



**UNIVERSIDAD
DEL AZUAY**

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Aislamiento e identificación molecular de levaduras a partir
de la fermentación de una mezcla de pulpa de frutas y granos
de cacao de la variedad CCN-51.**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

JUAN JOSÉ MATUTE PINOS

Director:

RODRIGO SEBASTIÁN CAROCA CÁCERES

CUENCA- ECUADOR

2021

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a toda mi familia, de manera especial a mis padres por todo su apoyo incondicional, al mismo tiempo a mis amigos y compañeros quienes fueron pilares fundamentales para que todo esto sea posible.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por estar presente de manera espiritual y darme la fuerza y coraje para concluir con este proyecto de titulación.

Por otra parte, agradecer de manera especial a mi director de tesis Dr. Rodrigo Caroca, por su apoyo y por hacerme partícipe de este proyecto de investigación. Al mismo tiempo, por su orientación acertada, soporte, confianza, compromiso y discusión crítica, que de una u otra forma permitieron el mayor aprovechamiento en este trabajo realizado para culminarlo de la mejor manera posible.

A todos los profesores, laboratoristas y personas que aportaron su granito de arena con mi formación profesional y para la realización de este proyecto de titulación. De igual manera, a mi Alma mater Universidad Del Azuay por haberme brindado tantas oportunidades y enriquecer mi conocimiento.

Conjuntamente, agradecer a mis padres y hermanos, sobre todo a mi madre que sin su apoyo moral, emocional y económico nada de esto fuera posible. Así mismo, a mi padre y hermanos que me apoyaron a lo largo de este reto académico que con sus buenos consejos y detalles que me permitieron seguir sin rendirme pese a las dificultades que se presentaron.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis compañeros de clases y amigos; Fabián, Mateo, Jess, Karla, que me supieron dar su mano cuando más lo necesitaba, ya que fueron mi motor principal para seguir en la universidad y día tras día ser mejor persona con todos los que me rodean. Sobre todo, quiero agradecer a Camila Vizcaíno A., que a pesar de todo me supo ayudar en los momentos más difíciles y nunca dejó que me rindiera, a más de ser mi fuente de inspiración y admiración que me ayudó con mis estudios logrando culminar con éxito mi vida universitaria.

Muchas gracias a todos.

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS A PARTIR DE LA
FERMENTACIÓN DE UNA MEZCLA DE PULPA DE FRUTAS Y GRANOS DE CACAO DE
LA VARIEDAD CCN-51.**

RESUMEN

Se caracterizó e identificó las levaduras presentes durante seis días de fermentación espontánea de cacao de la variedad CCN-51, cuyo material mucilaginoso fue sustituido por una mezcla de pulpa de maracuyá y banano. Las levaduras fueron caracterizadas por métodos morfológicos y técnicas de biología molecular como electroforesis, la amplificación de la región ITS y secuenciación. Se obtuvieron 11 géneros de levaduras: *Candida*, *Pichia*, *Kodamaea*, *Hanseniaspora*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces*, *Meyerozyma*, *Aureobasidium*, *Hyphopichia*, *Trichosporon* y *Wickerhamiella*. Según su abundancia, *C. intermedia*, *P. kudriavzevii* y *K. ohmeri*, podrían ser posibles cultivos iniciadores para lograr una mejor calidad de los granos de cacao fermentados.

Palabras claves: *caracterización, biología molecular, Theobroma cacao, Candida intermedia, Pichia kudriavzevii, Kodamaea ohmeri.*



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Director de tesis



María Fernanda Rosales Medina

Directora de Escuela



Juan José Matute Pinos

Autor

**ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEASTS FROM THE FERMENTATION OF
A MIXTURE OF FRUIT PULPS AND COCOA BEANS OF THE CCN-51 VARIETY.**

ABSTRACT

The yeasts present during six days of the spontaneous fermentation of cocoa of the CCN-51 variety, whose mucilaginous material was replaced by a mixture of passion fruit and banana pulp, were characterized and identified. The yeasts were characterized by morphological methods and molecular biology techniques such as electrophoresis, amplification of the ITS region, and sequencing. Eleven yeast genera were obtained: *Candida*, *Pichia*, *Kodamaea*, *Hanseniaspora*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces*, *Meyerozyma*, *Aureobasidium*, *Hyphopichia*, *Trichosporon*, and *Wickerhamiella*. According to their abundance, *C. intermedia*, *P. kudriavzevii* and *K. ohmeri* could be possible starter cultures to achieve a better quality of fermented cocoa beans.

Keywords: *characterization, molecular biology, Theobroma cacao, Candida intermedia, Pichia kudriavzevii, Kodamaea ohmeri.*



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

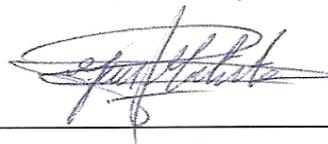
Thesis Director



María Fernanda Rosales Medina

Faculty Director

Translated by



Juan José Matute Pinos

Author



ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
1.1. Materia Prima.....	5
1.2. Fermentación.....	5
1.3. Muestreo.....	5
1.4. Esterilización y preparación de medios de cultivo.....	6
1.5. Análisis microbiológico.....	6
1.5.1. Tratamiento de la muestra.....	6
1.5.2. Siembra, aislamiento y purificación.....	7
1.5.3. Caracterización macroscópica y microscópica.....	7
1.5.4. Formación de pellets y stock de glicerol.....	7
1.6. Identificación molecular.....	8
1.6.1. Extracción de ADN.....	8
1.6.2. Electroforesis de ADN.....	8
1.6.3. Amplificación de la región ITS.....	8
1.6.4. Secuenciamiento.....	9
CAPÍTULO II: RESULTADOS.....	10
2.1. Dinámica de crecimiento de levaduras durante la fermentación.....	10
2.2. Caracterización macroscópica y microscópica de las levaduras sembradas, aisladas y purificadas.....	11
2.3. Extracción de ADN, PCR, Electroforesis y purificación de ADN.....	13
2.4. Ajuste de concentración y secuenciación de ADN.....	15
CAPÍTULO III: DISCUSIÓN.....	18
3.1. Dinámica de crecimiento de levaduras durante la fermentación.....	18
3.2. Caracterización macroscópica y microscópica de las levaduras sembradas, aisladas y purificadas.....	19
3.3. PCR y secuenciación de ADN.....	20
CONCLUSIÓN.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXOS.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica de crecimiento y desviación estandar de levaduras durante 6 días de fermentación reemplazando el material mucilaginoso con una mezcla de pulpa de frutas. La gráfica Sec. 1 se obtuvo mediante el conteo y cálculo respectivo de UP (N) mediante un promedio de dos réplicas de fermentaciones simultánea. En la Sec. 2 el enfoque permite visualizar que las colonias de levaduras no parten de un valor de cero.	11
Figura 2. Cultivos mixtos de levaduras sobre una placa de PDA.	12
Figura 3. Células de levaduras de un cultivo mixto. Aumento 40X.	12
Figura 4. Cultivo puro de levaduras sobre una placa de PDA.	13
Figura 5. Células de levaduras en cultivo puro. Aumento 40X.	13
Figura 6. Gel de electroforesis de las primeras 22 muestras (carriles 1-22) de 63 en total. Se usó 300 lúmenes en el trasiluminador. m= marcador molecular de 1kb, M= marcador molecular de 100pb. La selección de las muestras se realizó agrupándolas primero por sus características tanto macroscópicas como microscópicas, y posteriormente haciendo una selección al azar de un representante de cada grupo del total de 358. Se tomó como referencia al valor de 600pb para identificar las levaduras con mayor o menor peso molecular debido a especificaciones de la empresa Macrogen para la secuenciación.	14
Figura 7. Gel de electroforesis sometido al trasiluminador a 300 lúmenes reflejando el resultado de la purificación de ADN ¹ . Las muestras y carriles analizados son los mismos de la Figura 6.	15
Figura 8. Ejemplo de una muestra secuenciada de ADN. El cromatograma fue generado con el software SnapGene. Se muestran las secuencias con y sin ruido.	16

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos mixtos de levaduras inicialmente sembradas ¹	12
Tabla 2. Caracterización macroscópica y microscópica de un cultivo puro de levaduras aisladas ¹	13
Tabla 3. Orden detallado por género y especie de predominancia durante los 6 días de fermentación incluido el día 0 y el pH del medio en el que crecieron.	17

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fórmulas establecidas por la NTE INEN 1529-10:2013 para el conteo de levaduras en alimentos.....	29
Anexo 2. Caracterización macroscópica y microscópica de los cultivos puros de levaduras aisladas.....	30

Juan José Matute Pinos

Trabajo de graduación

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, PhD.

Julio, 2021

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS A PARTIR DE LA
FERMENTACIÓN DE UNA MEZCLA DE PULPA DE FRUTAS Y GRANOS DE CACAO DE
LA VARIEDAD CCN-51.**

INTRODUCCIÓN

El cacao es un símbolo de prestigio que destaca a Ecuador a nivel mundial, debido a que es uno de los principales países productores y exportadores de este fruto (Sánchez et al., 2019). En Ecuador, predominan dos variedades de cacao, Nacional y CCN-51, siendo este último el que sobresale entre los productores artesanales. No obstante, este no posee las características necesarias para considerarse un cacao de alta calidad. Según Montecé (2016), esta variedad de cacao ha sido clonada con el fin de obtener un aumento en la producción, generando un cacao carente de sabor y aroma.

El aroma y sabor son dos de los atributos más importantes a considerar en la elaboración de chocolate de calidad superior. De hecho, durante el proceso de fermentación de los granos de cacao se generan de forma constante compuestos químicos como el etanol, ácidos orgánicos, enzimas, precursores de sabores y aromas, que permitirán lograr estos atributos (Ramos et al., 2014) Durante el proceso fermentativo los microorganismos se adhieren y degradan el material mucilaginoso (“baba de cacao”) que envuelve a la semilla de cacao y que resulta difícil de desprender en el grano fresco (Teneda, 2016). Principalmente, las levaduras son las pioneras al momento de realizar la fermentación del cacao, generando etanol y causando la degradación enzimática del material mucilaginoso (Bravo & Mingo, 2011). Así, la fermentación de los granos de cacao es una etapa importante de la postcosecha de este fruto (Teneda, 2016).

Desde el punto de vista industrial, las levaduras son los microorganismos más importantes, puesto que muchas especies pueden metabolizar los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono, a través de un proceso fermentativo. Es por esto que se les usa principalmente en la producción de cerveza, vino, alcohol industrial, glicerol y vinagre. Adicionalmente, se utilizan también para la panificación, como alimento animal y humano por su alto contenido de proteínas (Hernández, 2003). En el caso del cacao, las levaduras de igual manera son consideradas cruciales para una fermentación óptima y la obtención de un chocolate de características aceptables (Ho et al., 2018).

Según Tortora, Funke & Case (2007), las levaduras son hongos no filamentosos unicelulares que se encuentran distribuidas libremente en el ambiente. Principalmente, se encuentran en

los frutos y las hojas, por lo cual se adaptan fácilmente a las condiciones climáticas. Pueden crecer en presencia de oxígeno, sin embargo, según sea la disponibilidad de este, las levaduras se adaptan y entran en un proceso metabólico tanto aerobio como anaerobio. Poseen una gran diversidad con respecto al tamaño, color y forma. Su tamaño celular varía en un rango desde 1 hasta 50 μm . En cuanto al color, este puede ser crema, negro, rojo, entre otros. Se puede encontrar una heterogeneidad morfológica y colorimétrica, incluso en cultivos puros. En adición, estas variaciones pueden estar inducidas por las condiciones físicas y químicas, del medio en el que se encuentren (Lagos, 2017).

En general, las levaduras se reproducen sexual y asexualmente. Sin embargo, la reproducción sexual no es muy común. Esta se realiza mediante esporulación de células haploides, que contienen la información genética necesaria para conjugar y producir células diploides (Lagos, 2017). Por otra parte, la reproducción asexual es la más frecuente y se da por gemación en la que una pequeña parte del protoplasma se prolonga y aumenta de tamaño hasta desprenderse y formar una nueva célula similar a la célula madre (Teneda, 2016).

Existen otros factores para que se genere una correcta reproducción, que incluye sus necesidades nutritivas como la concentración de azúcares, minerales y sustancias nitrogenadas que se encuentren en el medio. Asimismo, la temperatura y el pH influyen en el crecimiento de las levaduras, ya que, la mayoría tolera un rango de temperatura de carácter mesófilo, es decir, en un rango de 24 a 48 $^{\circ}\text{C}$. No obstante, existe una reducida cantidad de levaduras que crecen a menores temperaturas y no se han podido registrar levaduras que toleren una temperatura superior a 50 $^{\circ}\text{C}$. A su vez, el pH del medio en el que las levaduras pueden crecer va de, 3 a 10 (Teneda, 2016).

Como fue mencionando previamente, las levaduras son esenciales para el proceso de fermentación del cacao, ya que las actividades de estos microorganismos son los responsables de una buena fermentación y por ende, obtención de un chocolate agradable (Ho et al., 2014, 2018) Cabe aclarar, que la etapa de la fermentación no es de los granos de cacao sino de la pulpa, la cual es el líquido agrídulce que envuelve a estos granos. En cuanto se abren las mazorcas de cacao, la pulpa previamente estéril es contaminada por bacterias y levaduras. Estas últimas, por su poder fermentativo, son las encargadas de iniciar el proceso predominando las primeras 48 horas, aprovechando la acidez y alta concentración de azúcares de la pulpa, condiciones que son importantes para la supervivencia de estos microorganismos (Teneda, 2016).

Inicialmente las levaduras se desarrollan gracias a la acidez de la pulpa y tienen el rol principal de fermentar los azúcares de esta, para producir dióxido de carbono y etanol. Tal etanol, es un producto importante para la producción posterior del ácido acético por parte de las bacterias ácido-acéticas, y en mínimas cantidades por las levaduras. La producción y las concentraciones de ácido acético y etanol incrementan la temperatura de los granos, de manera que estos tres factores matan al embrión del cacao, generando una serie de reacciones que desarrollan los precursores de sabor y aroma del chocolate (Ho et al., 2018).

Además, las levaduras ayudan a usar el ácido cítrico, de manera que se reduce la acidez de la pulpa, permitiendo que crezcan microorganismos menos tolerantes al pH bajo. Otra función que tienen las levaduras es producir varios componentes volátiles responsables del desarrollo de los precursores del chocolate. Por último, algunas levaduras tienen una actividad pectinolítica, lo cual hidroliza a las pectinas de la pulpa, de manera que al final de la fermentación, la pulpa se elimina como exudado (Schwan & Wheals, 2004; Teneda, 2016).

Durante una fermentación espontánea, las condiciones naturales en que se desarrolla, permiten la proliferación de diversas especies de levaduras, siendo algunas más comunes que otras (De Vuyst & Weckx, 2016). La ecología microbiana comúnmente aislada de las fermentaciones de granos de cacao abarca las siguientes especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia manshurica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala* y *Kluyveromyces marxianus* (Salazar, 2017). Tales levaduras, se desarrollan en distintas etapas de la fermentación según sus actividades pectinolíticas, dominancia, capacidades fermentativas y/o tolerancias al etanol y acidez del medio. Las especies *Hanseniaspora opuntiae* y *H. uvarum* predominan durante los primeros días de la fermentación por su alta tolerancia a pHs bajos, y baja tolerancia al etanol y calor. En cambio, *Saccharomyces cerevisiae* domina el resto de la fermentación debido a que puede crecer en pHs más altos y tiene alta tolerancia al etanol y calor. Por último, crecen las especies de *Pichia*, por la tolerancia que tienen al etanol, acidez y calor (De Vuyst & Weckx, 2016; Ho et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, los granos de cacao de la variedad CCN-51 no tienen los mismos atributos para considerarse de alta calidad, sin embargo, sus características se podrán modificar por su procesamiento postcosecha, específicamente en la fermentación. Carrión (2019) realizó una fermentación espontánea reemplazando la pulpa natural del cacao CCN-51 con pulpas de maracuyá y banano. Se obtuvo una buena fermentación de los granos de cacao, consiguiendo una pasta de cacao con características mejoradas. Dichas frutas tienen ciertas características como acidez, azúcares y aromas fuertes como es el caso del maracuyá y un pH ligeramente ácido con un sabor y olor tenue, en el caso del banano. Además, Montecé (2016), menciona que este tipo de frutas poseen ciertas vitaminas y minerales, que pueden ser aprovechados por los microorganismos para su desarrollo.

A pesar que el estudio de Carrión (2019) demuestra que las características de los granos de cacao de la variedad CCN-51 se pueden mejorar con la fermentación, no se aisló ni especificó los microorganismos presentes, únicamente se realizó un conteo de estos. Siendo las levaduras las principales responsables de una buena fermentación y de las cualidades obtenidas en el cacao, es importante su aislamiento y caracterización para identificar sus posibles contribuciones en el proceso y producto final. En vista a estos antecedentes, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar las levaduras presentes en una fermentación como la descrita por Carrión (2019), utilizando herramientas de microbiología y

biología molecular. De esta manera, se arrojó luces sobre la contribución de las levaduras en este tipo de fermentación modificada de los granos de cacao.

Dichas herramientas moleculares, inician con la extracción del ADN de las levaduras ya sea mediante kits específicos o protocolos “caseros”. Posteriormente, se ejecuta la técnica conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), que permite obtener *in vitro* millones de copias de ciertos fragmentos de ADN de una sola molécula (Cornejo et al., 2014). En el caso de las levaduras, mediante el uso de primers sintéticos ITS1-ITS4, se amplifica la región ITS del ADN ribosómico que rodea la secuencia de codificación 5.8S. Este procedimiento es ampliamente utilizado para la codificación de hongos y levaduras (Raja et al., 2017). Los resultados de la extracción de ADN y de la PCR se pueden evaluar mediante electroforesis en geles de agarosa, gracias a que esta técnica permite separar fragmentos de ácidos nucleicos y con ellos es posible estimar el grado de pureza y concentración del ADN. Finalmente, los productos de PCR de la región ITS se pueden secuenciar y con ello es posible comparar las secuencias obtenidas con bases de datos especializadas. Es esta comparación la que permite determinar el género o especie de la levadura que se está analizando (Raja et al., 2017).