

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

<b>Código:</b>	CIVABI-010513
<b>Centro de Investigación:</b>	Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad
<b>Programa:</b>	BIOTECNOLOGÍA Y RECURSOS GENÉTICOS
<b>Título del Proyecto:</b>	Aislamiento y caracterización de taxa de levaduras presentes en el fruto de Taxo Passiflora sp. Tomate de árbol Solanum betaceum, capaces de fermentar en condiciones similares al mosto de uva
<b>Grupo de Investigación:</b>	Biodiversidad y Recursos Genéticos
<b>Area de Conocimiento:</b>	Ciencias de la Vida
<b>Línea de Investigación:</b>	Biodiversidad y Recursos Genéticos
<b>Tipo de Investigación:</b>	Desarrollo
<b>Campo :</b>	Tecnologías
<b>Investigador Principal :</b>	PABLO VLADIMIR COBA SANTAMARIA
<b>Proyectos Vinculados :</b>	
<b>Duración del Proyecto :</b>	12 Meses
<b>Localización del Proyecto :</b>	Quito, El Girón, laboratorios Civabi
<b>Fecha de ingreso :</b>	01/10/2013 15:16

## 2. ANTECEDENTES

La biodiversidad microbiológica es un campo interesante y necesario investigar según Prescott sostiene que se estima que al menos el 1% de los microbios de la tierra han sido cultivo el estudio sobre todo debe ser enfocado a la utilización y aplicación a procesos biotecnológicos.

En el Ecuador existen algunos estudios relacionados a la caracterización e identificación de taxas y cepas como es el caso del CLQCA que es un esfuerzo de la Universidad Católica del Ecuador por levantar un cepario de levaduras; sin embargo considerado que el país es uno de los mas mega diversos desde el punto de vista florístico y faunístico la perspectiva microbiológica estaría relacionada, pensando con la lógica de la aplicación de la taxa de *Saccharomyces cerevisiae* y la gama de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica e industrial la perspectiva de lo desconocido de la ecología microbiana sería infinita de lo que podía utilizar esta información para la obtención de bioproductos.

La ecología microbiana puede ayudar a solucionar muchos procesos biotecnológicos en donde se requieren el aislamiento, identificación y caracterización que se canalizan en la colección de cepas y taxas en el laboratorio destinado a tal fin, ya que de estos microorganismos pueden ser el preámbulo de la investigaciones de levantamiento de información y de aplicación tecnológica como la identificación bioquímica, perfil molecular, taxonomía, ecología o aplicaciones en procesos alimentarios como la fermentación de sustratos o la obtención de bioproductos así como la biorremediación y biosíntesis.

Es pertinente argumentar que en la puesta en marcha del proyecto inicial se ha plantado un transcurso experimental, construido en la validación de metodología así como el desarrollo por memorizado de actividades experimentales

## 3. JUSTIFICACIÓN

Adundar y consolidar el proceso investigativo es un argumento que justifica plenamente el presente proyecto de tal modo, que ciertamente enriquece y fomenta la cultura investigativa dentro de nuestras fronteras académicas; aparte que es fundamental involucrarse en tal ecología sobretodo en especies endémicas, ricas en azúcares, nitrógeno y minerales que colaboran a su desarrollo, realmente las especies nativas dan un ambiente completamente importante para tener un muestreo de microorganismos que no existirán en otros ambientes en los cuales tales plantas no se desarrollan

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Aislamiento y caracterización de taxa de levaduras presentes en el fruto de Taxo *Passiflora* sp Tomate de árbol *Solanum betaceum*, capaces de fermentar en condiciones similares al mosto de uva

### 4.2 Objetivos Especificos

- 1 ¿ Muestrear y posteriormente aislar taxas de levaduras nativas presentes en los frutos maduros de taxo y tomate de árbol de 3 zonas donde crezcan poblaciones silvestres o semicultivadas
- 2 ¿ Caracterizar morfológicamente y bioquímicamente las levaduras capaces de adaptarse a concentraciones altas de alcohol, metabisulfito, ácido ascórbico, pH y azúcar
- 3 ¿ Conservar las taxas para posteriores estudios de cinética y formación de metabolitos, en el cepario CIVABI

## 5. ESTADO DEL ARTE

El proyecto es vinculante que parte desde la aplicación de las técnicas básicas utilizadas en la microbiología clásica como el muestreo, el aislamiento de cepas por estrías, placa pobre, caracterización morfológica bioquímica, microscópica y macroscópica.

Posteriormente cursara por trabajos de cinética microbiana estudios generacionales y dilucidación de especies químicas provenientes de los respectivos metabolismos propios de cada cepa nativa aislada.

Apuntando a la utilización de técnicas propias del análisis químico y bromatológico, generando perspectivas de aplicación, obtención de biomasa y bioproductos, así como evidenciando las condiciones fundamentales de aplicación en diseños experimentales a pequeña escala

## 6. METODOLOGÍA

## METODOLOGÍA

### 7.1 FUNDAMENTO

#### Levaduras Fermentadoras

Entre las especies que se utilizan para realizar procesos fermentativos están géneros como *Kloeckera*, *Metschnikowia*, que según CUINIER 1980 están presentes en fermentaciones espontáneas, que luego son remplazadas por la *Saccharomyces cerevisiae*, que concluye la fermentación alcohólica espontánea en uvas.

Existen especies de levaduras que son estandarizadas para utilizarlos como starters en la fermentación de vinos como ejemplos están: Montrachet Red Star (ATCC 36026), Montpellier (K1-V1116), I.N.R.A. Narbonne (71B-1122), Rhône (IVC-GRE), Prise de Mouse (EC-1118). Pasteur (1876): "las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiera a un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza".

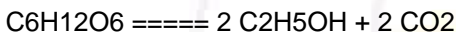
Las levaduras salvajes aunque la especie principal y responsable de la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, en las fermentaciones espontáneas, también se encuentran otras especies, sobre todo en las primeras fases del proceso (cepas de *Candida*, *Hansenioaspora*, *Metschnikowia*, etc.).

Ciertas levaduras salvajes son intolerantes al alcohol, la mayoría toleran solamente de 4 a 6 % de etanol (algunos van a tolerar hasta un 10 %), el problema es que mueren antes que la fermentación se haya completado.

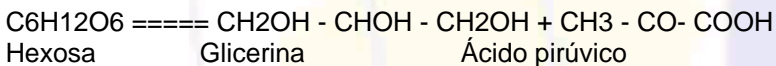
Tienen un comportamiento impredecible Son sensibles al SO<sub>2</sub> el cual es un aditivo normalmente usado en la elaboración del vino, de modo que al usarse se inhibe su acción y no cumplen la tarea de fermentación.

#### Fermentación Alcohólica

El vino es una bebida que se produce a partir de la fermentación alcohólica del mosto de la uva, en donde los azúcares reductores como glucosa y fructosa son convertidas a etanol y CO<sub>2</sub>, debido a la acción de las enzimas presentes en las levaduras (Vogt, 1986). En el caso de la molécula de la glucosa, se producen dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono, tal como se ilustra en la ecuación de Gay Lussac y que se expresa de la siguiente manera:



Además durante la fermentación alcohólica de vinos se producen otros compuestos asociados a una fermentación gliceropirúvica, la cual se conoce como la ecuación de Neuberg (VANACLOCHA AC. 1998):



Uno de los mecanismos por el cual se lleva a cabo la fermentación alcohólica se conoce como glicólisis, el cual se realiza en el citoplasma de las levaduras, generando energía para mantener el crecimiento y el metabolismo de éstas (Karen, 2003).

Las fermentaciones se describen de distinta forma y dependiendo del producto pero FRAZEIR afirma es más específico y cita Vino se aplica para designar al producto obtenido mediante la fermentación alcohólica por levaduras de las uvas o zumos de uvas y el subsiguiente proceso de envejecimiento. No obstante, se pueden elaborar vinos por la fermentación de jugos de frutas, de bayas, de miel etc.

#### Medios De Fermentación

El presente trabajo se realizara utilizando como medio el zumo de pitahaya. En suma las levaduras son utilizadas para fermentar diversos medios como: cereales, frutas, y harinas, y en especial las frutas preparadas en mosto. Sin embargo la producción de etanol industrial se efectúa principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales, o melasa de azucareras. Las características de las cepas son un poco diferentes de las cepas utilizadas para los vinos o alcoholes alimentarios

#### Preparación Del Mosto

En el proceso de producción del vino las uvas. FRAZEIR 1993 anota, debe ser perfectamente calificada, para la fabricación del vino se vendimia en el momento el contenido de azúcar deseado. La concentración de azúcar debe oscilar entre el 15 y 25 % en función de la variedad de uva y su grado de madurez. Y resalta que las uvas deben ser tratadas con vapor de agua, y se aplastan mecánicamente y a continuación, se tratan con dióxido de azufre (de 75 a 200 ppm), o con metasulfito de potasio en cantidades equivalentes, con el fin de inhibir el

crecimiento de competidores perjudiciales de la levadura del vino.

#### Parámetros Básicos En Fermentaciones Con Uva

Para poder hacer cambiar la materia prima como es la uva se debe evaluar y comparar entre la uva y la pitahaya, es por eso que (CABANIS 2003)

#### PARAMETRO MOSTOS MAGNITUD

Agua 700 ¿ 850 g/L

Osas 140 ¿ 250 g/L

Polisacáridos 3 ¿ 5 g/L

Alcoholes - g/L

Polióles - g/L

Ácidos orgánicos 9 ¿ 27 g/L

Poli fenoles 0,5 g/L

Compuestos nitrogenados 4 ¿ 7 g/L

Minerales 0,8 ¿ 2,8 g/L

Vitaminas 0,25 ¿ 0,8 g/L

#### Parámetros Críticos Para Fermentaciones Con Uva

Existen compuestos y parámetros químicos que son limitantes; Presentes en el mosto de uva, y que se deben considerar para la elaboración de vino de pitahaya, ya que sin estos el metabolismo de las levaduras podría verse alterado.

El mosto de la uva puede tener carencias en diferentes nutrientes susceptibles de causar problemas fermentativos. Entre ellos, tres son los citados más a menudo: el nitrógeno asimilable, la tiamina y el oxígeno.

La concentración en nitrógeno asimilable del mosto influye mucho sobre la cinética durante la mayor parte de la fermentación. Así, cuando esta concentración es muy débil, la fermentación es mas larga pero esto no implica un gran riesgo de parada de la fermentación. En efecto, la evolución de la cinética al final de la fermentación y la viabilidad de las levaduras en este instante, esta poco relacionada con el contenido inicial en nitrógeno del mosto (INSA, 1995)

La tiamina puede también ser limitante y provocar fermentaciones muy lentas. En efecto, aunque la levadura es capaz de sintetizar tiamina, no lo puede hacer más que a una velocidad débil que ralentiza considerablemente la fermentación. Es necesaria la presencia de aproximadamente 250 µg/L de tiamina para que no se vea afectada la velocidad de fermentación (BATAILLON, 1996)

Para desarrollarse convenientemente y conservar una buena viabilidad, las levaduras tienen también necesidad del aporte de algunos mg/L de oxígeno. Las necesidades máximas pueden ser estimadas en 5 ¿ 10 mg/L (Sablayrolles & Barre, 1986)

#### Caracterización Del Medio Y Entorno

##### Necesidades Nutricionales De Microorganismos

El medio debe aportar con todos los nutrientes necesarios para el desarrollo correcto de la levadura, según LEVEAU 2000 los elementos necesarios son Carbono, Nitrógeno, fósforo, Azufre, Potasio, Magnesio, calcio, Zinc, Manganeseo, Iones como hierro, bario, cloruros, sodio. Y propone que la formula bruta de la biomasa de *S. cereviceae* según NAGAI 1979 deduce es

CH<sub>1,72</sub> O<sub>0,44</sub> N<sub>0,15</sub>

producida en aerobiosis, elementos a los cuales es necesario añadir alrededor de un 10% de cenizas.

##### Influencia Del Entorno

Las levaduras están sujetas a cambios de su entorno pero parámetros importantes como la temperatura, actividad de agua, oxígeno, acidez, concentración de etanol, sulfitos y antibióticos. Pueden ejercer efectos inhibitorios en el crecimiento de las levaduras.

Así LEVEAU 2000 sostiene que la temperatura ideal de crecimiento de las levaduras es de 25 a 30°C, el Aw no debe bajar de 0,99.

Dependiendo del genero de levaduras que se desarrollen esta pueden ser aerobias, o anaerobias, siendo los géneros de *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *cryptococcus* y *Sporobolomyces*, levaduras aerobias estrictas, también sostiene que no existen levaduras anaerobias estrictas y el valor mínimo de oxígeno para la supervivencia de las levaduras es de 0.0015 mg

Las levaduras toleran entre el rango de 5,8 y 6,8 sin ningún cambio en su crecimiento.

#### Cinética De Crecimiento

La fase de crecimiento y la fase estacionaria son dos fases orientables y muy distintas en condiciones enológicas. La fase de crecimiento no es una fase de crecimiento real. Las levaduras durante esta fase solo se multiplican de 6 a 7 generaciones, generando así una población máxima de alrededor de 120 a 130 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. Esto representa aproximadamente 3g en peso seco por litro. (Bely et al 1996)

La curva puede dividirse en tres fases: la fase de latencia que se corresponde con el periodo de saturación del medio en CO<sub>2</sub>. Al final de esta fase es aproximadamente 107 células por mililitro, depende de la temperatura y no excede de las 24 horas

La segunda fase dura hasta el final del crecimiento celular. Durante esta fase, se libera CO<sub>2</sub> como máximo de 5g/L de CO<sub>2</sub> lo que corresponde un consumo de azúcar de 10 g/L. En este momento la cantidad de células baja a un tercio de la población total.

#### PROCEDIMIENTOS

##### Obtención Y Fermentación Espontánea Del Mosto De Fruto

El mosto será preparado de la siguiente manera: primero se retirará separando la pulpa de la cáscara, luego se extraerá el jugo en una despulpadora, para ser filtrado y clarificado en filtros de tela o rejillas. Se espera que el mosto resulte transparente, debido a que la fruta tiene una pulpa clara y transparente.

Según ORTIZ el porcentaje de pulpa de la pitahaya radica en un 49.47 % del peso total. Para obtener una fermentación espontánea se realizará por tres repeticiones cada una de 1 litro, por lo que se requerirá aproximadamente 3 kg de pulpa de pitahaya. Lo que se extrapola a un peso de fruta de 12 kg de fruta. Esta se colocará en recipientes de acero inoxidable de 2 litros para su posterior fermentación.

Según OWEN 1989 la fermentación del mosto de uva debe ser de 3 a 10 días a una temperatura de 20-30 °C. Se realizará un muestreo en 3 regiones productoras de dicha fruta. Resultando 3 muestras, con 3 repeticiones, dando un total de 9

##### Aislamiento De Microorganismos Del Mosto Con Un Medio Especifico

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo por estriación sobre un medio sólido contenido en una placa Petri con medio YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) al que además de los compuestos necesarios para prepararlo, se añade tetraciclina para evitar el desarrollo de bacterias en el mismo. El objetivo final consiste en obtener un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Al incubar esta, cada una de las levaduras originará una colonia (con las salvedades discutidas antes). Normalmente una colonia aislada es un cultivo puro.

##### Selección De Cepas De Microorganismos, Capaces De Adaptarse A Las Condiciones Establecidas

Uno de los criterios para escoger las levaduras de importancia LEVEAU J.Y. 2000 en un cuadro que las características importantes para seleccionar son: buen rendimiento en etanol, tolerancia al etanol, producción de ésteres, producción de glicerol, adaptación a temperaturas extremas (bajas o elevadas) exigencias bajas de elementos nutricionales. Y además las características negativas son: producción de H<sub>2</sub>S, formación de acidez volátil, producción de SO<sub>2</sub>, formación de espumas, producción exagerada de alcoholes superiores, producción de compuestos combinando el H<sub>2</sub>S. Y entre otras están: tolerancia al CO<sub>2</sub>, carácter Killer, degradación del ácido málico. (Cuinier, 1987)

Por lo que se deberá someter a las levaduras a condiciones:

Parámetro Rango de la fruta Rangos utilizados

pH 4-6 5.8-6.8

Concentración de sulfito 0 75-200 ppm

Temperatura 15-20-25-30 ° C

Tiamina 0.10 mg/kg 0.25 mg/L

Degradación de azúcares 92 g/kg 140-250 g/L

Cenizas 5g/kg 10 %

##### Cinética De Microorganismos Seleccionados



Los parámetros cinéticos a evaluarse serán la velocidad específica de reacción con respecto a biomasa y la velocidad de gasto de sustrato

#### Identificación De Las Cepas De Microorganismos Seleccionados

GAMAZO 2005 adjunta en su auxanograma, que las levaduras contienen sistemas enzimáticos que determinan su capacidad para utilizar un hidrato de carbono como única fuente de carbono en un medio de cultivo adecuado. En la práctica, la capacidad de utilización de ciertos orgánicos como única fuente de carbono en crecimiento aerobio es una de las pruebas más utilizadas para la identificación de las levaduras. Los compuestos de carbono empleados son fundamentalmente azúcares, ácidos orgánicos y algunos azúcares-alcoholes.

Estas pruebas se denominan pruebas de asimilación y se utilizan para valorar la capacidad de cada levadura para usar estos compuestos en crecimiento aerobio. En función del número de sustancias testadas, esta prueba permite la diferenciación entre un elevado número de especies. En su manual adjunta el procedimiento, además se utilizarán herramientas de identificación como las pruebas comerciales API para levaduras en las que toma en cuenta su comportamiento bioquímico.

#### Conservación De Cepas De Microorganismos

LEVEAU J: Y: anota que tradicionalmente el mantenimiento de las levaduras no se ha considerado problemático pues se pueden efectuar sub-cultivos tras un largo periodo sin cuidado. Y también resalta que la mejor técnica de conservación es la congelación, por lo que se aplicara esta técnica para mantenerlas viables.

#### Adecuación e instalación de áreas

El adecuamiento de las instalaciones estarán relacionadas a sistematizar las áreas ya existentes en el laboratorio de microbiología, análisis proximal, y química instrumental, sin embargo hay que considerar que los equipos ya se encuentran instalados y apunto

#### Materiales y Materias Primas

Como materiales importantes que son fundamentales citarlos están el Agitador Mecánico con control de temperatura (shaker), Autoclave, Congelador, incubadora, Equipo de filtración, cámara de flujo laminar, refrigeradora, cámaras de muestreo, determinador de humedad, fibra, cromatógrafo de gases y el bioreactor

Como materiales de vidrio están referidos a frascos de vidrio de litro, matraces, vasos de precipitación, cajas petri, tubos plásticos y de vidrio pisetas, probetas, balones aforados, asas microbiológicas.

Como materias primas y reactivos los más relevantes están enfocados a los medios de cultivo como caldo YPD, caldo peptonado, SDA, PDA, colorantes azul de metileno, fushina, lactofenolo, alcohol, gentamicina, cloranfenicol.

#### Asesoramiento y transferencia tecnológica

En primera instancia se llevara a cabo una compilación bibliográfica de las técnicas referidas en la bibliografía, la posterior aplicación experimental y la participación a una capacitación relacionada a la cinética aplicada en un bioreactor asesorado por el proveedor.

Para la trasferencia en primera instancia se realizara con los 2 estudiantes relacionados directamente, para posteriormente organizar una conferencia en la cátedra de microbiología industrial. Sin embargo se prevé participar en las jornadas de biotecnología que se llevan a cabo anualmente en la UPS y en universidades del país

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Gamazo, C. (2005). Manual Práctico de Microbiología. España: 3° Edición Editorial Masson

Leveau, J. Bouix, M. (2000) Microbiología Industrial. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A.

Vogt, E. Jacob, L. (1986). El Vino: Obtención, elaboración y análisis. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A. 52-54 pp.

Vanaclocha, A. Requena J. (1998). Procesos de Conservación de Alimentos. España: Ediciones Mundi Prensa. 93-121 pp.

Karen, K. Lorenz, K. (2003). Handbook of Dough Fermentations. New York:

Owen, W. (1989). Biotecnología de la fermentación, Principios, procesos, y productos, Zaragoza-España: Editorial Acribia S.A.

Salinas, A. (2000). La jugosa historia de las frutas. México, D. F: Ed. Clío.

Ortiz, J. (1999) Parámetros fisicoquímicos de la Pitahaya. UTA, Ambato, Ecuador: Tesis de Ingeniería en Alimentos

Moreno et al (2007). El mercado del vino en Ecuador. Quito Ecuador

Fernández, J. et al (2006), Estudio de mercado: El mercado del vino en Estados Unidos, New York, Estados Unidos

Prescott et al. (2009) Microbiología. Madrid-España: Editorial Mac Graw Hill.

Estrella, E. (1998). El Pan De América, Quito Ecuador: FUNDACYT.

Ministerio De Agricultura Ganadería Y Pesca Ecuador; MAGAP. (2011). En Línea: <http://www.magap.gob.ec/mag01/>; Consulta: 12 de diciembre de 2011

Centro Neotropical Para La Investigación De La Biomasa; En Línea: <http://www.cnib.com.ec/CLQCA>, Consulta: 3 de diciembre de 2011

## 8. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados a esperar son capacitar a un grupo de estudiantes, así como la implementación de tecnologías afines, además levantar y conservar un cepario con unas 50 cepas de levaduras identificadas bioquímicamente.

## 9. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y/O SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Se validaran todos los métodos en el laboratorio CIVABI especialmente en la sub área de tecnologías aplicadas, en todo el proceso experimental se contara con el apoyo de 2 estudiantes, los mismos que serán capacitados previamente para confrontar todo el trabajo que representara investigar la ecología microbiana presente en la pitahaya.

Además es establecer una línea de investigación que está enfocada a la utilización de microorganismos para la aplicación en distintos campos.

La divulgación de los resultados estará enfocada básicamente a ser publicados en la revista del área de ciencias de la vida de la UPS

## 10. IMPACTOS DEL PROYECTO

Podemos enlistar los impactos desde el punto de vista micro, meso y macro respectivamente:

- Capacitación continua en las técnicas microbiológicas básicas relacionado a los estudiantes relacionados
- Capacitación en el manejo de los equipos y sistematización de los mismos
- Promoción e incentivo para los estudiantes y el profesor encargado a dar comienzo de los estudios de microorganismos nativos
- Levantamiento de información relacionada a las dos especies endémicas en el Ecuador y su localización utilización e información etnobotánica
- Enriquecimiento de la colección de material genético caracterizado para el trabajo posterior del área microbiológica del CIVABI
- Canales de contacto entre investigadores nacionales y extranjero especialmente en Pavía
- Divulgación de los resultados investigativos y enriquecimiento de la cultura investigativa en la UPS

## 11. INFORMACIÓN DE COFINANCIADORES (en caso de que existieran)

