



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Identificación y purificación de enzimas pectinolíticas de
levaduras provenientes de la fermentación del cacao para su
aplicación en la industria alimentaria**

Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS

Autora:

LESLIE ALEXANDRA AUCAPIÑA ALVAREZ

Director:

RODRIGO SEBASTIÁN CAROCA CÁCERES

Cuenca – Ecuador

2023

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por darme la sabiduría para continuar en este proceso de cumplir uno de mis anhelos más deseados graduarme. A mis padres, Silvia Alvarez y Rafael Aucapiña que me apoyaron en todo momento. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño. Todo esto con una enorme dosis de amor y sin pedir nada a cambio. A mis hermanos, en especial a mi hermana Samantha quien ha sido un pilar fundamental y me ha ayudado de forma incondicional durante mi etapa universitaria. También quiero dedicarle este trabajo a mi esposo Ismael. Por su paciencia, por su comprensión, por su amor y por haberme apoyado durante este largo camino. A mi hijo Liam, que llegó a mi vida a llenarme de alegría y ser la inspiración que necesitaba en mi vida. A pesar de tu corta edad me entendías y con tus palabritas (mami me voy a dormir para que hagas tu tesis) me alentabas a seguir en adelante. Más que decir “**LO LOGRE**” puedo decir “**LO LOGRAMOS**”.

Leslie Alexandra Aucapiña Alvarez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo. Y han fomentado en mí el deseo de superación y de triunfo. Lo que ha contribuido a que cumpla este maravilloso sueño. A mi director de tesis, Dr. Rodrigo Caroca por sus consejos que siempre fueron útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado y en especial por su paciencia a lo largo de todo este proceso. Al Ing. Diego Montero por su paciencia y ayuda incondicional en la realización de mi tesis.

Gracias a todos aquellos que forman parte de mi vida y que de una u otra forma han hecho que este camino universitario sea un poco más llevadero.

Leslie Alexandra Aucapiña Alvarez

Identificación y purificación de enzimas pectinolíticas de levaduras provenientes de la fermentación del cacao para su aplicación en la industria alimentaria

RESUMEN

Se evaluó la actividad pectinolítica en levaduras provenientes de una fermentación espontánea de cacao variedad CCN-51, cuyo material mucilaginoso fue sustituido por una mezcla de pulpa de maracuyá y banano. Para la detección de levaduras con actividad pectinasa, estas se sembraron en un medio mineral con pectina como única fuente de carbono. Mediante un ensayo cualitativo con lugol, se logró determinar las mejores cepas productoras de pectinasas pertenecientes a los géneros: *Candida* y *Pichia*. Finalmente, se caracterizaron a las enzimas y se determinó que estas se encuentran presentes en el medio extracelular y que las condiciones más favorables para su correcto funcionamiento son p H 5 y 30°C.

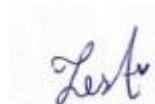
Palabras claves: *Theobroma cacao*, *pectinasas*, *biología molecular*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida*



María Fernanda Rosales M.
Coordinadora de Escuela
Ingeniería en Alimentos



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres
Director de Tesis



Leslie Alexandra Aucapiña Alvarez
Autora

Identification and purification of yeast pectinolytic enzymes from cocoa fermentation for application in the food industry.

ABSTRACT

Pectinolytic activity was characterized in yeasts from the spontaneous fermentation of cocoa variety CCN-51, whose mucilaginous material was replaced by a mixture of passion fruit and banana pulp. For the detection of yeasts with pectinase activity, cultures from cocoa fermentation were taken and seeded in a mineral medium with pectin as the only carbon source. By means of the qualitative assay with lugol, the best pectinase-producing strains belonging to the *Candida* and *Pichia* genera were identified. Finally, the enzymes were characterized and it was determined that the enzymes work best at pH 5 and 30°C.

Key words: *Theobroma cacao*, molecular biology, *Pichia kudriavzevii*, *Candida*



Ing. María Fernanda Rosales M.

Faculty Coordinador

Food Engineering



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

Thesis Director



Leslie Alexandra Aucapiña Alvarez



Translated by

Leslie Aucapiña

INDICE DE CONTENIDOS

Tabla de contenido

Capítulo I.....	10
Generalidades cacao	10
1.1. Microorganismos presentes en la fermentación del cacao	10
1.2. Pectinasas	11
1.3. Pectina	12
1.3.1. Composición y estructura	12
Figura 1. Estructura de la molécula de pectina. Se representa una cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado	12
1.3.2. Aplicaciones de la pectina	12
1.3.3. Ventajas que supone producir pectinasas a partir de levaduras	13
CAPITULO II.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Reactivación de levaduras	14
2.2. Detección de levaduras con actividad pectinolítica	14
2.3. Ensayo cualitativo de la actividad pectinasa en medio líquido	14
2.4. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular e intracelular a diferentes pHs y temperaturas	15
2.4.1. Preparación de buffer	15
2.5. Identificación molecular de la levadura	15
2.5.1. Amplificación de la región ITS mediante PCR	15
2.5.2. Electroforesis de ADN	16
2.5.3. Secuenciación del ADN	16
2.6. Producción, extracción y semi purificación de las pectinasas	17
2.7. Precipitación por salado (sulfato de amonio)	17
2.8. Desalado	17
2.9. Análisis SDS-PAGE	18
2.10. Cuantificación de proteínas (Bradford)	18
Capítulo III	19
RESULTADOS	19
3. Detección de levaduras con actividad pectinolítica	19
3.2. Selección de cepas	19
3.3. Ensayo cualitativo de la actividad pectinasa en medio líquido	20

3.4. Evaluación de la actividad pectinolítica intracelular y extracelular a diferentes pHs y temperaturas.....	21
3.5. Identificación molecular de las levaduras.....	22
3.6. Análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes.....	24
3.7. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular de la enzima purificada a diferentes pHs y temperaturas.....	24
3.8. Cuantificación de proteínas (Bradford).....	25
DISCUSIONES.....	27
CONCLUSIONES.....	31
ANEXOS.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la molécula de pectina. Se representa una cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado..... 12

Figura 2. Aislados levaduriformes sembrados en medio rico en Pectina, revelados con una solución de Lugol después de 48 horas de incubación a 30°C. 19

Figura 3. SDS-PAGE de proteínas de *Picchia kudriavzevii* y *Picchia burtonii*; carriles 1 y 8 marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder), carril 2 (25 µL de proteínas extracelulares de *P. burtonii*), carril 3 (25 µL de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*), carril 4 (12 µL de proteínas extracelulares de *P. burtonii*), carril 5 (12 µL de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*), carril 6 (6 µL de proteínas extracelulares de *P. burtonii*) y carril 7 (6 µL de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*)..... 24

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño del halo de las cepas de levaduras seleccionadas	20
Tabla 2. Evaluación de la actividad pectinasa en medio líquido. Los valores son las mediciones realizadas a las longitudes de onda especificadas en la columna de la izquierda.	21
Tabla 3. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular a diferentes pHs y temperaturas.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Identificación de levaduras al comparar las secuencias de sus regiones ITS, con la base de datos GenBank	22
Tabla 5. Cuantificación de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford	26
Tabla 6. Concentración de los productos de PCR purificados	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma	35
Anexo 2. Página web para calcular la saturación exacta de sulfato de amonio	36
Anexo 3. Cuantificación del ADN	36

Leslie Alexandra Aucapiña Álvarez

Trabajo de graduación

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, PhD

Abril, 2023

**IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS DE LEVADURAS
PROVENIENTES DE LA FERMENTACIÓN DEL CACAO PARA SU APLICACIÓN EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA**

INTRODUCCIÓN

En el mucílago fermentado del cacao habitan microorganismos que pueden aprovecharse con el fin de obtener productos de gran interés y con múltiples aplicaciones. Es conocido que, durante el proceso de fermentación de granos de cacao, la generación de exudados es el resultado de la acción de enzimas con actividad pectinolítica que son excretadas por levaduras allí presentes de los géneros: *Saccharomyces.*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Pichia* y *Candida* (Hurtado & Otálvaro, 2020). Esto presenta una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales, ya que demuestran ser ventajosas sobre los mohos con respecto a la producción de pectinasas. Por otro lado, las enzimas son herramientas biotecnológicas muy valiosas en la elaboración de alimentos. Particularmente las pectinasas se emplean en muchos procesos industriales, como por ejemplo la extracción, clarificación y reducción de viscosidad en jugos de frutas, extracción de aceites de vegetales y cítricos, fermentación de café y té, entre otras numerosas aplicaciones industriales (Merín & Morata de Ambrosini, 2018).

Así, el objetivo de la presente investigación fue identificar y purificar enzimas pectinolíticas desde levaduras provenientes de la fermentación de cacao.

Capítulo I

Generalidades cacao

El cacao es un árbol originario de las selvas de América Central y del Sur, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao*. El árbol de cacao es nativo de América tropical y pertenece a la familia de las Esterculiáceas. Su cultivo se extiende desde Brasil hasta México, aunque también está presente al oeste de África (Arvelo, González, Maroto, Delgado, & Montoya, 2017)

En Ecuador se producen dos variedades principales de cacao: CCN-51 y el denominado Cacao Fino de Aroma o Nacional. No obstante, en la actualidad se cultiva mayoritariamente la variedad CCN-51, la cual es un clon que se obtuvo en el cantón naranjal en la hacienda “Sofa” proveniente del cruce de los clones ICS-953 y IMC-674. Aunque esta variedad es más productiva, gracias a su resistencia a plagas y enfermedades (Quintana & Gómez, 2011), no posee las características necesarias para considerarse un cacao de alta calidad, porque carece de aroma y sabor.

Si bien los granos de cacao de la variedad CCN-51 no tienen los atributos para considerarse de alta calidad, sus características se podrían modificar por su procesamiento postcosecha, específicamente en la fermentación. Carrión (2019) menciona que obtuvo una buena fermentación de los granos de cacao al reemplazar la pulpa natural del cacao CCN51 con pulpas de maracuyá y banano. Asimismo, Montecé (2016), alude que este tipo de frutas poseen ciertas vitaminas y minerales, que pueden ser aprovechados por los microorganismos para su desarrollo.

1.1. Microorganismos presentes en la fermentación del cacao

En una primera fase de la fermentación aparecen generalmente entre cinco y seis especies de levaduras tales como *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida silvae*, *C. zemplinina*, *C. krusei* y *Pichia kudriavzevii* (Erazo, 2019). Las levaduras dominan durante las primeras 24-48 horas por las condiciones iniciales del medio (alta concentración de azúcares, medio ácido y anaerobiosis), lo que ocasiona la despectinización de la pulpa, y esto permite la entrada de oxígeno a la masa de fermentación (Wacher, 2011).

Conforme avanza la actividad microbiana, la temperatura incrementa y alcanza valores aproximados de 45 °C, condiciones que favorecen el crecimiento de bacterias ácido-acéticas, las cuales comienzan a remplazar a las bacterias ácido-lácticas y se convierten en las bacterias dominantes en la fermentación (Wacher, 2011).

Los microorganismos que habitan el mucílago durante la fermentación del cacao pueden aprovecharse con el fin de obtener productos de gran interés y con múltiples aplicaciones. Por ejemplo, durante la fermentación se elimina la pulpa del cacao y esto es producto de la actividad pectinolítica de enzimas microbianas. En consecuencia, los microorganismos en esta fermentación podrían ser una buena fuente de enzimas pectinasas.

1.2. Pectinasas

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas son polisacaridasas que degradan la pectina presente en la lámina media y pared celular primaria de las células vegetales. Las enzimas pectinolíticas se encuentran de manera natural en frutas y vegetales como el caso del cacao, pero también son producidas por microorganismos. Entre ellos se encuentran diferentes géneros de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Las enzimas pectinolíticas corresponden a una mezcla de enzimas que actúan sobre los polisacáridos vegetales que mantienen la integridad de la pared celular, logrando así incrementar el rendimiento del proceso de extracción del jugo de fruta y disminuyendo su turbidez y viscosidad (Otárola, 2017).

Las pectinasas son producidas por plantas y microorganismos entre los cuales se encuentran bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*, las levaduras *Saccharomyces* y *Rhodoturulla* y hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Verticilium* (Lozano & López, 2014). Numerosas compañías producen comercialmente enzimas pécticas a partir de hongos, en especial del género *Aspergillus*, mediante fermentación en sustrato sumergido o en sustrato sólido (Lozano & López, 2014).

Las enzimas pécticas se utilizan en procesos como clarificación, filtración y concentración de los extractos de frutas y vegetales. Otro proceso de gran interés es la maceración, cuyo objetivo es degradar la laminilla media del tejido vegetal para producir células libres relativamente intactas. Dicho proceso fue originalmente desarrollado para obtener bebidas viscosas, turbias y con pulpa,

llamada néctares (Villalpando, y otros, 2010). Además, estas enzimas juegan un papel importante en la fermentación del café, ya que se utilizan microorganismos pectinolíticas, para liberar la cubierta mucilaginosa del grano (Soriano, 2004).

1.3. Pectina

La pectina es un heteropolisacárido de gran importancia que se encuentra en mayor cantidad en frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos suaves, como la cáscara de los cítricos (limón, naranja, toronja), en las manzanas, peras, etc. (Ferreira, 2007).

Se encuentra localizada en la lámina media de la pared celular de las plantas y contribuye a la textura de las frutas y los vegetales (Lozano, 2011). Además, se ha demostrado que algunos fragmentos pécticos poseen actividades intercelulares regulatorias de mecanismos de defensa de la propia planta (Muñoz, 2016).

1.3.1. Composición y estructura

Las pectinas están compuestas por distintos elementos estructurales donde el homogalacturonano y el ramnogalacturonano constituyen la columna vertebral de la pectina junto con algunos azúcares. Su componente más abundante es el ácido galacturónico (**Figura 1**) unido mediante enlaces α (1-4) y cuyos grupos carboxilo están parcialmente metilesterificados en la posición 6. Además, puede encontrarse acetilado en la posición 2 ó 3 dependiendo de la procedencia de la pectina (Chasquibol, Arroyo, & Morales, 2008)

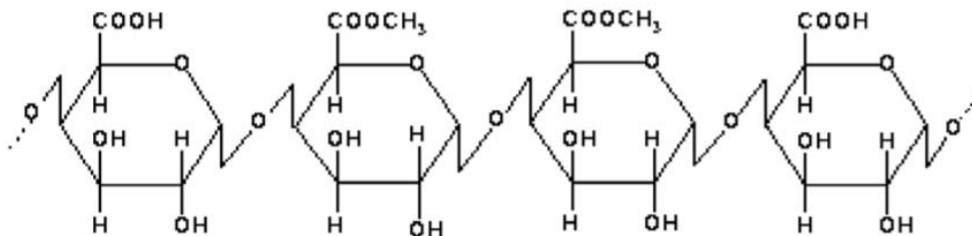


Figura 1. Estructura de la molécula de pectina. Se representa una cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado (Chasquibol, Arroyo, & Morales, 2008).

1.3.2. Aplicaciones de la pectina

La pectina es ampliamente usada como ingrediente funcional en la industria de los alimentos y como fuente de fibra dietética, debido a su propiedad de absorber una gran cantidad de agua para formar geles. Los geles de pectina son importantes puesto que ayudan a modificar la textura

de salsas, compotas y mermeladas. En la industria láctea se usan para la fabricación de yogures y productos lácteos bajos en grasa, en la industria de bebidas dietéticas para la preparación de refrescos, debido a su bajo contenido de carbohidratos, por sus propiedades estabilizantes y por incrementar la viscosidad (Chasquibol, Arroyo, & Morales, 2008).

1.3.3. Ventajas que supone producir pectinasas a partir de levaduras

Las levaduras son una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales. Estos organismos presentan ventajas comparadas con los hongos filamentosos respecto a la producción de pectinasas, debido a que son unicelulares, el crecimiento es relativamente simple y rápido, sólo producen endopoligalacturonasas y casi no liberan metanol tóxico (Merín & Morata de Ambrosini, 2018).

Por otro lado, el hecho de que algunas levaduras sean capaces de sintetizar constitutivamente enzimas poligalacturonasas, constituye una ventaja desde el punto de vista productivo, ya que pueden ser obtenidas como un producto colateral de otra producción como: biomasa, vino cerveza, etc., contribuyendo a aminorar los costes (Rodríguez & Serrat, 2008).

Considerando que la mayoría de pectinasas que se comercializan se obtienen a partir de hongos, la producción y obtención de estas enzimas desde levaduras podría ofrecer una buena alternativa a las preparaciones enzimáticas fúngicas. La obtención de enzimas provenientes de levaduras, sería de gran utilidad en la industria alimentaria para mejorar los procesos de producción de alimentos. Así, por ejemplo, aceleran la fermentación del té y eliminan la espuma que forman los granos debido a la destrucción de la pectina. Por otra parte, en la fermentación húmeda de las semillas de café, la adición de enzimas pectinasas reduce a aproximadamente la décima parte el tiempo de fermentación previa del café para lograr la separación final de las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas (Rodríguez & Serrat, 2008). En vista de lo anteriormente mencionado, el principal objetivo de esta investigación fue obtener enzimas pectinasas de levaduras obtenidas de la fermentación del cacao.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos se utilizaron levaduras previamente aisladas e identificadas de un proceso de fermentación espontánea de cacao de la variedad CCN-51 (Matute, 2021). Se realizó una investigación bibliográfica sobre los microorganismos hallados esta fermentación espontánea, enfocada en levaduras que podrían presentar actividad pectinolítica. De esta forma se seleccionó solo aquellas levaduras potencialmente productoras de este tipo de enzimas.

2.1. Reactivación de levaduras

La reactivación se realizó con el fin de obtener levaduras que sean metabólicamente activas. Para esto, las levaduras provenientes de la fermentación espontánea del cacao variedad CCN-51, se sembraron por agotamiento en agar Sabouraud y las placas Petri se incubaron a 30°C por 48h.

2.2. Detección de levaduras con actividad pectinolítica

La actividad pectinolítica en levaduras se evaluó mediante el ensayo descrito por Haile & Wonhee (2019) Brevemente, las levaduras se cultivaron en placas con medio mineral compuesto por MnSO_4 (0.05 gL^{-1}), KH_2PO_4 (0.2 gL^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 gL^{-1}), CaCl_2 (0.05 gL^{-1}), MgSO_4 (0.8 gL^{-1}); extracto de levadura (1.0 gL^{-1}); pectina cítrica (2.0 gL^{-1}); y agar (15 gL^{-1}), seguido de esto se reguló a pH 5. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 48 horas. La actividad enzimática se detectó mediante el desarrollo de un cambio de color claro (color amarillo) alrededor de las colonias después de inundar la placa con una solución de Lugol.

2.3. Ensayo cualitativo de la actividad pectinasa en medio líquido

Se sembraron las levaduras que dieron positivo para el ensayo 2.2 en medio mineral líquido (como el descrito 2.2, pero sin agar) y se incubó a 30°C durante 48h. La prueba cualitativa consistió en añadir lugol al medio líquido, se esperó 10 minutos y posteriormente se midieron las muestras en el espectrofotómetro (Epoch, Biotek) a longitudes de onda desde 570nm hasta 590

nm con el fin de comprobar que existe actividad pectinasa. Se utilizó como control positivo la enzima pectinasa (Granozyme).

2.4. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular e intracelular a diferentes pHs y temperaturas

En medio mineral líquido (pH 5), se sembró las levaduras que dieron positivo para el ensayo 2.2 y se incubaron a 30°C por 48h. El caldo obtenido luego de la incubación se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5702 R-Alemania) a 4400 rpm por 10 minutos a 4 ± 1 °C y se separó el sobrenadante del pellet que contiene a las células de levaduras. Los sobrenadantes y pellets generados se colocaron en tubos Falcon de 50ml con los diferentes buffers con pectina (pH 4, 5 y 6. Ver 2.4.1). Para cada pH evaluado, se incubó a 25°C, 30°C y 35°C durante 48h.

Transcurrido el tiempo de incubación (48 horas), se revelaron todas las muestras adicionando una solución de lugol a cada una de ellas.

2.4.1. Preparación de buffer

Para llevar a cabo el ensayo de la sección 2.4, primero se prepararon los siguientes buffers: buffer pH 4 se disolvió 8,954g fosfato de hidrógeno disódico y 3,4023g de fosfato di hidrógeno de potasio y se aforó a 1 litro con agua destilada; buffer acetato pH 5 se preparó colocando en un vaso de precipitación 800ml de agua destilada y se añadió 5,772g de acetato de sodio y 1,69 ml de ácido acético y se aforó a 1 litro y ; buffer citrato pH 6 se colocó en un vaso de precipitación 800ml de agua destilada y se agregó 24,269g de citrato de sodio y 3,358g de ácido cítrico y se aforó a 1 litro.

2.5. Identificación molecular de la levadura

Se utilizaron las cepas positivas para actividad pectinasa según el método cualitativo. El ADN de estas fue analizado para la identificación taxonómica mediante herramientas de biología molecular, lo cual se describe a continuación:

2.5.1. Amplificación de la región ITS mediante PCR

Se aplicó el método descrito por Lagos (2017) para la obtención de patrones de polimorfismo de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se emplearon los primers ITS1/ITS4 y NL-1/NL-4 y la polimerasa de ADN Dream Taq (Thermo Scientific). No fue necesario extraer ADN desde las levaduras previo a la reacción de PCR, ya que la alta temperatura aplicada en el primer paso de la reacción sirvió para lisar las células y dejar disponible el ADN para los siguientes pasos de amplificación. Se utilizó un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) con un programa que consistió en un ciclo inicial de 94 °C por 10 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 30 segundos, una temperatura de anillado de 57,4 °C por 45 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 45 segundos y un ciclo final a 72 °C por 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, previo a su envío para ser secuenciados.

2.5.2. Electroforesis de ADN

Mediante electroforesis se obtuvo una estimación de la concentración y del grado de pureza de los productos de PCR. Para esto, se utilizó agarosa UltraPure (Invitrogen) y se preparó un gel al 1.2% en 1X de solución Buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Para la visualización del ADN se utilizó el tinte fluorescente SYBR® Safe (Invitrogen), en una concentración de 1X, y para estimar el tamaño de las muestras se empleó el Ladder 1Kb plus (Invitrogen). Finalmente, se reveló el gel utilizando el equipo ENDURO™ GDS TOUCH (LABNET).

2.5.3. Secuenciación del ADN

Luego de haber obtenido los productos de amplificación de la región ITS de las levaduras aisladas, estos fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y enviados a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se utilizaron los siguientes programas: Snapgene (para eliminar el ruido de la secuenciación), Cap3 assembly (para ensamblar las cadenas de ADN) y la herramienta BLAST para comparar las secuencias contra la base del GenBank (**Anexo 1**). Con esto último fue posible identificar la especie del microorganismo en función de los porcentajes de identidad de las secuencias. Los resultados de anotación de las secuencias fueron tabulados en plantillas de Excel.

2.6. Producción, extracción y semi purificación de las pectinasas

Una vez seleccionadas e identificadas molecularmente las levaduras que presentan buena actividad pectinolítica en placa, se sembraron en medio mineral líquido (sección 2.1, pero sin agar) para la producción de pectinasas.

El caldo obtenido luego de la incubación se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5702 R-Alemania) a 4400 rpm por 10 minutos a 4 ± 1 °C y se separó el sobrenadante del pellet que contiene a las células de levaduras. Tanto el pellet como el sobrenadante fueron resuspendidos en buffer fosfato (0,1M y pH 5) y posteriormente se sonicó con el equipo SONIC RUPTOR 400 (OMNI) con una amplitud de 80% y 5 minutos con un tiempo de descanso de 30 segundos. El lisado tanto del pellet como del sobrenadante se sembró en medio mineral más pectina (pH 5) haciendo pocillos para comprobar si existe actividad pectinolítica intracelular y extracelular, respectivamente.

Para realizar la purificación de las enzimas fue necesario realizar los ensayos que se describen en las siguientes secciones:

2.7. Precipitación por salado (sulfato de amonio)

Se precipitó las proteínas del sobrenadante mediante la técnica conocida como “salting – out” o precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, según la metodología propuesta por Duong y Gabelli (2014). La saturación con sulfato de amonio se realizó al 80% (**Anexo 2**), conforme se adicionaba el compuesto químico se agitaba constantemente. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se recogió las proteínas clarificadas realizando una centrifugación (Centrífuga Eppendorf 5702 R-Alemania) a 3500rpm durante 15°minutos a 4° C.

2.8. Desalado

En geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), las muestras con alta concentración de sulfato de amonio pueden desplazarse de forma anómala debido al alto contenido de sal. Por lo que para disminuir la concentración de sal se utilizó la técnica de diálisis.

Los pellets que se obtuvieron en la precipitación por salado con sulfato de amonio, fueron resuspendidos en buffer acetato 0,1M pH 5 y posteriormente fueron dializados. Para la diálisis

se usó un saco de diálisis (Snake Skin Dialysis Tubing, Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sumergió el saco de diálisis (que contenía la muestra de proteína), en buffer acetato 0,1 M pH 5 durante 24 horas en frío (4°C) y con agitación. Las muestras se sacaron de los sacos de diálisis y se esterizaron por medio de filtros de éster de celulosa de 0,22 µm. Las muestras así procesadas se depositaron en tubos Falcon de 15 mL y se almacenaron a 4 ± 1 °C hasta su uso.

2.9. Análisis SDS-PAGE

La muestra de enzima parcialmente purificada se sometió a un análisis de SDS-PAGE, para caracterizar el patrón de bandas de proteínas. Además, se usó un marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) para estimar el tamaño de las proteínas purificadas. Para visualizar las proteínas fue necesario teñir el gel con azul de Coomassie G-250 de acuerdo con el protocolo descrito por Duong y Gabelli, (2014). El gel fue cubierto con la solución de tinción, se calentó en el microondas durante 1 minuto y se coloreó por 30 minutos en una incubadora (Orbital Shaker-Incubator ES-20) a 37°C a 120 rpm. Luego se desechó el colorante y se agregó el decolorante (100 ml de metanol, 50 ml de etanol, 25 ml de ácido acético glacial y 325 ml de agua destilada) hasta cubrir el gel. Se incubó por 8-10 horas a 25°C a 120 rpm, hasta que el gel se torne transparente y sean evidentes las bandas de las muestras y del marcador de peso molecular.

2.10. Cuantificación de proteínas (Bradford)

La cuantificación de proteínas se realizó según Bradford (1976), usando el reactivo azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Scientific™). Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se leyó la Absorbancia en el equipo Epoch, (Biotek) a 595 nm frente al blanco (buffer en el que se resuspendió la enzima).

Capítulo III

RESULTADOS

3. Detección de levaduras con actividad pectinolítica

3.2. Selección de cepas

De entre las numerosas cepas microbianas aisladas, a partir de la fermentación espontánea de cacao de la variedad CCN-51 (Matute,2021), fueron seleccionadas 58 muestras, que según una revisión bibliográfica podrían presentar actividad pectinolítica. Estas muestras fueron cultivadas en placas con medio mineral suplementadas con pectina. De las 58 cepas analizadas mediante un ensayo cualitativo, el 15% (17 cepas) presentaron actividad pectinolítica en placa.

Con el cultivo en caldo se realizó un nuevo filtro en el cual se sometió a las levaduras a centrifugación y se sembró (en medio sólido con minerales y pectina pH 5) el pellet y sobrenadante. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la prueba con lugol y se seleccionaron cuatro levaduras que fueron las que presentaron un mayor halo de hidrólisis con respecto a las demás. Las levaduras seleccionadas fueron las siguientes: LC22, LC36, LC49. Cabe mencionar que se descartó la muestra LC12, porque podría tratarse potencialmente de levaduras pertenecientes al género *Candida*. En la **Figura 2** se observan los aislados que resultaron positivos para actividad pectinolítica.

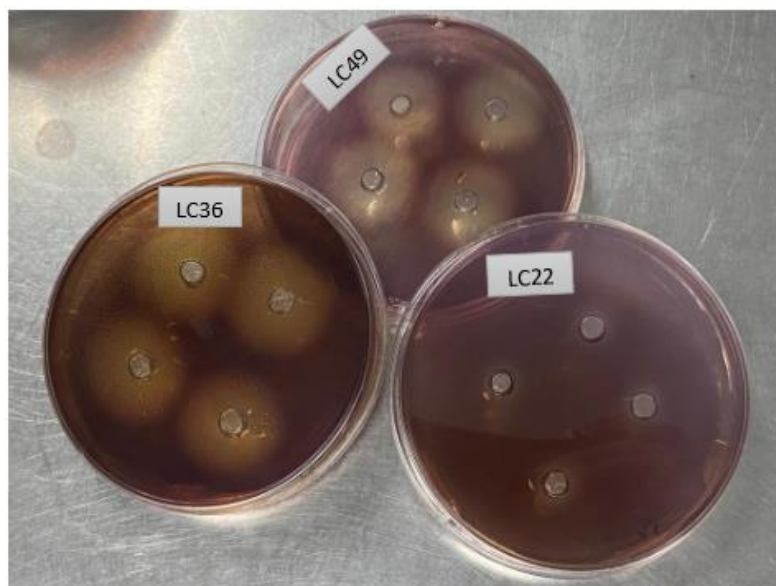


Figura 2. Aislados levaduriformes sembrados en medio rico en Pectina, revelados con una solución de Lugol después de 48 horas de incubación a 30°C.

La capacidad de las tres levaduras (LC22, LC36 Y LC49) de producir enzimas pécticas se evaluó mediante el diámetro de los halos de hidrólisis formados alrededor de cada colonia (**Figura 2**). Las muestras se eligieron por su capacidad de producción de pectinasas, originando los mejores resultados la muestra LC49 con 17mm de diámetro del halo y relación diámetro del halo y del pocillo de 2.83 mm (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tamaño del halo de las cepas de levaduras seleccionadas

Cepa	Diámetro de halo, Dh (mm)	Diámetro del pocillo, Dp (mm)	Relación Dh/Dp
LC36	16	6	2.67
LC49	17	6	2.83
LC22	10	6	1.67

3.3. Ensayo cualitativo de la actividad pectinasa en medio líquido

Para los ensayos de actividad enzimática se tomó como referencia la longitud de onda de la luz amarilla que se sitúa entre 570 y 590 nm.

Los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo indicaron que las tres muestras presentan actividad pectinolítica (**Tabla 2**), ya que al compararlas con el blanco los valores disminuyen, es decir, la intensidad del color amarillo va descendiendo. Esto es el resultado de la hidrólisis de la pectina.

Tabla 2. Evaluación de la actividad pectinasa en medio líquido. Los valores son las mediciones realizadas a las longitudes de onda especificadas en la columna de la izquierda¹.

	Blanco	Control (+) enzima pectinasa	LC22	LC49	LC36
A (570)	0.121±0,001 ^a	0.103±0,001 ^b	0.095±0,001 ^c	0.087±0,001 ^d	0.087±0,001 ^d
A (580)	0.113±0,001 ^a	0.096±0,001 ^b	0.091±0,001 ^c	0.083±0,001 ^d	0.083±0,001 ^d
A (590)	0.105±0,001 ^a	0.089±0,001 ^b	0.090±0,001 ^c	0.080±0,001 ^d	0.083±0,001 ^e

¹Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar de al menos tres réplicas. Los valores con diferente letra en el superíndice en las filas, son significativamente diferentes.

3.4. Evaluación de la actividad pectinolítica intracelular y extracelular a diferentes pHs y temperaturas

Para la evaluación de la actividad pectinolítica extracelular e intracelular se incubaron los sobrenadantes y los pellets de las tres cepas (LC22, LC36 y LC49) en medio líquido más pectina a diferentes pHs y temperaturas. Para este ensayo se tomó como referencia la longitud de onda de 570nm.

Los resultados se observan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Evaluación de la actividad pectinolítica intracelular y extracelular a diferentes pHs y temperaturas¹.

	pH	T °C	Blanco	Control (+)	INTRACELULAR			EXTRACELULAR			
					LC22	LC49	LC36	LC22	LC49	LC36	
A ^(570nm)	4		0,106±0,0004 ^a	0,088±0,001 ^b	0,103±0,001 ^c	0,158±0,002 ^d	0,165±0,001 ^e	0,097±0,002 ^f	0,089±0,001^g	0,09±0,001 ^h	
	5		0,111±0,0003 ^a	0,099±0,001 ^b	0,107±0,0003 ^c	0,106±0,001 ^d	0,117±0,001 ^e	0,09±0,001 ^f	0,087±0,001^g	0,1±0,001 ^h	
		25°C									
	6		0,092±0,0003 ^a	0,092±0,0002 ^b	0,1±0,001 ^c	0,101±0,001 ^d	0,101±0,001 ^e	0,101±0,001 ^f	0,092±0,001^g	0,098±0,001 ^h	
	4		0,091±0,001 ^a	0,106±0,0002 ^b	0,09±0,001 ^c	0,103±0,0003 ^d	0,112±0,003 ^e	0,093±0,001 ^f	0,087±0,002^g	0,099±0,001 ^h	
	5	30°C	0,091±0,0004 ^a	0,068±0,002 ^b	0,112±0,002 ^c	0,116±0,001 ^d	0,184±0,001 ^e	0,098±0,001 ^f	0,067±0,0007^g	0,08±0,002 ^h	
	6		0,106±0,001 ^a	0,087±0,002 ^b	0,115±0,001 ^c	0,118±0,002 ^d	0,113±0,002 ^e	0,102±0,001 ^f	0,09±0,002^g	0,098±0,001 ^h	
	4		0,092±0,001 ^a	0,097±0,001 ^b	0,113±0,002 ^c	0,115±0,001 ^d	0,1±0,0006 ^e	0,101±0,002 ^f	0,095±0,001^g	0,097±0,001 ^h	
	5	35°C	0,095±0,001 ^a	0,088±0,001 ^b	0,167±0,002 ^c	0,175±0,002 ^d	0,112±0,002 ^e	0,1±0,002 ^f	0,085±0,002^g	0,089±0,001 ^h	
	6		0,105±0,002 ^a	0,089±0,001 ^b	0,173±0,001 ^c	0,106±0,002 ^d	0,109±0,001 ^e	0,081±0,002 ^f	0,092±0,002^g	0,097±0,002 ^h	

¹Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar de al menos tres réplicas.

3.5. Identificación molecular de las levaduras

En vista del buen desempeño de estas levaduras y al obtener los productos de PCR en cantidad y calidad suficiente (**Anexo 3**), se procedió a su secuenciación.

Con ayuda de herramientas de biología molecular y bioinformática, se logró identificar a las levaduras con mejor actividad pectinolítica como *Pichia kudriavzevii* (LC36), *Pichia sp* (LC49) y *Pichia burtonii* (LC22) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Identificación de levaduras al comparar las secuencias de sus regiones ITS, con la base de datos GenBank.

Código levaduras			
más primers utilizados	Anotación	%ID	GAP
L22 NL1 Y NL4	<i>Picchia burtonii</i> /		
	<i>Hyphopichia</i> sp. strain SM02UFAM	540/540 (100%)	0/540 (0%)
L22 ITS1 & ITS4	<i>Picchia burtonii</i> /		
	<i>Hyphopichia</i> sp. isolate FMPV07 internal transcribed spacer 1, partial sequence	263/285(92%)	0/285 (0%)
LC36 NL1 Y NL4	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain CBS 5147 18S	582/582 (100%)	0/582 (0%)
	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain TTG-81-2		
LC36 ITS & ITS4	internal transcribed spacer 1, partial sequence	440/440 (100%)	0/440 (0%)
	<i>Pichia</i> sp. strain TEMKMZ1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	260/318 (82%)	6/318 (1%)
LC49 NL1 Y NL4	<i>Pichia</i> sp. isolate JS0107 internal transcribed spacer 1, partial sequence	346/348 (99%)	0/348 (0%)

*ITS1/ITS4 y NL-1/NL-4 corresponden a los primers utilizados en la reacción de PCR.

3.6. Análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes

Las muestras que se utilizaron en el análisis SDS-PAGE fueron previamente concentradas con una solución de sulfato de amonio a 80% y dializadas. Al analizar las bandas en el SDS-PAGE (Figura 5) de los carriles 2 y 3 cargados con 25 μ L de la muestra correspondiente a *P. burtonii* y *P. kudriavzevii* se estimó que el tamaño molecular de las proteínas fue de 18kDa. El carril 5 cargado con 12 μ L de muestra, presentó la banda más tenue con un tamaño superior de la enzima pectinasa producida por *P. kudriavzevii* de 60kDa y 65kDa aproximadamente

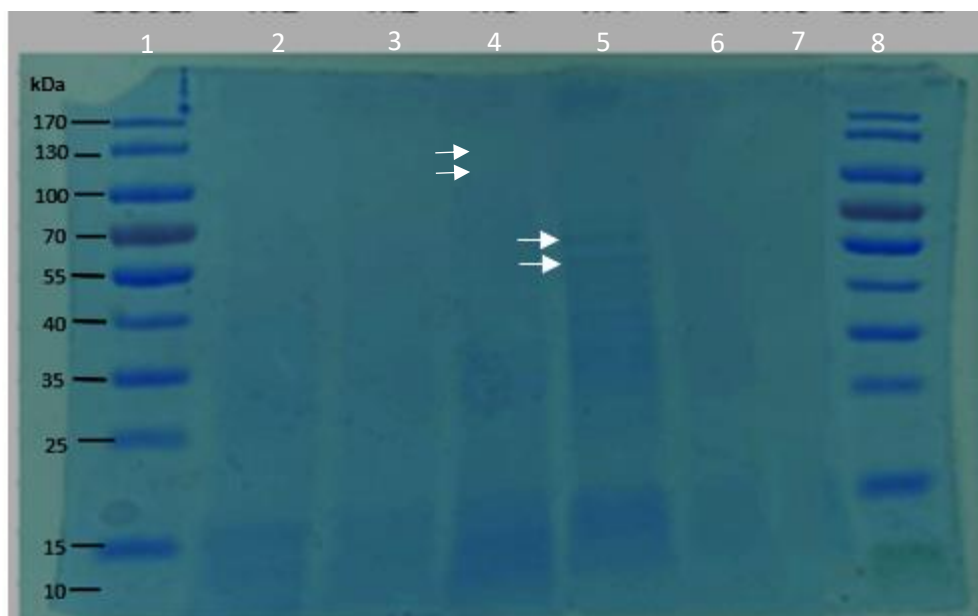


Figura 3. SDS-PAGE de proteínas de *Picchia kudriavzevii* y *Picchia burtonii*; carriles 1 y 8 marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder), carril 2 (25 μ L de proteínas extracelulares de *P. burtonii*), carril 3 (25 μ L de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*), carril 4 (12 μ L de proteínas extracelulares de *P. burtonii*), carril 5 (12 μ L de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*), carril 6 (6 μ L de proteínas extracelulares de *P. burtonii*) y carril 7 (6 μ L de proteínas extracelulares de *P. kudriavzevii*).

3.7. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular de la enzima purificada a diferentes pHs y temperaturas

Para la evaluación de la actividad pectinolítica extracelular de la enzima purificada se incubaron los sobrenadantes de las tres cepas (LC22, LC36 y LC49) en medio líquido más pectina a

diferentes pHs y temperaturas. Para este ensayo se tomó como referencia la longitud de onda de 570nm, porque al comparar los resultados con longitudes de onda de 580 y 590 nm no existía variación significativa en los resultados.

Los resultados se observan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Evaluación de la actividad pectinolítica extracelular a diferentes pHs y temperaturas.

		Control					
	pH	Temperatura	Blanco	(+) enzima pectinasa	LC22	LC49	LC36
A ⁽⁵⁷⁰⁾	4	25°C	0.096	0.101	0.118	0.124	0.107
	5		0.099	0.088	0.09	0.092	0.088
	6		0.092	0.092	0.104	0.104	0.101
	4	30°C	0.106	0.091	0.086	0.094	0.085
	5		0.111	0.083	0.084	0.087	0.083
	6		0.092	0.106	0.108	0.112	0.104
	4	35°C	0.097	0.077	0.139	0.1	0.113
	5		0.088	0.095	0.086	0.086	0.089
	6		0.12	0.084	0.153	0.108	0.109

¹Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar de al menos tres réplicas. Los valores con diferente letra en el superíndice expresan que son significativamente diferentes.

Según estos resultados, existe una mejor actividad catalítica cuando se trabaja a pH 5 y temperatura de incubación 30°C.

3.8. Cuantificación de proteínas (Bradford)

Las muestras usadas para la cuantificación de las proteínas fueron muestras no concentradas. Los valores de la **Tabla 6** corresponden a la sustracción de la muestra control (**blanco**) y el sobrenadante post crecimiento de las levaduras, de esta forma se obtuvo la concentración de los péptidos presentes en cada una de las muestras. Se puede apreciar que *P. kudriavzevii* produce casi el doble de péptidos y proteínas extracelulares en comparación con *P. burtonii*.

Tabla 6. Cuantificación de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford

	<i>P. burtonii</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
Concentración de proteína	425 µg/mL	983.33 µg/mL

DISCUSIONES

En esta investigación se encontraron levaduras que presentaron actividad pectinolítica y, mediante herramientas de biología molecular, fueron identificadas como: *Pichia burtonii* y *Pichia kudriavzevii*. Según Rodríguez & Serrat (2008) en las levaduras la actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara, y está restringida a unas pocas especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Cándida*, *Deberomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, entre otras. La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao, café, uvas e higos, y se caracterizan por producir exclusivamente endopoligalacturonasa extracelular (Blanco, Sieiro, & Villa, 2014).

Al comparar los resultados de la secuenciación llevada a cabo en este trabajo con los resultados de Matute (2020), existió coincidencia en las especies identificadas. Esto evidencia que todo el proceso, desde la reactivación de las levaduras hasta llegar a la identificación molecular, se realizó cuidadosamente para evitar contaminaciones o confusiones entre muestras. Además, es importante enfatizar que, en el trabajo de Matute (2020), solo utilizó una pareja de primers (ITS1-ITS4), mientras que en este estudio se utilizó además otra pareja de primers (NL1-NL4). Esto corrobora con mayor certeza la identificación de las especies en utilizadas en este trabajo.

La actividad de las enzimas obtenidas de las levaduras fue de origen extracelular y se analizaron mediante un gel de electroforesis (SDS-PAGE), donde se pudo visualizar bandas de 18 kDa, 60 kDa y 65 kDa (**Figura 3**). Un estudio realizado por Martín & Morata (2021) muestra que proteínas con un peso molecular que oscila entre 35 a 140 kDa podrían pertenecer al grupo de las enzimas pectinasas. Sin embargo, existen excepciones, como las pectato liasas que son de un menor tamaño molecular, entre 20 y 25kDa (Soriano, 2004). En vista de que en esta investigación no se realizó una purificación completa de la enzima pectinasa, serían necesarios más análisis para determinar con mayor precisión su peso molecular y también el grupo de pectinasas al cual pertenecen.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad pectinolítica extracelular a diferentes pHs y temperaturas, vale decir que existe una mejor actividad catalítica cuando se trabaja a pH 5 y temperatura de incubación 30°C. Matta, Torres, & Serna (2018), mencionan que existe mejor actividad de la enzima pectinasa cuando se trabaja en rangos de 30 a 76°C

dependiendo de la fuente de obtención. Por ejemplo, la temperatura óptima para *Bacillus* es de 30 a 37°C, mientras que para *Aspergillus aculeatus* 30 - 80°C. Tomando esto en consideración cabría esperar que las enzimas en cuestión podrían funcionar bien si son sometidas a temperaturas más altas, siendo favorable para algunos tratamientos que se emplean en la industria de alimentos. Por este motivo, sería muy informativo evaluar las enzimas *P. kudriavzevii* y *P. burtonii* a un rango más amplio de temperatura para observar su comportamiento a temperaturas altas y bajas con el fin de determinar con mayor precisión cual es la óptima para su funcionamiento. Es importante tener en cuenta que cuando existe un aumento de la temperatura se genera un aumento de la velocidad de reacción hasta una temperatura óptima; conforme la temperatura aumenta, el movimiento molecular también se incrementa, y así mismo las colisiones entre enzima y sustrato (Quesada, 2013). No obstante, al tratarse de proteínas, existe un límite de temperatura en el cual estas se desnaturalizan y pierden su efectividad lo cual se puede dar con temperaturas superiores a 45 °C, dependiendo de la naturaleza de la enzima. Se ha descrito que a medida que se incrementa la temperatura y el pH, aumenta la actividad de la pectinasa hasta un punto donde ésta empieza a disminuir (Arellano et al., 2019).

Con relación al pH, las enzimas evaluadas en este trabajo mostraron mayor actividad a pH 5. Según Maidana, Mieres, Zubreski, & Martos (2019) determinaron que a pH 5 y 30°C *Pichia anomalous* produce un valor máximo de actividad poligalacturonasa. También, se ha descrito que el hongo *Aspergillus awamori* presenta una actividad óptima a pH 4,5 y 50°C (Villalpando et al., 2010). Como se puede deducir a partir de estos reportes, cada enzima tiene un pH óptimo, siendo algunas bastante estables a pH más bajos y algunas a pH más altos. Estas propiedades se relacionan en buena medida con los microorganismos del cual estas enzimas han sido aisladas.

Una investigación bibliográfica acerca de las aplicaciones de las enzimas pectinasas, revela que son usadas ampliamente en la industria alimentaria, particularmente en la industria procesadora de frutas y vegetales (Lozano, 2011). El uso más antiguo de las pectinasas es en la optimización de los procesos de filtración y clarificación de jugos (manzana, uva) ya que, las pectinasas degradan la pectina y causan la gelificación de la pulpa facilitando el proceso de filtración. Además, es de gran utilidad en la producción de bebidas frutales concentradas debido a su gran capacidad de estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas (Franchi, Fratebianchi, Pose, & Cavalitto, 2014). Otras de las aplicaciones son la fermentación de café y té, donde el tratamiento

con pectinasa acelera la fermentación y evita la formación de espuma de los polvos de té instantáneo debido a la destrucción de las pectinas (García & Cely, 2020). Las enzimas pectinasas obtenidas en esta investigación se podrían aplicar en la clarificación de jugos y remoción del mucílago del cacao, porque las condiciones de pH y temperatura son favorables para llevar a cabo dichos procesos. Por ejemplo, Lozano (2011), en su investigación utilizó la enzima pectinasa obtenida de *Aspergillus niger* para clarificar jugo de manzana; trabajando a pH 5 y 37°C logrando resultados favorables en cuanto al aspecto del jugo. Otra de las aplicaciones sería en la eliminación de mucílago por vía enzimática como lo realizó Peñuela, Tibaduiza, Morcillo, & Restrepo (2021), utilizaron pectinasa comercial proveniente de *Aspergillus niger*, cuya actividad máxima sobre mucílago de café fue observada a pH 5 y una temperatura de 30 °C, mostró una reducción en el tiempo de remoción hasta del 90 %, sin afectar la calidad.

De acuerdo con las metodologías implementadas y los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación, se puede decir que estas podrían servir como un punto de partida para futuras investigaciones relacionadas con la obtención de enzimas pectinasas a partir de levaduras provenientes de la fermentación del cacao. La producción de enzimas en Ecuador es un campo que aún no está explotado, y la mayoría de las empresas que proveen de aditivos a las industrias de alimentos ecuatorianas los importan, lo cual hace que los costos sean altos al momento de adquirirlos. Si bien las cepas que se analizaron no produjeron la enzima de interés en altas cantidades, se podrían probar otras alternativas para mejorar la producción, por ejemplo, la tecnología del DNA recombinante. Una metodología como esta se aplicó con enzimas de *Bacillus subtilis*, con el objetivo de construir cepas recombinantes de elevada producción y secreción (Soriano, 2004). Como resultado el clon recombinante obtenido presentó actividad degradadora de pectina, demostrando por ello que codifica una pectinasa. De igual forma Franchi, Fratebianchi, Pose, & Cavalitto (2014) trabajaron en mejorar la producción de la poligalacturonasa PG1 recombinante de *A. kawachii* clonada en *S. cerevisiae*; La enzima recombinante, resultó ser excelente para la extracción de pectina a partir del orujo de manzanas y peras. Asimismo, el gen que codifica para una poligalacturonasa (PG1) de *A. awamori* fue clonado en *S. cerevisiae*, obteniendo como resultado alrededor de 1,5-2 U/ml de enzima poligalacturonasa, cantidad equivalente a 70 veces la alcanzada con la enzima silvestre de *A. awamori* (Rojas, 2009).

En caso de que no se consiguiera aumentar la producción de enzima pectinasa, las levaduras aisladas podrían servir como cultivos iniciadores para vinificación, para aplicarlas en las etapas de maceración pre-fermentativa y/o fermentación. Además, existe la posibilidad de que dichas cepas puedan aplicarse en distintos procesos dentro de la industria de alimentos (Merín & Morata de Ambrosini, 2018).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó que es posible obtener enzimas pectinolíticas a partir de levaduras aisladas de la fermentación de cacao, por lo que podría servir como base para analizar más actividades enzimáticas de microorganismos provenientes de productos fermentados.

Se realizó la identificación molecular de las tres muestras de las levaduras seleccionadas y se determinó que pertenecían a las especies: *Picchia kudriavzevii* y *Picchia burtonii*. Se estimó el tamaño molecular de las proteínas extracelulares obteniendo valores de 18kDa, 60kDa y 65kDa.

La evaluación de la actividad pectinolítica extracelular de las levaduras a diferentes pHs y temperaturas, demostró que existe una mejor actividad catalítica cuando se trabaja a pH 5 y 30°C.

Se puede concluir que, a pesar de las limitaciones que se presentaron a lo largo de esta investigación, se logró cumplir con los objetivos planteados obteniendo resultados favorables sobre la obtención de enzimas a partir de microorganismos presentes en la fermentación del cacao. Esto sin duda podría ser de gran interés para las industrias locales y el desarrollo económico de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Alarcón, R., Alarcón, W., & Gasco, F. (2019). Temperature And Ph Effect On The Activity And Stability Of Pectinase. *Revista Científica Universidad De Trujillo* , 33-41.
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual Técnico Del Cultivo De Cacao: Prácticas Latinoamericanas*. San Juan.
- Blanco, P., Sieiro, C., & Villa, T. (2014). Production Of Pectic Enzymes In Yeast. *Fems Microbiol*, 1-9.
- Carrión, S. (2019). Efecto De La Adición De Pulpa De Maracuyá Y Banano Como Coadyuvantes En La Fermentación De Granos De Cacao De La Variedad Ccn-51. Cuenca: Universidad Del Azuay.
- Centeno, C. (2018). Producción De Un Crudo Enzimático (Celulasa,Xilanas) Por *Aspergillus Niger*,Utilizando Residuos Agroindustriales. Riobamba : Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.
- Chasquibol, S., Arroyo, B., & Morales, J. (2008). Extracción Y Caracterización De Pectinas Obtenidas A Partir De Frutos De La Biodiversidad Peruana. *Ingeniería Industrial*, 175-199. Recuperado El 15 De Mayo De 2020, De <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3374/337428492010>
- Erazo, C. (2019). Diseño De Un Fermentador Y Secador Solar Piloto, Para Dos Variedades De Cacao (*Theobroma Cacao L*), En El Cantón El Empalme Provincia Guayas. Quito: Universidad Internacional Sek.
- Ferreira, S. (2007). *Pectinas:Aislamiento ,Caracterización Y Producción* . Colombia: Universidad Nacional De Colombia.
- Flores, R., Mariños, D., Rodríguez, N., & Rodríguez, D. (2013). Optimización De Las Condiciones De Extracción De Pectina A Partir De Cáscara De Limón Francés (*Citrus Medica*) Utilizando La Metodología De Superficie De Respuesta. Trujillo: Universidad Nacional De Trujillo.
- Franchi, M., Fratebianchi, D., Pose, G., & Cavalitto, F. (2014). Producción Nacional De Pectinasas De Origen Fúngico Y Su Aplicación Al Procesamiento Frutihortícola. *Sns*, 1-7. Recuperado El 10 De Septiembre De 2022, De [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/112917/Conicet_Digital_Nro.5a408a27-Ab91-4c25-82b5-400ddf7cca55_A.Pdf?Sequence=2&isallowed=Y#:~:Text=Las%20enzimas%20que%20degradan%20pectina,Et%20al.%2c%](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/112917/Conicet_Digital_Nro.5a408a27-Ab91-4c25-82b5-400ddf7cca55_A.Pdf?Sequence=2&isallowed=Y#:~:Text=Las%20enzimas%20que%20degradan%20pectina,Et%20al.%2c%)
- García, E., Montalvo, C., Andrés, G., & Londoño, L. (2021). Sucesión Microbiana Durante La Fermentación Espontánea De Cacao En Unidades Productivas. *Ciencia En Desarrollo*, 22.
- García, N., & Cely, M. (2020). Evaluación De La Actividad Enzimática De Pectinasa Obtenida De La Pulpa De Guanábana (*Annona Muricata L.*) Y Chirimoya (*Annona Cherimola L.*) Y Su Aplicación En La Extracción De Jugo. Bogotá: Universidad Nacional Abierta Y A Distancia.
- Gutierrez, M. (Diciembre De 2012). Efecto De La Frecuencia De Remoción Y Tiempo De Fermentación En Cajón Cuadrado Sobre La Temperatura Y El Índice De

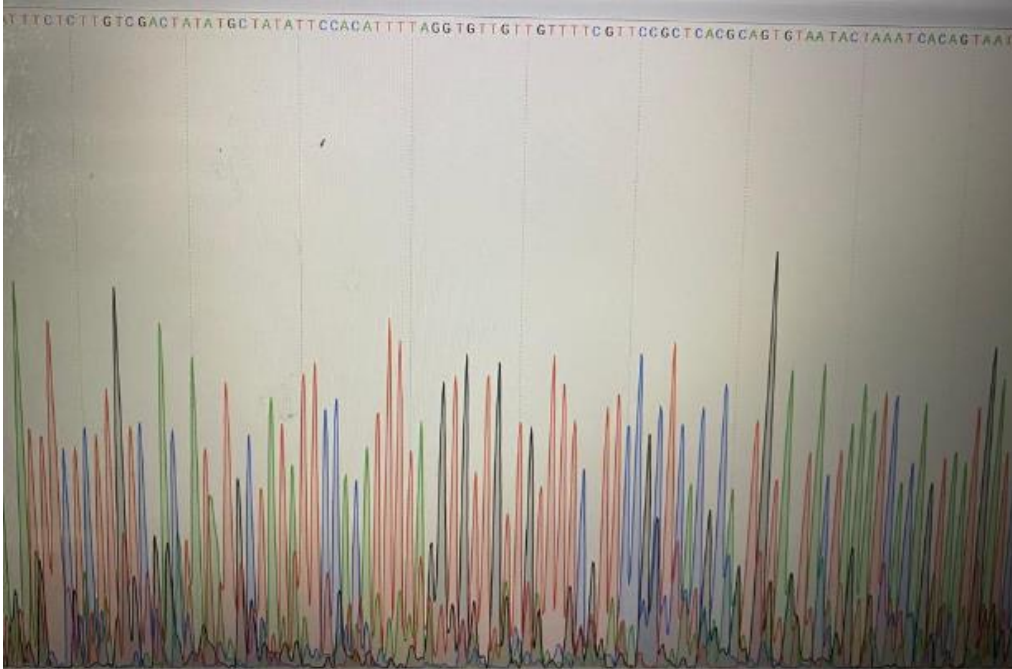
- Fermentación Del Cacao (*Theobroma Cacao L.*). Revista Científica Udo Agrícola, Xii(4).
- Haile, M., & Wonhee, K. (2019). Isolation, Identification, And Characterization Of Pectinolytic Yeasts For Starter Culture In Coffee Fermentation. *Microorganisms*, 3-16. Doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>
- Hurtado, M., & Otálvaro, D. (2020). Determinación De Actividad Pectinolítica En Microbiota Levaduriforme Asociada A Suelos Y Frutos Del Valle Del Cauca . Cali: Universidad San Buenaventura Cali.
- Lozano, A., & López, E. (2014). Endopoligalacturonasa Y Pectinesterasa De *Aspergillus Niger*. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 85-91.
- Lozano, M. (2011). Aislamiento Y Purificación Del Hongo *Aspergillus Niger* Para La Obtención De Enzimas Clarificadoras Aplicables En Biotecnología De Jugos. Cuenca: Universidad Del Azuay.
- Maidana, S., Mieres, A., Zubreski, E., & Martos, M. (2019). Optimization Of Culture Conditions For The Production Of A Microbial Polygalacturonase. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 1-10. Recuperado El 15 De Septiembre De 2022, De http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-75872019000200004&script=sci_arttext&tlng=Es
- Matta, L., Torres, L., & Serna, J. (2018). Caracterización E Inmovilización De Pectinasa Comercial. *Ugciencia*, 40-52.
- Matute, J. (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. Cuenca: Universidad Del Azuay.
- Merín, M., & Morata De Ambrosini, V. (2018). Selección De Levaduras Autóctonas De La Región Vitivinícola D.O.C. San Rafael (Mendoza) Productoras De Pectinasas Activas A Bajas Temperaturas. . Argentina : Facultad De Ciencias Aplicadas A La Industria.
- Montecé, L. (2016). Calidad Física Y Organoléptica De Las Almendras De Cacao (*Theobroma Cacao L*) Del Clon Ccn-51, Con Pre-Secado, Incorporando Frutas Tropicales En El Proceso De Fermentación En La Zona De Vinces-Ecuador. Vinces: Universidad De Guayaquil.
- Muñoz. (2016). Caracterización De Pectinas Industriales De Cítricos Y Su Aplicación Como Recubrimientos De Fresas. Madrid: Uam.
- Otárola, A. (2017). "Efecto De La Enzima Pectolítica Y Levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*) En La Fermentación Y Calidad Del Cacao Var. Criollo (*Theobroma Cacao*)". Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Peñuela, A., Tibaduiza, C., Morcillo, C., & Restrepo, M. (2021). Degradación Enzimática De Mucílagode *Coffea Arábica L.*, Para La Producción de Café Suave Lavado. *Artículo De Investigación Científica Y Tecnológica*, 170-1831.
- Quesada, F. (2013). *Las Enzimas*. Madrid: Publicaciones Orquera.
- Quintana, L., & Gómez, S. (2011). Perfil Del Sabor Del Clon Ccn51 Del Cacao (*Theobroma Cacao L.*) Producido En Tres Fincas Del Municipio De Sancacao

- (Theobroma Cacao L.) Vicente De Chucurí. Bucaramanga: Universidad Nacional Abierta Y A Distancia.
- Rodríguez, F. (2001). Manejo Integral Del Cultivo Del Cacao. Venezuela: Facultad De Agronomía U.C.V.
- Rodríguez, O., & Serrat, M. (2008). Poligalacturonasas De Levaduras: Un Producto Biotecnológico De Grandes Potencialidades. Tecnología Química, 80-85.
- Rojas, N. (2009). Aplicación Biotecnológica: Poligalacturonasa Acidófila De Aspergillus Kawachii. La Plata: Universidad Nacional De La Plata .
- Rosero, L. (2021). Optimización De La Fermentación De Cacao (Theobroma Cacao) De Especies Cultivadas En Los Departamentos De Meta Y Guaviare Colombia. Revisión De Literatura. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Salazar, L. (2017). Aislamiento Y Caracterización De Microorganismos Durante El Proceso De Fermentación De Theobroma Cacao L. De La Variedad "Chuncho" Obtenida En Cuzco, Perú . Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Soriano, M. (2004). Análisis De Sistemas Pectinolíticos Bacterianos. Barcelona, España: Tesis Doctoral. Obtenido De <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=3416>
- Vásquez, J., & Ramírez, M. (2016). Actualización En Caracterización Molecular De Levaduras De Interés Industrial. Revista Colombiana De Biotecnología , 129-139.
- Villalpando, J., Jaubert, S., Córdoba, J., Ibarra, D., Amaya, L., Mateos, J., Herrera, E. (2010). Producción De Pectinasas Por Fermentación En Estado Sólido Utilizando Residuos Agroindustriales. México: Universidad Autónoma De Nayarit.
- Wacher, M. (2011). Microorganismos Y Chocolate. Revista Digital Universitaria, 12(4), 5-6. Obtenido De <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma

Se seleccionó la parte del cromatograma con los peaks bien definido y se eliminó las secuencias de mala calidad de los extremos.




Anexo 1. Cromatograma

Anexo 2. Saturación con sulfato de amonio

Para determinar los gramos necesarios para alcanzar el porcentaje de saturación con sulfato de amonio para precipitar las proteínas presentes en los sobrenadantes, se utilizó la página web (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>), un programa en línea donde se calculó la cantidad exacta de este químico sin la necesidad de usar ecuaciones o fórmulas para la precipitación siguiendo los siguientes pasos como se muestra a continuación:

EnCor Biotechnology Inc.
 540, 4949 SW 41st Blvd.
 Gainesville
 Florida 32608
 Tel (352) 372 7022
 Fax (352) 372 7066



Ammonium Sulfate Calculator:

Ammonium Sulfate Precipitation is a simple and effective means of fractionating proteins. It is based on the fact that at high salt concentrations the natural tendency of proteins not to aggregate is overcome, since the surface charges are neutralized. Charge neutralization means that proteins will tend to bind together, form large complexes and hence are easy to precipitate out by mild centrifugation. Since each protein will start to aggregate at a characteristic salt concentration, this approach provides a simple way of enriching for particular proteins in a mixture, and is used, for example, to isolate immunoglobulins from sera. It is quite easy to bring a preparation to 50% saturated by simply adding an equal volume of saturated Ammonium Sulfate. It is more of a problem to make solutions of higher percentage saturation as you may have to add very large volumes of saturated Ammonium Sulfate. It is usually easier to add solid Ammonium Sulfate to your sample, but calculating how much to add is rather time consuming. The program below calculates how much solid Ammonium Sulfate you need to add to a specific volume of a solution to get a specific percentage saturation at a specific temperature;

Select temperature at which you are working (25°C is default): 0°C 4°C 10°C 20°C 25°C

Enter starting volume of solution in mls:

Desired percentage saturation:

Ammonium Sulfate:

Enter starting percentage saturation of Ammonium Sulfate:

Anexo 2. Página web para calcular la saturación exacta de sulfato de amonio

Anexo 3. Cuantificación del ADN

Los productos de PCR purificados se cuantificaron por espectrofotometría UV/Visible y se evidenció que se contaba con la cantidad y calidad necesaria de ácidos nucleicos. Los resultados se observan a continuación en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Concentración de los productos de PCR *purificados*

Cuantificación ADN			
PRIMERS	MUESTRA	Volumen (µL)	Concentración (ng/µL)
<i>PRIMERS ITS1-ITS4</i>	L22I	12 µL	109,21 ng/µL
	L36I	12 µL	80,5 ng/µL
	L49I	12 µL	97,16 ng/µL
<i>PRIMERS NL1- NL4</i>	L22N	12 µL	52,43 ng/µL
	L36N	12 µL	55,14 ng/µL
	L49N	12 µL	63,95 ng/µL