponsive Genes. FEMS Microbiology Reviews, 27, 2003.

17. XU Y.; KATO C.; LIANG Z.; RÜGER H.; DE KEGEL D.; GLANSDORFF N., *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov. Two Psychropiezophilic Organism Isolated from Deep Atlantic Sediments, Wiame Research Institute for Microbiology, University of Brussels, Brussels – Belgium.
18. HOCKING A.; PITT J., *Trichosporonoides nigrescens* sp. nov., A New Xerophilic Yeast – like Fungus, National Library of Medicine National Institute of Health. 1981.
19. JOLIVET E.; LÉHARIDON S.; CORRE E.; FORTERRE P.; PRIEUR D., *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., A Hyperthermophilic Archeon from Deep-sea Hydrothermal Vent that Resist Ionizing Radiation, PMID, 2003.
20. HORIKOSHI K.; ANTRANIKIAN G.; BULL A.; ROBB F.; STETTER K., Extremophiles Handbook, 2011.
21. CHOQUER M.; FORUNIER E.; KUNZ C.; LEVIS C.; PRADIER J.; SIMON A.; VIAUD M.; *Botrytis cinerea* Virulence Factors: New Insights into a Necrotrophic and Polyphageus Pathogen, FEMS Microbiology, 2007. Lett. 277: 1-10.
22. PITT J.; HOCKING A., Fungi and Food Spoilage, Springer Science & Business Media, 2009.
23. ANITORI R., Extremophiles: Microbiology and Biotechnology, Caister Academic Press., Norfolk – United Kingdom, 2012.

24. IRGENS R.; GOSINK J.; STALEY J., *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., A Psychrophilic Marine, Gas Vacuolate Bacterium from Antarctica Int. J. Syst Bacteriol. 1996 46: 822-826.
25. MOREAU C., Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, Interet en Industrie Fromagere, Mycotoxines. Lait 60: 254-271.
26. HIDALGO YANES P., Caracterización Bioquímica y Molecular de la Biosíntesis del Antitumoral Andrastina y de la Toxina PR en *Penicillium roqueforti*, Universidad de León, Dpto. de Biología Molecular, Área de Microbiología, León – España, 2013.
27. LUND B.; BAIRD-PARKER T.; GOULD G., The Microbiological Safety and Quality of Food, Volume I, Aspen Publication, Maryland – USA, 2000. Chapters 5,6.
28. LIBKIND D.; HITTINGER C.; VALÉRIO E.; GONCALVES C.; DOVER J.; JOHNSTON M.; GONCALVES P.; SAMPAIO J., Microbe Domestication and the Identification of the Wild Genetic Stock of Lager-Brewing Yeast, Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Comahue, Bariloche – Argentina, 2011.
29. SERRA A.; STREHAIANO P.; TAILLANDIER P., Influence of Temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; Impact of a Wine Yeast Interspecific Hybridization on these Parameters, Laboratoire de Génie Chimique, INP-ENSIACET, Toulouse - Francia.

30. GAMAZO C.; LÓPEZ-GOÑI I.; DÍAZ R., Manual Práctico de Microbiología, Editorial Masson, Barcelona – España, 2005.
31. CARRILLO L., Los Hongos de los Alimentos y Forrajes, Universidad Nacional de Salta, Facultad de Biología. Salta - Argentina, 2003.
32. LINARES M.; SOLÍS F., Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología: Identificación de Levaduras, Asociación Española de Micología y Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao - España, 2007.
33. SALCEDO CÁRDENAS M., Aislamiento y Selección de Levaduras Fermentadoras de Melaza de Caña de Azúcar, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia – México, 2008.
34. HIDALGO TOGORES J., Tratado de Enología, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid – España, 2010. Pag: 557-566.
35. BRAVERMAN J., Bioquímica de los Alimentos, Editorial El Manual Moderno, S.A., México D. F. – México, 1980.
36. VILLAMIL Y.; ZAPATA Y., Caracterización de Levaduras Fermentadoras Aisladas de Frutas en Descomposición con Potencial Aplicación Productora de Etanol, Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia, 1999.

37. MAGUIÑA VARGAS C.; Los Aportes de Louis Pasteur a 100 años de su Muerte, Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, Vol. 9 N°1 – 1996.
38. CARRETERO CASADO F., Innovación Tecnológica en la Industria de Bebidas, Escola Universita D'Enginyeria Tècnica Industrial de Barelona, Barcelona – España , 2006.
39. LUCIO O.; POLO L.; PARDO I.; FERRER S., Aislamiento e Identificación de Levaduras Vínicas de Viñedos Ecológicos, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Valencia – España, 2009.
40. CHEN H.; WANG S.; CHEN M., Microbiological Study of Lactid Acid Bacteria in Kefir Grains by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods, Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, Taipei - Taiwan, 2008.
41. JIANZHONG Z.; XIAOLI L.; HANHU J.; MINGSHENG D., Analysis of the Microflora in Tibetan Kefir Grains using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing – China, 2009.
42. CALVEL R.; WIRTZ R.; MACGUIRE J., The Taste of Bread, Aspen Publication, USA, 2001.
43. CHEN Y.; EISNER J.; KATTAR M.; RASSOULIAN-BARRETT S.; LAFE K.; YARFITZ S.; LIMAYE A.; COOKSON B., Identification of Medically Important Yeast Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2

Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2000, Vol. 38, N° 6: 2302 – 2310.

44. QUEROL A.; FLEET G., *Yeasts in Food and Beverages*, Springer – Verlag, Berlin – Alemania, 2006.
45. ALI KHAN A.; BHADRA B.; BEGUM Z.; SHIVAJI S., *Diversity of Yeasts from Puddles in the Vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Artic and Bioprospecting for Enzymes and Fatty Acids*, *Curr Microbiol*, Springer Science, 2010.
46. YARROW D., *Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts*. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam – Holland, 1998.
47. AGUILAR B.; REYNOSO S.; AGUILAR M.; SOLÍS J., *Resistencia de la Pared Celular de Levaduras a la Lisis Enzimática*, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Jalisco - México.
48. BADUY S., *Química de los Alimentos*, Editorial Alhambra Mexicana, S. A., México D. F. – México, 1995.
49. DE ROBERTIS E., *Biología Celular y Molecular de De Robertis*, Editorial El Ateneo, Buenos Aires – Argentina, 2001.
50. HILL R.; VYSE G., *Fisiología Animal*, Editorial Médica Panamericana S. A., Madrid – España.

51. MARGESIN R., Alpine Microorganisms: Useful Tools for Low-Temperature Bioremediation, Institute of Microbiology, University of Innsbruck, Austria, 2007.
52. PALACIOS A.; SUÁREZ L.; ATAÑO L.; LAUCÍRICA A.; PEÑA F., Defectos Organolépticos debidos al desarrollo de Microorganismos Indeseables durante la Vinificación y la Crianza del Vino, Universidad de La Rioja, Pto. Agricultura y Alimentación, La Rioja – España.
53. PARÉS R.; JUÁREZ A., Bioquímica de los Microorganismos, Editorial Reverté, Barcelona – España, 2002.