



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Obtención y caracterización de enzimas de microorganismos  
aislados de la fermentación de cacao**

**Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:  
INGENIERAS EN ALIMENTOS**

**Autoras:**

**TATIANA LUCIA ESPINOZA JUMBO  
GABRIELA ELIZABETH QUELAL DURÁN**

**Director:**

**RODRIGO SEBASTIÁN CAROCA CÁCERES**

**Cuenca – Ecuador**

**2022**

## DEDICATORIA

Primeramente, este trabajo quiero dedicarle a Dios por guiar mi camino. A mis padres, Mario Espinoza y Lucía Jumbo por nunca soltar mis manos, apoyarme incondicionalmente en esta etapa de mi vida y por su enorme sacrificio para ver cristalizado mi sueño. A mis hermanos, Mariuxi y Hugo Espinoza por su inmenso amor y ser quienes me motivaban cuando el camino parecía difícil. A mis sobrinitos, Ángela y Sebastián por darme las fuerzas necesarias para seguir adelante y no rendirme. A mis amigos y amigas que siempre estuvieron conmigo compartiendo tristezas, alegrías y sobre todo brindándome consejos y palabras de apoyo durante toda esta etapa.

Tatiana Lucía Espinoza Jumbo.

El presente trabajo lo dedico a mi padre por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme en cada momento, a mi madre por ser un apoyo incondicional y por estar siempre junto a mí a pesar de las circunstancias, a mis hermanas por darme ánimos para seguir adelante siempre y por mantener mi estado emocional positivo. A mi sobrina por brindarme su cariño y por esperarme siempre con una sonrisa cuando llegaba a casa dándome tranquilidad y felicidad en el momento más complicado. Y a todas las personas que de un modo u otro fueron un apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Gabriela Elizabeth Quelal Durán

## AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a Dios por darme sabiduría y permitir que mis sueños se hagan realidad, a mi tutor de tesis, Dr. Rodrigo Caroca por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados. Al Ing. Diego Montero por su paciencia y ayuda incondicional a lo largo de esta investigación. Además, a la Universidad del Azuay por abrirme sus puertas y a los docentes que de una u otra manera aportaron para mi desarrollo profesional. Quiero agradecer de igual forma a mi familia por apoyarme, pero en especial a mis padres por todo el esfuerzo realizado. A mi amiga y compañera de tesis, Gabriela Quelal por su apoyo y amistad incondicional desde el inicio de la carrera. Finalmente, agradecer a mis amigos por acompañarme y regalarme sus palabras de aliento que hicieron que este camino sea un poco más llevadero.

Tatiana Lucía Espinoza Jumbo.

Primeramente, agradezco a Dios por darme la fuerza y salud para seguir adelante y cumplir con mis metas, al Dr. Rodrigo Caroca por resolver todas las dudas que se desarrollaron a lo largo de esta investigación, por su amabilidad y paciencia. Al Ing. Diego Montero por ayudarnos en el desarrollo de esta tesis y por haber brindado su amistad dentro y fuera del laboratorio. A la Universidad del Azuay por contribuir a mi desarrollo profesional. A mi papá y mamá por todos los consejos y fuerza que me brindaron. A mis hermanas y a mi pequeña sobrina por hacer de mi vida lo mejor. A mi compañera de tesis Tatiana Espinoza por ser uno de los pilares fundamentales para poder seguir adelante y no desfallecer en el proceso. A todos muchas gracias por su compañía y apoyo.

Gabriela Elizabeth Quelal Durán

## “Obtención y caracterización de enzimas de microorganismos aislados de la fermentación de cacao”

### RESUMEN

Las enzimas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, entre otras razones, por su potencial uso en el mejoramiento de las características organolépticas de los alimentos. Cabe recalcar que las enzimas pueden ser de origen animal y vegetal, pero la fuente mayoritaria son microorganismos aislados a partir de productos fermentados. En Ecuador no existe alguna entidad que produzca enzimas por lo que tienen que ser importadas para su uso dentro del país. En vista de estos antecedentes, el objetivo de esta investigación fue producir y caracterizar enzimas con actividad proteasa y lipasa, a partir de microorganismos aislados de la fermentación del cacao. Se analizó cualitativamente la actividad proteolítica y lipolítica de 23 bacterias y 16 levaduras aisladas de dicha fermentación. Realizados los ensayos para la determinación de actividad de interés los microorganismos selectos, se identificaron taxonómicamente mediante PCR y secuenciación de regiones de ADN específicas, resultando ser bacterias de las especies: *Leuconostoc pseudomesenteroides* (proteolítica), *Gluconobacter sp.* (lipolítica) y levaduras *Wickerhamiella pararugosa* (lipolítica), *Wickerhamomyces anomalus* (proteolítica y lipolítica) y *Pichia kudriavzevii* (lipolítica). Se seleccionaron a las bacterias como mejor productoras de las enzimas de interés para su posterior caracterización. En base a los resultados obtenidos, se demostró que es posible la obtención de enzimas proteolíticas y lipolíticas a partir de microorganismos aislados del cacao fermentado, siendo esto una alternativa para la producción de enzimas dentro del país.

**Palabras claves:** Enzima, proteasa, lipasa, fermentación cacao, identificación taxonómica.



Ing. María Fernanda Rosales M.  
Coordinadora de Escuela  
Ingeniería en alimentos



Dr. Rodrigo Sebastián Caroca C.  
Director de trabajo de graduación



Tatiana Lucía Espinoza Jumbo  
Autora



Gabriela Elizabeth Quelal Durán  
Autora

**"Obtaining and characterization of enzymes from microorganisms isolated from cocoa fermentation."**

**ABSTRACT**

Enzymes are widely used in the food industry, among other reasons, for their potential use in improving the organoleptic characteristics of foods. It should be emphasized that enzymes can be of animal and vegetable origin, but the main source are microorganisms isolated from fermented products. In Ecuador, there is no entity that produces enzymes, so they have to be imported for use within the country. In view of this background, the objective of this research was to produce and characterize enzymes with protease and lipase activity from microorganisms isolated from cocoa fermentation. The proteolytic and lipolytic activity of 23 bacteria and 16 yeasts isolated from cocoa fermentation was qualitatively analyzed. The selected microorganisms were taxonomically identified by PCR and sequencing of specific DNA regions, resulting to be bacteria of the following species: *Leuconostoc pseudomesenteroides* (proteolytic), *Gluconobacter sp.* (lipolytic) and yeasts *Wickerhamiella pararugosa* (lipolytic), *Wickerhamomyces anomalus* (proteolytic and lipolytic) and *Pichia kudriavzevii* (lipolytic). Bacteria were selected as the best producers of the enzymes of interest for further characterization. Based on the results obtained, it was demonstrated that it is possible to obtain proteolytic and lipolytic enzymes from microorganisms isolated from fermented cocoa, being this an alternative for the production of enzymes within the country.

**Keywords:** Enzyme, protease, lipase, cocoa fermentation, taxonomic identification.



Ing. María Fernanda Rosales M.  
Faculty Coordinator  
Food Engineering



Dr. Rodrigo Sebastián Caroca C.  
Thesis Director



Tatiana Lucía Espinoza Jumbo  
Author



Gabriela Elizabeth Quelal Durán  
Author

Translated by





Tatiana Espinoza and Gabriela Quelal

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	VI
<b>CAPÍTULO I</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.    Enzimas: aplicaciones y fuentes de obtención .....	10
1.1.    Proteasas.....	10
1.2.    Lipasas.....	11
2.    Fermentación del cacao: microorganismos que participan en el proceso y su potencial uso como fuente de obtención de enzimas de interés. ....	12
2.1.    Composición química del grano de cacao.....	12
2.2.    Fases de la fermentación del cacao .....	12
3.    Producción de enzimas.....	13
4.    Gel de proteínas.....	14
5.    Reacción de PCR como herramienta molecular para la identificación de microorganismos. ....	15
<b>CAPITULO II</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
1.    Cribado de microorganismos aislados de la fermentación del cacao en función de su capacidad para producir enzimas con actividad proteolítica y lipolítica.....	16
1.1.    Reactivación de microorganismos.....	16
1.2.    Selección de los microorganismos con actividad proteolítica.....	16
1.3.    Selección de los microorganismos con actividad lipolítica.....	17
2.    Identificación la especie de los microorganismos empleando herramientas de biología molecular.....	17
2.1.    Reacción de PCR.....	17
2.2.    Electroforesis.....	18
2.3.    Purificación de ADN y secuenciación.....	18
3.    Producción de las enzimas y análisis de actividad intracelular o extracelular. ....	18
3.1.    Selección de microorganismos con mejor actividad proteolítica. ....	18

3.2.	Identificación de microorganismos con mejor actividad lipolítica. ....	18
3.3.	Identificación de actividad intra y extracelular. ....	19
3.3.1.	Lisis celular mediante Sonicación.....	19
4.	Caracterización de la actividad enzimática de las enzimas obtenidas.....	19
4.1.	Determinación cualitativa de la actividad enzimática.....	19
4.2.	Evaluación de la actividad proteasa mediante ensayos de digestión de caseína .....	19
4.3.	Gel de proteínas SDS-PAGE.....	20
4.4.	Revelado de gel.....	20
<b>CAPITULO III</b>	.....	<b>21</b>
<b>RESULTADOS</b>	.....	<b>21</b>
1.	Determinación de la actividad enzimática.....	22
2.	Identificación taxonómica de microorganismos con actividad proteolítica y lipolítica. ...	25
3.	Producción de enzimas.....	26
4.	Determinación del carácter extracelular e intracelular de las enzimas de interés .....	28
5.	Geles SDS-PAGE.....	28
<b>CAPITULO IV</b>	.....	<b>31</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	<b>31</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>35</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>41</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Tinción de Gram: A) Bacteria Gram positiva, B) Bacteria Gram negativa. C) y D) Tinción de levaduras con azul de metileno. Observadas al microscopio óptico a 100X (bacterias) y 40X (levaduras). ..... 21

**Figura 2.** A) Bacteria sin actividad proteolítica; B) Bacteria con actividad proteolítica; C) Levadura sin actividad proteolítica y D) levadura con actividad proteolítica. .... 22

**Figura 3.** A) Bacteria sin actividad lipolítica; B) Levadura sin actividad lipolítica; C) Bacteria con actividad lipolítica, D) Levadura con actividad lipolítica, E) Bacteria crecida sin Tween 80 y F) Bacteria crecida con Tween 80. .... 23

**Figura 4.** A) Matraz control suplementado con leche descremada sin ningún microorganismo; B) Matraz con leche descremada y *Leuconostoc pseudomesenteroides*.. 27

**Figura 5.** A) Matraz control con Tween 80 no inoculado; B) Matraz con Tween 80 y *Gluconobacter* sp. strain y; C) Matraz sin Tween 80 y *Gluconobacter* sp. strain. .... 27

**Figura 6.** A) Sobrenadante extracelular de *Leuconostoc pseudomesenteroides*; B) Fracción intracelular filtrada de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. .... 28

**Figura 7.** SDS-PAGE de proteínas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Marcador de peso molecular, Sobrenadante extracelular (1), Sobrenadante extracelular filtrado (2), Pellet sonificado (3), Pellet sonificado centrifugado (4), Pellet sonificado centrifugado filtrado (5), Marcador de peso molecular..... 29

**Figura 8.** SDS-PAGE del ensayo cualitativo de hidrólisis de caseinato sódico de bovino (5mg/ml) con la proteasa de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. En todos los geles: Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Caseína pura a tiempo cero; Carril 3. caseína con cuajo a 4 h. En A (30°C), B (35°C) y C (40°C) los carriles 4, 5, 6 y 7 corresponde a la hidrólisis de caseína a 30', 1h, 4h y 24 h. El carril 8 es caseína pura luego de 24h de incubación. En D. Carril 4,5 y 6 corresponden a la hidrólisis de la caseína a las 24 h de los tratamientos a 30, 35 y 40°C. respectivamente. El carril 7 corresponde a caseína pura 24 h..... 30



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Bacterias con actividad enzimática proteolítica y/o lipolítica. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Levaduras con actividad enzimática proteolítica y/o lipolítica. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Identificación taxonómica de bacterias mediante secuenciación de la región 16S. .....	25
<b>Tabla 4.</b> Identificación taxonómica de levaduras mediante secuenciación de la región ribosomal utilizando los Primers ITS 1-ITS4 Y NL1-NL4.....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Ensayos en medios sólidos utilizando diferentes sustratos. A, B y C. corresponden a bacterias y D, E y F a levaduras. A y D sustrato de aceite de oliva, B y E sustrato de aceite de girasol y C y F sustrato de Tween 80. ....	41
<b>Anexo 2.</b> Geles SDS-PAGE de enzima lipolítica. A. enzima obtenida de un medio sin Tween 80, B. enzima obtenida de un medio con Tween 80.....	42
<b>Anexo 3.</b> Diálisis del sobrenadante con enzima lipolítica, saturación al 80% con sulfato de amonio. ....	42

# CAPÍTULO I

## Obtención y caracterización de enzimas de microorganismos aislados de la fermentación de cacao

### INTRODUCCIÓN

#### 1. Enzimas: aplicaciones y fuentes de obtención

Las enzimas son proteínas de alto peso molecular y alta especificidad. En los organismos vivos, participan de manera óptima en las reacciones metabólicas y posteriormente se liberan sin alterar su función. Esto permite que la enzima se utilice en reacciones continuas, lo que la convierte en uno de los catalizadores más eficientes de la naturaleza. Desde el comienzo de la enzimología aplicada, ha habido un debate considerable sobre si las enzimas aisladas de organismos vivos pueden actuar como biocatalizadores como lo hicieron en el organismo de origen (Castañeda, 2019).

Hasta la actualidad, las enzimas se han aislado, purificado, inmovilizado y utilizado con éxito en una variedad de procesos tecnológicos, convirtiéndose en un área de especial interés para toda la industria (Castañeda, 2019). Han sido clasificadas según las reacciones que catalizan en: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y las ligasas (Peña & Quirasco, 2014).

Las enzimas se pueden obtener a partir de tejido animal, tejido vegetal o mediante procesos de fermentación con microorganismos seleccionados. El uso de enzimas a nivel industrial se puede ver limitado por los costos de disponibilidad, razón por la cual los microorganismos son una mejor fuente de enzimas en comparación con las plantas y los animales. Obtener enzimas de microorganismos ofrece importantes ventajas como: espacio de producción reducido, no depende de la estación y rápido crecimiento de microorganismos productores sobre medios de cultivos económicos. Adicionalmente, las enzimas microbianas son más estables y la producción es más conveniente y segura. En vista de todas estas ventajas, el 50% de las enzimas son obtenidas de hongos y levaduras, 35% de bacterias y solo un 15% de plantas y animales (Moral, Ramírez, & García, 2015).

La producción de enzimas a partir de microorganismos tiene una extensa aplicación en la industria, incluida la de alimentos, donde sirve para mejorar los procesos de producción, y otros componentes relacionados, como sabor, aroma, color, textura, apariencia, vida de anaquel, valor nutritivo, etc (Rigo, y otros, 2021). Las enzimas con mayor aplicación en la industria alimentaria son las proteasas y lipasas las cuales se describirán a continuación.

#### 1.1. Proteasas

Las proteasas tienen la función de hidrolizar los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos en las proteínas, dando lugar a péptidos más pequeños y aminoácidos libres

(García, González, & Palma, 2019). Algunas investigaciones sugieren que, cuanto más fuerte sea la estructura tridimensional de una proteína, las proteasas deben superar mayores dificultades para que puedan realizar su función (Queiroz & Barbosa, 2020).

Las proteasas han sido clasificadas ampliamente en endopeptidasas y exopeptidasas de acuerdo al sitio de escisión, donde las endopeptidasas cortan a las proteínas en sitios alejados de cualquiera de los terminales para producir mono-, di-, tri- o polipéptidos, mientras que las exopeptidasas cortan a las proteínas en el extremo C-terminal. También han sido clasificadas en seis tipos según el tipo de residuo de aminoácido presente en su sitio activo como: serina, cisteína, treonina, ac. aspártico, ac. glutámico y metaloproteasas (Alejando, Flores, & Zavaleta, 2017).

Las proteasas de origen microbiano son uno de los grupos más importantes de enzimas comerciales, debido a su amplia gama de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, médica, textil, etc. Además, estas enzimas se utilizan en formulaciones de detergentes, así como en procesos de biorremediación y gestión de residuos (Alejando, Flores, & Zavaleta, 2017).

## **1.2. Lipasas**

Las lipasas, también conocidas como acilglicerol éster hidrolasas, son enzimas que se encargan de catalizar la hidrólisis de grasas y aceites, dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos (Balcão, Paiva, & Malcata, 1996). Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se pueden obtener a partir de animales, plantas y microorganismos (López, 2015).

En la actualidad, las lipasas producidas por microorganismos han ganado interés industrial gracias a su versatilidad y mayor rendimiento, así como a su producción estacionalmente independiente en comparación con las producciones animales y vegetales. Además, su producción resulta fácil y económica (Rigo, y otros, 2021).

Las enzimas lipolíticas se dividen en dos grupos grandes: las lipasas y las esterases. Las primeras actúan sobre acilglicérols de cadena larga (> 10 átomos de carbono) y las esterases actúan sobre acilglicérols de cadena corta (< 10 átomos de carbono). Las lipasas han sido clasificadas por Arpigny & Jaeger (1999) en 8 familias que son: Familia I o lipasas verdaderas, familia II o GDSL (Glicina, Ácido aspártico, Serina, Leucina), familia III, Familia IV o LSH (lipasa sensible a hormona), familia V, familia VI, familia VII y familia VIII.

Las lipasas llevan a cabo diferentes reacciones catalíticas tales como la hidrólisis, la esterificación (síntesis de un éster a partir de un ácido carboxílico y un alcohol) o la transesterificación. Esta última engloba tres reacciones que incluyen la alcoholólisis (intercambio de grupos entre un éster y un alcohol), la acidólisis (intercambio entre un éster y un ácido) y la interesterificación (intercambio entre dos ésteres) (López, 2015).

Entre los principales microorganismos productores de enzimas lipolíticas se encuentran los hongos de los géneros *Rhizopus sp.*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* y

*Rhizomucor*. Dentro de las levaduras se encuentran: *Candida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Torulaspora globosa* y *Trichosporon asteroides*. Por último, dentro de las bacterias se encuentran en mayor cantidad las del género *Bacillus*, también se pueden obtener enzimas lipolíticas a partir de *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia* y *Staphylococcus caseolyticus* (Liu & Kokare, 2017).

Actualmente, las lipasas se encuentran entre los biocatalizadores más valorados en el campo de la biotecnología y se pueden utilizar en diferentes industrias ya sea la alimentaria, de detergentes, textil, farmacéutica y cosmética (Rigo, y otros, 2021).

Como se mencionó previamente, es conocido que los microorganismos son una de las fuentes principales para la obtención de enzimas. Los procesos de fermentación, en especial aquellos en que se caracterizan por la participación de una alta diversidad de microorganismos, podrían aprovecharse para el aislamiento de microorganismos con actividades enzimáticas.

Teniendo en cuenta lo anterior, para este estudio se trabajó con microorganismos aislados de la fermentación del cacao. A continuación, se detalla información acerca de este proceso.

## **2. Fermentación del cacao: microorganismos que participan en el proceso y su potencial uso como fuente de obtención de enzimas de interés.**

Actualmente, en Ecuador el cultivo de cacao representa uno de los rubros de mayor importancia económica para el país (Erazo, 2019). Para aprovechar sus características es necesario que se someta a una serie de diferentes procesos bioquímicos, microbiológicos y enzimáticos. Primeramente, se lleva a cabo la fermentación del mucílago por acción de microorganismos que producen alcoholes, ácidos y liberan calor; seguido a esto se producen diferentes reacciones bioquímicas en el cotiledón, las cuales son estimuladas por el transporte de los metabolitos de los microorganismos. Cabe mencionar, que las levaduras son las primeras que colonizan el cacao, seguidas por bacterias lácticas (BAL) y finalmente por bacteria acéticas (BAA) (García, 2000).

### **2.1. Composición química del grano de cacao**

Los granos de cacao contienen grasa, proteínas, almidón y las células con pigmentos que son responsables de la coloración como los polifenoles y purinas. La composición química depende del tipo de cacao, el origen geográfico, el grado de madurez, la calidad de la fermentación, el secado y el procesamiento de los granos. Por otro lado, el mucílago está constituido por agua, azúcares, glucosa, pectinas y ácido cítrico (Erazo, 2019).

### **2.2. Fases de la fermentación del cacao**

Se considera que la pulpa del cacao tiene aproximadamente 10% de azúcares y 2% de ácido cítrico y la fermentación pasa por dos etapas (Maisincho, 2006). En la primera etapa las almendras de cacao son invadidas por levaduras que convierten los azúcares sencillos del mucílago en etanol y degradan la pectina, lo que modifica la textura del grano y elimina el ácido cítrico, lo que trae como consecuencia una disminución de la acidez (Wacher, 2011).

Dentro de la primera etapa de fermentación se encuentran dos fases:

Fase 1: Dentro de las primeras 24/36 h se lleva a cabo una fermentación alcohólica por acción de levaduras las cuales tienen como función convertir los azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Este proceso ocurre en condiciones de bajo oxígeno y pH inferior a 4. La temperatura de los primeros dos días es entre 32 y 38°C (AGROBIZ, Insitu, 2020). La actividad más importante de las levaduras es la producción de etanol a partir de carbohidratos, principalmente glucosa, produciendo además dióxido de carbono y una amplia gama de metabolitos secundarios, como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas, compuestos azufrados y nitrogenados. Estos metabolitos pueden variar dependiendo de las especies de levaduras que predominen el proceso (Suárez, Hernández, & Figueroa, 2021).

Existen algunas cepas de levaduras que producen pectinasas (degradan pectina), lo que ayuda a la reducción de la viscosidad en el mucílago dando lugar a una mayor aeración sobre la masa total del grano (García, 2000).

Fase 2: Esta ocurre entre las 48 y 96 h en donde se produce una fermentación láctica que se lleva a cabo por bacterias ácido lácticas. Este tipo de microorganismos están presentes desde el principio de la fermentación, pero solo se vuelven dominantes una vez que las levaduras se van inhibiendo (AGROBIZ, Insitu, 2020). Las BAL convierten un amplio rango de azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico, por lo cual contribuyen a la degradación de la pulpa, la acumulación de sabores, y la inhibición de microorganismos de deterioro. Adicionalmente, las BAL producen etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos (Suárez, Hernández, & Figueroa, 2021).

La acción de las levaduras y las BALs dan lugar a que suceda la segunda etapa de la fermentación, ya que estas ocasionan un cambio importante en las condiciones del hábitat, provocando un descenso en los niveles de acidez y un incremento en los niveles de oxígeno, dando prioridad a la población microbiana de las BAA (Moreno, 2019).

Fase 3: En esta se da una fermentación acética que es producida por las BAA. Estos microorganismos se encuentran presentes durante toda la fermentación, tomando importancia en el final cuando aumenta la ventilación (AGROBIZ, Insitu, 2020). El ácido acético producido por estos microorganismos incrementa la acidez en los granos y al difundirse causa la muerte de los cotiledones, lo que conlleva a la activación de enzimas endógenas del grano de cacao con actividad hidrolítica como las carboxipeptidasas, endoproteasas y galactosidasas. Estas modificaciones bioquímicas en el interior del grano conllevan a la síntesis de los precursores de color y sabor del cacao. Es así como, la acción bioquímica de los microorganismos presentes en la fermentación del cacao permite mejorar las características del grano final, ya que intervienen en el desarrollo de aroma, sabor y color en el grano causadas por reacciones de tipo enzimática (Suárez, Hernández, & Figueroa, 2021).

Para aprovechar las enzimas producidas por los microorganismos es necesario llevar una correcta producción de estas, la cual se describe a continuación.

### **3. Producción de enzimas**

Para la producción de enzimas se debe seguir una serie de etapas previas al proceso de síntesis, las cuales son conocidas como “Upstream”, fermentación y “Downstream”. Dentro

del Upstream se debe mantener y propagar el microorganismo de interés, además se lleva a cabo la preparación del medio del cultivo el cual debe contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos y la producción de la enzima. Seguida a esta, la siguiente etapa es un proceso de fermentación en donde se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo ya sea de forma aeróbica o anaeróbica y la producción de la enzima (Castañeda, 2019).

Por último, en la etapa del denominado Downstream, se da la recuperación de la enzima de interés que tiene como objetivo aislar el biocatalizador del medio de cultivo. Las enzimas pueden ser extracelulares (fuera de la célula) e intracelulares (dentro de la célula). En este último caso es necesario liberar el producto al medio. La ruptura celular es necesaria para la liberación de las proteínas intracelulares y se han descrito distintos métodos para lograrlo: métodos físicos (molino de perlas, homogeneizadores, ultrasonificadores), métodos químicos (surfactantes, álcalis fuertes, solventes orgánicos) y métodos enzimáticos (lisozimas, glucanasas) (Castañeda, 2019).

Una vez obtenidas las enzimas de los microorganismos, resulta necesario un análisis cualitativo de las enzimas obtenidas a partir de ellos. Para este propósito los geles de SDS-PAGE resultan de gran ayuda.

#### **4. Gel de proteínas**

La electroforesis desnaturante de proteínas es más conocida como SDS-PAGE, por sus siglas en inglés (Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). Las placas de gel de poliacrilamida se forman mediante la co- polimerización de la acrilamida, en donde se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'- metilen bis- acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N'- tetrametilendiamina) (Pérez, Soriano, Ponce, & Díaz, 2015).

Este método consiste en la desnaturalización completa de las proteínas al provocar la pérdida de su estructura tridimensional. Para ello, las proteínas se someten a un tratamiento con 2-mercaptoetanol a 100°C durante 5 minutos, provocando la reducción de puentes disulfuro y como consecuencia una separación de las cadenas polipeptídicas. A su vez, la cadena de hidrocarburo hidrofóbico de SDS rodea las cadenas polipeptídicas ya separadas, orientando el ion sulfato, hidrofílico, con carga negativa hacia el medio acuoso. De esta manera todas las cadenas polipeptídicas adquieren una carga negativa neta y todas las cadenas polipeptídicas quedan aisladas (Pérez, Soriano, Ponce, & Díaz, 2015). Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas se separan por tamaño, siendo las proteínas pequeñas las que muestran una mayor movilidad electroforética en comparación con las proteínas de mayor tamaño.

Para la tinción de los geles uno de los métodos más sencillos y comunes es la tinción con el colorante azul Coomassie. Este colorante permite detectar entre 0.1 y 0.5 µg de proteína en el gel, gracias a que se une fuertemente a las proteínas por una combinación de atracción electrostática a aminoácidos básicos (histidina, lisina y arginina) e interacciones hidrofóbicas entre fenilalanina y los grupos fenilo del colorante (Menor, 2019).

Sumado a eso, otra parte importante de esta investigación es la identificación de los microorganismos productores de enzimas de interés, para lo cual es necesario el uso de herramientas de biología molecular, como por ejemplo la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

### **5. Reacción de PCR como herramienta molecular para la identificación de microorganismos.**

La PCR realiza la amplificación de un segmento de ADN con ayuda de cebadores específicos. Esta técnica es útil para la detección e identificación de microorganismos, la cual se basa principalmente en realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo (Gerard, 2015).

Para la identificación de especies bacterianas, principalmente ha sido analizado el gen de ARN ribosómico 16S (Guerrero, 2018) el cual tiene una secuencia aproximada de 1.550 pb de longitud y posee regiones variables y conservadas con secuencias de únicas para cada grupo filogenético. Las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas de bacterias desconocidas, al ser comparadas con secuencias de bacterias conocidas en las bases de datos, son de gran ayuda para clasificar a las bacterias a nivel de género o hasta en algunos casos se ha llegado a identificar especies (Cortés, Ordóñez, & Domínguez, 2019).

Por otra parte, para la identificación de levaduras, comúnmente son analizados los genes de ARN ribosomal 18S, 5.8S y 28 S. Entre los genes 18S y 28S se encuentra la región interna espaciadora de transcripción (ITS), la cual se amplifica por iniciadores específicos unidos en estas dos unidades. El primer espaciador transcrito interno (ITS 1) se localiza entre los genes 18S y 5.8S y entre los genes 5.8S y 28S está el segundo espaciador transcrito interno (ITS2) (Guerrero, 2018).

Luego de la reacción de PCR, el ADN obtenido se somete a una secuenciación para obtener información de la secuencia de las bases. Los resultados se almacenan en forma digital y la secuencia es obtenida utilizando softwares especializados (Gerard, 2015). Finalmente, con ayuda de herramientas bioinformáticas (ej. BLAST) se puede identificar la especie a la que pertenece el microorganismo.

Por último, por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo fue producir y caracterizar enzimas con actividad proteasa y lipasa a partir de microorganismos aislados de la fermentación del cacao.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el desarrollo de esta investigación, se trabajó con microorganismos provenientes de una fermentación de cacao CCN-51 previamente aislados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay (Matute, 2021; Villacrés, 2021). Estos microorganismos corresponden a bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y levaduras, las cuales se encuentran almacenadas como stocks de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **1. Cribado de microorganismos aislados de la fermentación del cacao en función de su capacidad para producir enzimas con actividad proteolítica y lipolítica.**

##### **1.1. Reactivación de microorganismos.**

Las bacterias (BAA y BAL) se reactivaron en caldo de Lactobacilli MRS (Man, Rogosa & Sharpe) debido a que se utilizó este medio anteriormente para su aislamiento. Se reguló el pH de acuerdo a las especificaciones de cada bacteria en 5 – 5,5 – 6,5. En cuanto, a las levaduras, se reactivaron en caldo PD (Papa Dextrosa) regulando su pH en 4,5 – 5 – 5,5. Para ajustar el pH de los medios de cultivo se utilizó NaOH 2M ó HCl 2N, para subir o bajar el pH, respectivamente. De los microorganismos del stock se tomaron 70  $\mu\text{l}$  que fueron inoculados en 5ml del caldo correspondiente y se incubaron por 48 h a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en condiciones de anaerobiosis (bacterias) o en condiciones aeróbicas (levaduras).

De los caldos de bacterias se tomaron alícuotas de 80  $\mu\text{l}$  y se extendieron en placas elaboradas con Lactobacilli MRS (Man, Rogosa & Sharpe), Bacto Agar (1,5%) y sorbato de potasio (0,2%). Del caldo de las levaduras se inoculó en placas elaboradas con PD (Papa Dextrosa) y Bacto Agar (1,5%) mediante la técnica de estriado. Ambos tipos de placas fueron incubadas en las condiciones previamente mencionadas.

Las bacterias y levaduras cultivadas se analizaron mediante tinción de Gram y tinción con azul de metileno, respectivamente.

##### **1.2. Selección de los microorganismos con actividad proteolítica.**

Para la preparación de medio se utilizó Nutrient Broth (Condalab), Bacto agar (1,5%) y se suplementó con leche descremada a una proporción de 1:2 (1 de leche y 2 de agua). Se pesó el medio según las instrucciones del fabricante, se disolvió con agua destilada y se autoclavó a  $121^{\circ}\text{C}$  x 15 min. A continuación, se agregó la leche descremada cuando el medio se encontraba a una temperatura aproximada de  $80^{\circ}\text{C}$ , evitando una agitación vigorosa para no generar espuma. Se depositó el medio en cajas Petri en condiciones de esterilidad y se dejó reposar por 20 min para su solidificación. Para la siembra se colocó 60  $\mu\text{l}$  de caldo con bacterias en las placas Petri, mientras que las levaduras se sembraron mediante la técnica de estriado. La incubación de los microorganismos se realizó a  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , en condiciones anaeróbicas para las bacterias y aeróbicas para las levaduras. El proceso de incubación se



extendió hasta la aparición de halos alrededor de las colonias. Este ensayo se realizó por triplicado.

### **1.3. Selección de los microorganismos con actividad lipolítica.**

Se empleó agar de tributirina (Sigma-Aldrich), suplementado con 2% de Tween 80 como sustrato (Arreguín & Morales, 2015) y 0,01% de rojo fenol como indicador de pH. El medio de cultivo se emulsificó con 0,1% Triton X-100 (Lizano, 2012). Se pesó el agar tributirina, rojo fenol y se añadió el Triton X-100 en condiciones asépticas y se reguló el pH entre 7.3 a 7.5, luego de lo cual se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Cuando el medio se encontraba a una temperatura aproximada de 80°C se añadió el Tween 80. Se depositó el medio en cajas Petri en condiciones de esterilidad y se dejó reposar por 20 min para su solidificación. La siembra y la incubación fue como se describe en la Sección 1.2. La actividad lipasa se identificó por un viraje de color. Este ensayo se realizó por triplicado y además se usaron dos sustratos adicionales que fueron aceite de oliva y girasol al 1%.

## **2. Identificación la especie de los microorganismos empleando herramientas de biología molecular.**

### **2.1. Reacción de PCR**

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó la región 16S de bacterias usando los Primers 7F (AGAGTTTGATYMTGGCTCA) y 1510R (ACGGYTACCTTGTACGACTT), mientras que para levaduras se emplearon los Primers ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) / ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) y NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)/NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) que se encargan de amplificar la región 5,8S rRNA.

Como molde de ADN se siguió el protocolo usado por Guerrero (2018) con algunas modificaciones. Se tomó colonias con una punta estéril y se resuspendieron en 50 µl de agua estéril y se homogenizó. El volumen final de la reacción de PCR para bacterias fue de 50 µl en la cual se usó la enzima DreamTaq 2X (Invitrogen), los Primers 7F/1510R con una concentración 0,5 µM, 5 µl de muestra y agua ultrapura. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems).

En el caso de las levaduras el volumen final fue de 50 µl en la cual se usó la enzima DreamTaq 2X, los Primers ITS1/ITS4 ó NL1/NL4 con una concentración 0,5 µM, 5 µl de muestra y agua ultrapura. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Para bacterias el programa en el termociclador consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización cíclica a 95°C por 30 segundos, 30 segundos de anillamiento a 52°C, 2 minutos de elongación a 72°C y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para las levaduras se llevó a cabo una desnaturalización a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturalización cíclica a 94°C por 30 segundos, 45 segundos de anillamiento a 57,4°C, 45 segundos de elongación a 72°C y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

## **2.2. Electroforesis**

Los resultados de PCR se observaron mediante geles de electroforesis, los cuales permitieron ver el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos.

Se preparó geles al 1,2% de agarosa (Invitrogen), adicionando SYBR SAFE (Invitrogen) para permitir la visualización del ADN. El buffer de corrida correspondió a TAE 1X y para estimar el tamaño de las muestras se empleó el Ladder 1Kb plus (Invitrogen). La electroforesis se corrió a 120V por 40 min. Finalmente, se reveló el gel utilizando el equipo ENDURO™ GDS TOUCH (Labnet).

## **2.3. Purificación de ADN y secuenciación**

Para purificar los productos de PCR se empleó el kit de purificación de ADN de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Para identificar el tipo de especie de microorganismo se envió a secuenciar el ADN purificado, lo cual fue realizado por la empresa Macrogen (Corea del Sur). Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se utilizaron los siguientes programas: Snapgene (para eliminar el ruido de la secuenciación y obtener el código genético), Cap3 assembly (para ensamblar las cadenas de ADN) y NCBI BLAST para comparar las secuencias contra bases de datos de Nucleótidos existentes en el GenBank. 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.

## **3. Producción de las enzimas y análisis de actividad intracelular o extracelular.**

### **3.1. Selección de microorganismos con mejor actividad proteolítica.**

Se utilizó Nutrient Broth (Condalab) para bacterias y caldo PD en el caso de levaduras, cada uno se suplementó con leche descremada a una proporción de 1:2 (1 de leche y 2 de agua). Se colocó 30 ml del caldo correspondiente en un matraz de 50 ml previamente esterilizado y se inoculó el microorganismo de las placas obtenidas en la Sección 1.2. con ayuda de un asa. Las bacterias se incubaron en anaerobiosis y las levaduras en condiciones aeróbicas, ambas a  $30 \pm 1$  °C y 120 rpm en una incubadora con agitación (Compact Shaking Incubator, JSR). El proceso se extendió hasta que se observó la clarificación en el medio y se seleccionaron aquellos microorganismos que produzcan este cambio en un menor tiempo. Este ensayo se realizó por triplicado.

### **3.2. Identificación de microorganismos con mejor actividad lipolítica.**

Los microorganismos se cultivaron en un matraz de 50 ml con un volumen de medio basal (Peptona, extracto de levadura, rojo fenol, Triton x100 y Tween 80) de 30 ml, se realizó la siembra con un asa de los microorganismos obtenidos en la Sección 1.3. y se incubaron a  $30 \pm 1$  °C con agitación de 120 rpm en una incubadora con agitación (Compact Shaking Incubator, JSR) hasta que se observó un cambio en el color. Este ensayo se realizó por triplicado usando únicamente el Tween 80 como sustrato.

### **3.3. Identificación de actividad intra y extracelular.**

#### **3.3.1. Lisis celular mediante Sonicación**

Se tomaron los sobrenadantes de los matraces descritos en la Sección 3.1. y 3.2. y se colocaron en tubos Falcon estériles de 50 ml. Alícuotas de 1,5 ml fueron obtenidas y almacenadas en tubos Eppendorf estériles como control de extracto crudo (EC). Posteriormente, se centrifugaron los tubos Falcon de 50 ml a 4400 rpm por 10 minutos a  $4 \pm 1$  °C. Los sobrenadantes extracelulares (SE) generados se colocaron en tubos Falcon de 50 ml estériles y se filtraron alícuotas de 1,5 ml en tubos Eppendorf usando filtros estériles de 0,2  $\mu$ m. Estas alícuotas de los sobrenadantes extracelulares centrifugados y filtrados (SEF) se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso. Por otro lado, los pellets obtenidos se resuspendieron en 5 ml de Buffer PBS pH 7 con una concentración de 0,05 M.

Los pellets resuspendidos de los microorganismos obtenidos se sonicaron con el equipo SONIC RUPTOR 400 (OMNI) con una amplitud de 20% y 50 pulsos por 3 min para bacterias y 4 min para levaduras. Luego de la sonicación se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf de los pellets sonicados (PS) y se almacenaron en refrigeración. A continuación, los tubos Falcon con las muestras sonicadas (PS) se centrifugaron a 4400 rpm por 10 minutos a  $4 \pm 1$  °C, y los sobrenadantes intracelulares centrifugados (PSC) se traspasaron a tubos Falcon de 15 ml desechando así los residuos celulares. Seguido a esto, de los sobrenadantes (PSC) de los tubos Falcon de 15 ml se filtraron alícuotas de 1,5 ml con ayuda de filtros estériles de 0,2  $\mu$ m en tubos Eppendorf estériles y se guardaron en refrigeración que serán denotados como sobrenadantes intracelulares centrifugados y filtrados (PSCF).

### **4. Caracterización de la actividad enzimática de las enzimas obtenidas.**

#### **4.1. Determinación cualitativa de la actividad enzimática**

Se prepararon placas Petri como se describió en las Secciones 1.2. y 1.3. y se realizó pocillos en el agar, en donde en un pocillo se depositó 200  $\mu$ l de sobrenadante PS, en otro pocillo el sobrenadante PSC y en otro pocillo el sobrenadante PSCF. En otras placas Petri se realizaron pocillos los cuales se depositaron 200  $\mu$ l del SEF de cada muestra a evaluar. Las placas se incubaron a  $30 \pm 1$  °C hasta observar la aparición de halos alrededor de los pocillos en el caso de las proteasas y para las lipasas se evidenció con el viraje en el color de igual manera alrededor del pocillo. Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.2. Evaluación de la actividad proteasa mediante ensayos de digestión de caseína**

El ensayo de digestión de caseína se basó en el protocolo descrito por Zhao, Ken, Yacine, & Don (2018) con algunas modificaciones. Se preparó caseinato sódico disolviendo caseína en tampón fosfato sódico (100 mM; pH 6,5) usando agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente para obtener una concentración de 5 mg/mL. Se agregó 400  $\mu$ l de los extractos enzimáticos obtenidos de los microorganismos a 2 ml de solución de caseinato de sodio. Como control positivo se usó cuajo (Holandés Cheese Mix), el cual fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el ensayo enzimático este cuajo se diluyó 10 veces, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de cuajo diluido y se colocó a 2 ml de solución de

caseinato de sodio. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C, 35°C, 40°C, y se retiraron alícuotas individuales de hidrolizados del baño maría a los 30 min, 1 h, 4 h y 24 h. La hidrólisis se detuvo calentando las alícuotas de hidrolizado a 100°C durante 5 minutos en un Termociclador (MiniAmp Plus Thermal Cycler, Applied Biosystems).

Se analizó si la caseína se degradó por acción de las enzimas agregadas mediante un gel SDS-PAGE usando las alícuotas a diferentes tiempos y temperaturas. Para este ensayo se usó como control la caseína a tiempo 0 min, a 24 h y caseína con cuajo a 24h. Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.3. Gel de proteínas SDS-PAGE**

Se preparó el gel empleando el kit FastCast™ acrylamide (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras obtenidas en la sección 4.2. se mezclaron con Buffer de carga (compuesto por glicerol, azul de bromafenol, SDS y β-mercaptoetanol) en tubos PCR y se realizó una desnaturalización de las muestras en el MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) a 95°C por 3 min y se cargó 20 µl en el gel. Se usó un marcador de proteína el PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) para estimar el tamaño de las proteínas.

Mediante SDS-PAGE se analizó también el contenido de proteínas de las muestras (sección 3.3.1.), es decir, sobrenadante extracelular centrifugado (SE), sobrenadante centrifugado y filtrado (SEF), pellet sonicado (PS), pellet sonicado centrifugado (PSC) y pellet sonicado centrifugado y filtrado (PSCF). Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.4. Revelado de gel**

El gel se tiñó con azul de Coomassie G-250, preparado con 225 ml de metanol, 46 ml de ácido acético glacial, 230 ml de agua destilada y 0,125 g Coomassie Blue G-250. El desteñido se la realizó con 500 ml de decolorante el cual fue preparado con 100 ml de metanol, 50 ml de etanol, 25 ml de ácido acético glacial y 325 ml de agua destilada.

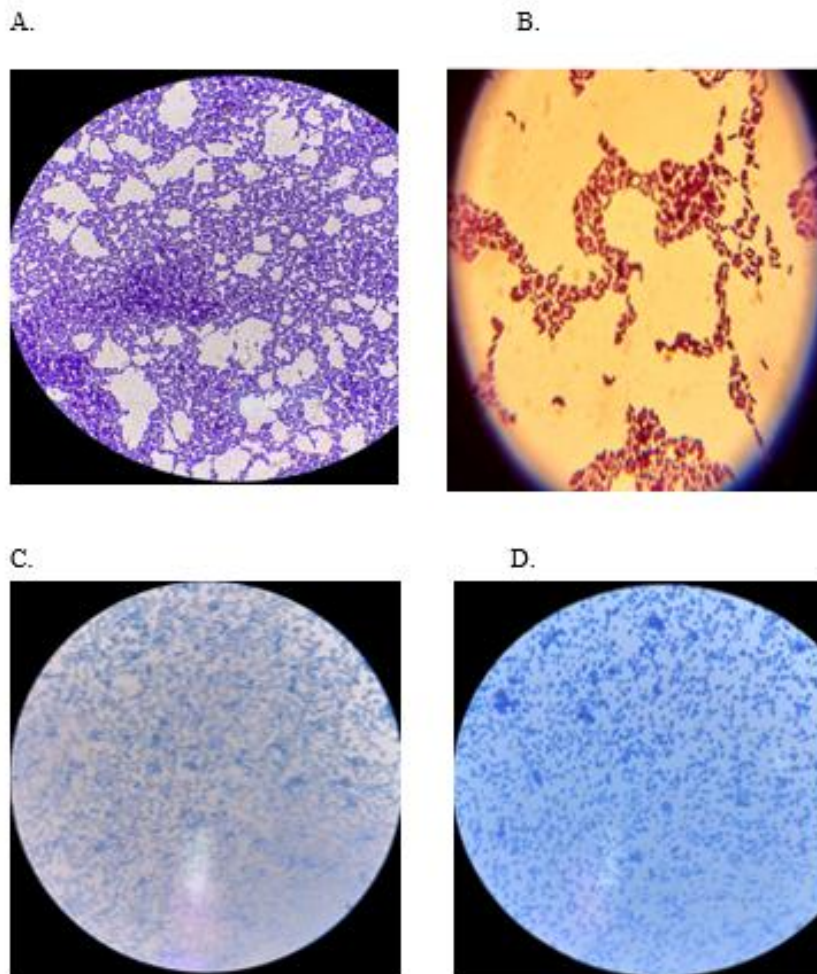
El gel fue cubierto con la solución de tinción, se calentó en el microondas durante 1 minuto y se coloreó por 30 minutos en una incubadora (Orbital Shaker-Incubator ES-20) a 37°C a 120 rpm. Posteriormente, se desechó el colorante y se agregó el decolorante hasta cubrir el gel por 8 -10 horas a 25°C a 120 rpm y se colocaron toallas absorbentes junto al gel con el objetivo de una decoloración más eficiente.

## CAPITULO III

### RESULTADOS

Para la determinación de la actividad proteolítica y lipolítica se inició con la reactivación de 23 muestras de bacterias y 16 muestras de levaduras obtenidas de la fermentación de cacao que se encontraban en un stock de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se logró reactivar todas las muestras de levaduras y 18 de las muestras de bacterias (las cinco muestras restantes de bacterias habían perdido su viabilidad).

En la **Figura 1**, se observa las tinciones realizadas de algunos de los microorganismos que se reactivaron para la realización de esta investigación, con lo que se pudo identificar en el caso de las bacterias si eran Gram negativas o Gram positivas, además de la morfología de todos los microorganismos.

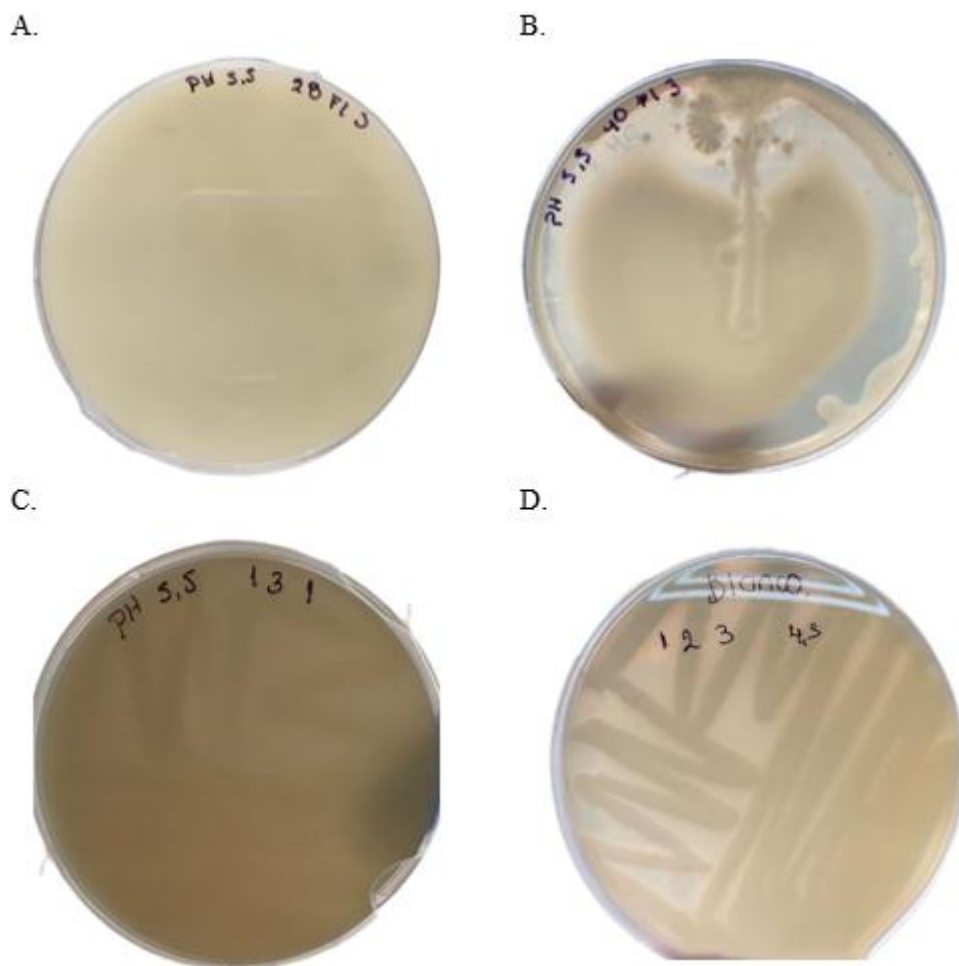


**Figura 1.** Tinción de Gram: A) Bacteria Gram positiva, B) Bacteria Gram negativa. C) y D) Tinción de levaduras con azul de metileno. Observadas al microscopio óptico a 100X (bacterias) y 40X (levaduras).

Una vez reactivados los microorganismos y habiendo observado su morfología por medio de las tinciones correspondientes, se procedió a determinar cuál de ellos tenía actividad proteolítica y/o lipolítica.

### 1. Determinación de la actividad enzimática

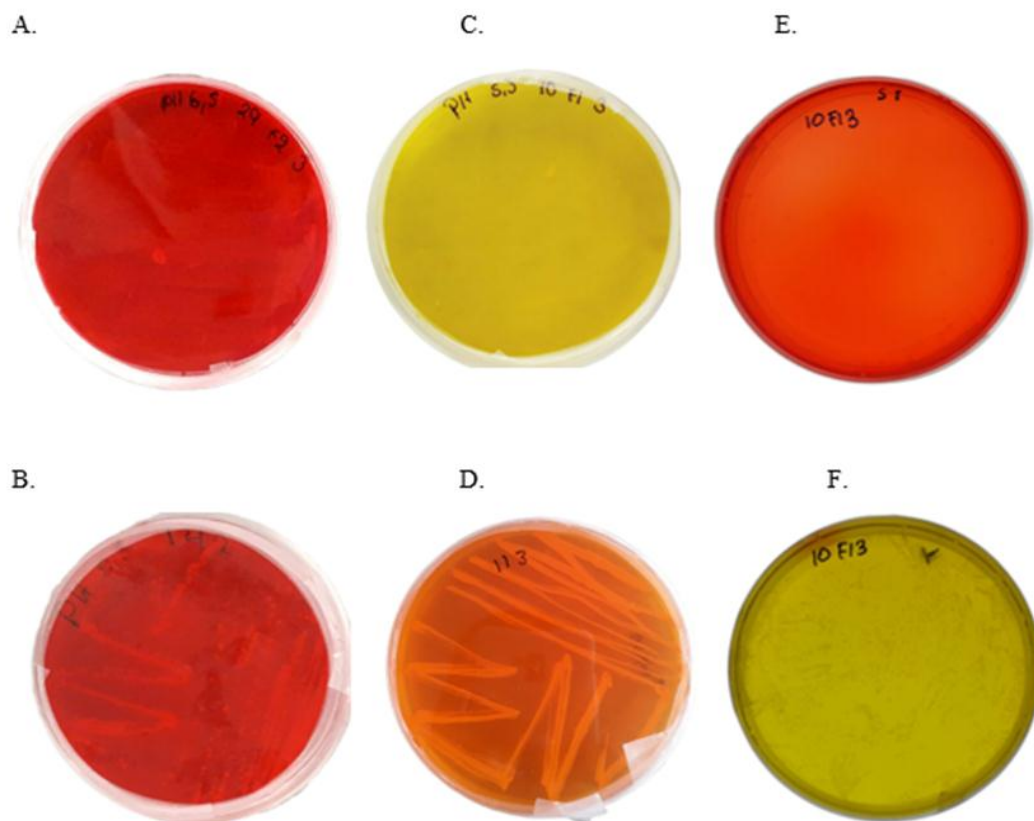
En la **Figura 2** se observan bacterias y levaduras cultivadas en agar nutritivo suplementado con leche descremada, en donde se identificaron aquellos microorganismos que poseían actividad proteolítica por la degradación del sustrato. En 2A y 2C se observan microorganismos que no tienen actividad proteolítica. Por el contrario, 2B y 2D representan microorganismos con actividad proteolítica, lo que se evidenció por la aparición de halos en el medio en un tiempo aproximado de 72h.



**Figura 2.** A) Bacteria sin actividad proteolítica; B) Bacteria con actividad proteolítica; C) Levadura sin actividad proteolítica y D) levadura con actividad proteolítica.

Adicionalmente, se evaluó si las bacterias y levaduras bajo estudio presentaban actividad lipolítica. Para esto se realizó un análisis preliminar con un número limitado de muestras donde se evaluó tres tipos de sustratos: aceite de girasol, aceite de oliva y Tween 80. Esto con el objetivo de determinar en cuál de ellos el microorganismo inoculado evidenciaba mayor actividad lipolítica (**Anexo 1**). De acuerdo con lo observado, el Tween 80 fue el mejor sustrato para los microorganismos.

Con base en lo anterior, todas las muestras de bacterias y levaduras fueron cultivadas en agar tributirina usando como sustrato Tween 80. En la **Figura 3C** y **3D** están representados los microorganismos que poseen actividad lipolítica, lo cual se evidenció por el viraje de color en un tiempo aproximado de 48h. En contraste en **3A** y **3B** se observa una bacteria y una levadura sin actividad. Para evaluar si efectivamente el microorganismo degradaba el sustrato y que esto produce el viraje en el color, se realizó el crecimiento de los microorganismos en ausencia de Tween 80. Como se aprecia en la figura **3E**, no hay viraje de color en el medio de cultivo sin Tween 80, pero evidentemente si hay el cambio cuando la misma bacteria es crecida con el sustrato (**Figura 3F**).



**Figura 3.** A) Bacteria sin actividad lipolítica; B) Levadura sin actividad lipolítica; C) Bacteria con actividad lipolítica, D) Levadura con actividad lipolítica, E) Bacteria crecida sin Tween 80 y F) Bacteria crecida con Tween 80.

Al extender estos análisis a todos los microorganismos, se encontró que existieron tres bacterias con actividad proteolítica, tres bacterias con actividad lipolítica y dos bacterias que presentaban ambas actividades enzimáticas (**Tabla 1**).

*Tabla 1. Bacterias con actividad enzimática proteolítica y/o lipolítica.*

<b>Código para bacterias</b>	<b>pH de crecimiento</b>	<b>Actividad</b>
9F13	5,5	Proteolítica Lipolítica
10F13	5,5	Lipolítica
28F13	5,5	Lipolítica
56F23	6,5	Proteolítica Lipolítica
40F13	5,5	Proteolítica
34F13	5,5	Proteolítica
39F13	6,5	Lipolítica
34F23	5,5	Proteolítica

Por otra parte, se encontraron dos levaduras con actividad lipolítica y una levadura con actividad tanto lipolítica como proteolítica (**Tabla 2**).

*Tabla 2. Levaduras con actividad enzimática proteolítica y/o lipolítica.*

<b>Código para levaduras</b>	<b>pH de crecimiento</b>	<b>Actividad</b>
123	4,5	Proteolítica Lipolítica
113	5,5	Lipolítica
231	5,5	Lipolítica

Luego de determinar qué microorganismos poseían las actividades enzimáticas de interés, se procedió a su identificación taxonómica como se describe a continuación.



## 2. Identificación taxonómica de microorganismos con actividad proteolítica y lipolítica.

De las bacterias que presentaron actividad lipolítica y/o proteolítica expuestas en la **Tabla 1** y con ayuda de herramientas de biología molecular, se logró identificarlas dentro de las especies de *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Gluconobacter sp. strain* como se observa en la **Tabla 3**. Las levaduras fueron identificadas como *Wickerhamiella pararugosa*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia kudriavzevii* (**Tabla 4**).

En las **Tablas 3 y 4** se especifica a qué especie corresponde cada microorganismo, su porcentaje de identidad (ID) y su porcentaje de la ausencia de una o más bases en una de las hebras del ADN dúplex (GAP).

**Tabla 3.** Identificación taxonómica de bacterias mediante secuenciación de la región 16S.

Código para bacterias	Anotación	%ID	GAP
9 F1 3	<i>Gluconobacter sp. strain PFY-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	100% (1341/1341)	0% (0/1341)
10 F1 3	<i>Gluconobacter sp. strain PFY-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	100% (1346/1346)	0% (0/1346)
28 F1 3	<i>Gluconobacter sp. strain PFY-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	99% (1346/1348)	0% (2/1348)
34 F1 3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides strain 4344 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	99% (1408/1412)	0% (1/1412)
34 F2 3	<i>Gluconobacter sp. strain PFY-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	99% (1346/1347)	0% (1/1347)
39 F1 3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides strain 4344 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	99% (1418/1420)	0% (1/1420)
40 F1 3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides strain 4311 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	100% (1404/1404)	0% (0/1404)
56 F2 3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides strain 4344 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	100% (1415/1415)	0% (0/1415)

**Tabla 4.** Identificación taxonómica de levaduras mediante secuenciación de la región ribosomal utilizando los Primers ITS 1-ITS4 Y NLI-NLA.

Código para levaduras	Primer	Anotación	%ID	GAP
-----------------------	--------	-----------	-----	-----

113	NL	<i>Wickerhamiella pararugosa strain CBS 1948</i>	100% (563/563)	0% (0/563)
	ITS	<i>Wickerhamiella pararugosa isolate 119</i>	96% (458/479)	1% (8/479)
123	NL	<i>Wickerhamomyces anomalus strain VIT-ASN01</i>	99% (601/603)	0% (0/603)
	ITS	<i>Wickerhamomyces anomalus strain KY1</i>	95% (773/810)	2% (18/810)
231	NL	<i>Pichia kudriavzevii strain CBS 5147</i>	100% (583/583)	0% (0/583)
	ITS	<i>Pichia kudriavzevii isolate 31</i>	92% (319/347)	0% (0/347)

Una vez determinadas las especies a las que corresponde cada microorganismo que presentaron las actividades proteolíticas y lipolíticas, se procedió a seleccionar al microorganismo que tenga la capacidad de producir la enzima de interés en el menor tiempo posible y mejor actividad.

### 3. Producción de enzimas

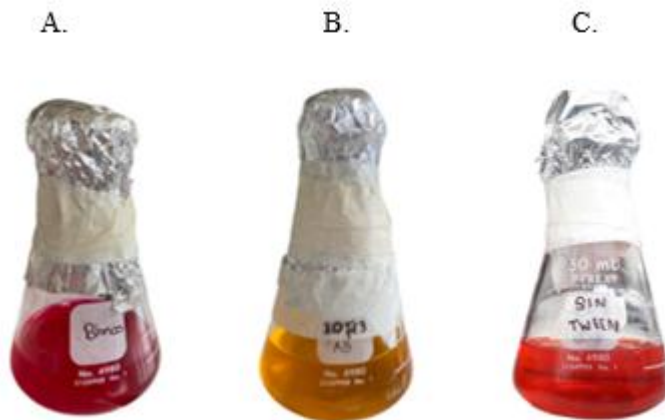
Se seleccionó los microorganismos con mayor eficacia en la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas, teniendo en cuenta el tiempo de producción. Bajo este criterio, *Leuconostoc pseudomesenteroides* (40F13) resultó ser la mejor productora de una enzima proteolítica produciéndola en un tiempo de 96 h aproximadamente. Por otra parte, la bacteria *Gluconobacter* sp. strain (10F13) fue capaz de producir una enzima lipolítica en 24 h.

En la **Figura 4B** se puede observar la producción de enzima proteolítica por *Leuconostoc pseudomesenteroides* comparada con un control (**4A**) usando medio nutritivo más leche descremada como sustrato. Se midió el pH una vez clarificado el medio, obteniendo un pH final entre 6,5 y 7 aproximadamente. Esto indica que la caseína de la leche está precipitando por acción de la enzima del microorganismo, mas no por una disminución de pH en el medio, ya que está tiende a precipitar alrededor de un pH de 4,6.



**Figura 4.** A) Matraz control suplementado con leche descremada sin ningún microorganismo; B) Matraz con leche descremada y *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

La **Figura 5B** muestra la producción de enzima lipolítica de *Gluconobacter sp. strain* comparada con un control (**5A**) usando caldo más Tween 80 como sustrato. Se observa claramente el viraje de color en el matraz que contenía el microorganismo. En 5C se observa el matraz inoculado con el mismo microorganismo sin Tween 80. Se puede apreciar que la presencia de sustrato es necesaria para que ocurra el viraje de color.

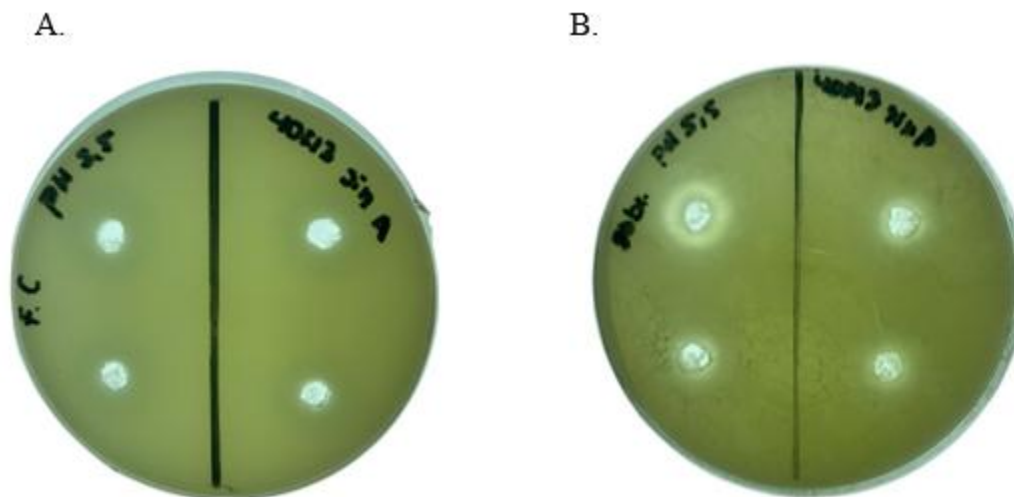


**Figura 5.** A) Matraz control con Tween 80 no inoculado; B) Matraz con Tween 80 y *Gluconobacter sp. strain* y; C) Matraz sin Tween 80 y *Gluconobacter sp. strain*.

Confirmada la producción de las enzimas proteolíticas y lipolíticas, se realizaron ensayos para evaluar si estas proteínas catalíticas son extra o intracelulares, evaluando el medio de cultivo y las células bacterianas sonicadas, respectivamente.

#### 4. Determinación del carácter extracelular e intracelular de las enzimas de interés

La **Figura 6** muestra los resultados obtenidos al evaluar el filtrado extracelular e intracelular (células sonicadas) en cajas Petri. Se aprecia que al evaluar las células sonicadas y filtradas aparecen halos alrededor de los pocillos, indicando que la enzima es intracelular (**Figura 6B**). Por el contrario, la ausencia de halos alrededor de los pocillos usando el sobrenadante extracelular indica que en esta fracción no existe este tipo de actividad en cantidades detectables (**Figura 6A**).

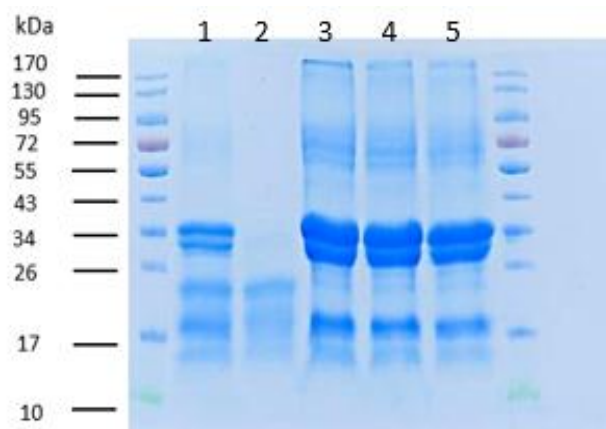


**Figura 6.** A) Sobrenadante extracelular de *Leuconostoc pseudomesenteroides*; B) Fracción intracelular filtrada de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Se analizó el sobrenadante extracelular y la fracción intracelular filtrada empleando geles de SDS -PAGE con el fin de observar las proteínas que estos contenían.

#### 5. Geles SDS-PAGE

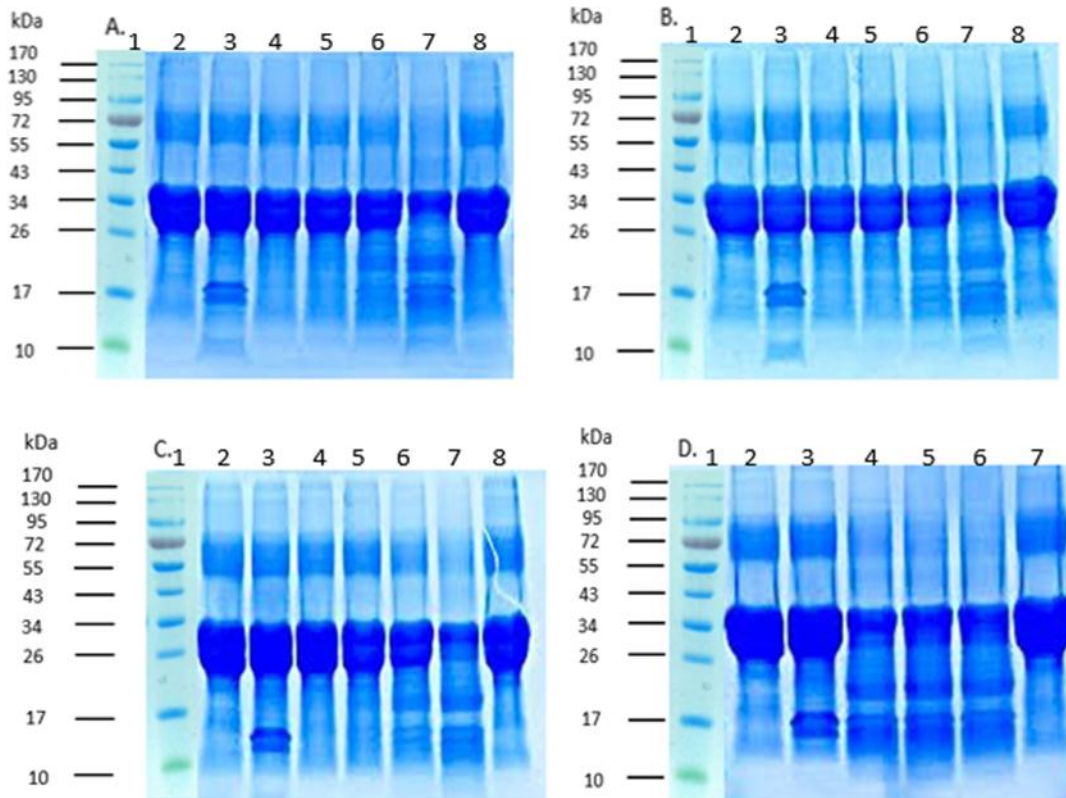
Las proteínas presentes en el sobrenadante extracelular y sobrenadante sonificado que se obtuvo en la producción de enzimas se evaluaron mediante un SDS-PAGE (**Figura 7**). En el sobrenadante extracelular (carril 1) se observan proteínas de aproximadamente 34 kDa, 25 kDa y otra de 18 kDa que, al ser comparadas con el sobrenadante extracelular filtrado (carril 2), la que es más notoria es la proteína de 25 kDa. Por otra parte, en el pellet sonificado (carril 3), pellet sonificado centrifugado (carril 4) y el pellet sonificado centrifugado y filtrado (carril 5) se observa que las proteínas de 34 kDa y 18 kDa se hicieron más prominentes después de pasar por un proceso de centrifugación y sonicación.



**Figura 7.** SDS-PAGE de proteínas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Marcador de peso molecular, Sobrenadante extracelular (1), Sobrenadante extracelular filtrado (2), Pellet sonificado (3), Pellet sonificado centrifugado (4), Pellet sonificado centrifugado filtrado (5), Marcador de peso molecular.

No fue posible caracterizar el tamaño de la enzima lipolítica de *Gluconobacter*, ya que no se observaron bandas en el SDS-PAGE (**Anexo 2**). Se procedió a concentrar dichas proteínas saturando la solución a 80% con sulfato de amonio, sin embargo, únicamente se evidenció una separación de dos fases (**Anexo 3**) lo que obstaculizó la recuperación de las enzimas.

Habiendo determinado donde se localiza la enzima de la bacteria *Leuconostoc pseudomesenteroides*, se procedió a realizar una digestión de caseína a diferentes tiempos y temperaturas con la finalidad de observar a que temperatura actúa más eficientemente dicha enzima sobre el sustrato. En la **Figura 8**, se observan geles SDS-PAGE cargados con las muestras obtenidas a partir de la digestión de caseína mencionada anteriormente. En el carril 6 se puede apreciar que la hidrólisis de caseína por parte de la enzima de *L. pseudomesenteroides* comienza a las 4h tanto a 30, 35 y 40°C (**Figura 8A**, **B** y **C**, respectivamente) y al cabo de 24 h (carril 7) se observa una hidrólisis más completa de la caseína.



**Figura 8.** SDS-PAGE del ensayo cualitativo de hidrólisis de caseinato sódico de bovino (5mg/ml) con la proteasa de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. En todos los geles: Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Caseína pura a tiempo cero; Carril 3. caseína con cuajo a 4 h. En A (30°C), B (35°C) y C (40°C) los carriles 4, 5, 6 y 7 corresponde a la hidrólisis de caseína a 30', 1h, 4h y 24 h. El carril 8 es caseína pura luego de 24h de incubación. En D. Carril 4,5 y 6 corresponden a la hidrólisis de la caseína a las 24 h de los tratamientos a 30, 35 y 40°C. respectivamente. El carril 7 corresponde a caseína pura 24 h.

Al analizar la actividad de la proteasa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* a 30, 35 y 40°C por 24, se puede observar que en los tres casos la enzima empleada hidrolizó la caseína de manera similar indicando que la temperatura no influye de manera considerable (**Figura 8D**).

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

En esta investigación se logró identificar taxonómicamente ocho bacterias y tres levaduras que poseen actividad proteolítica y/o lipolítica. Según los resultados, la mayoría de bacterias presentaron solo una de las dos actividades evaluadas. Sin embargo, existió una bacteria del género *Gluconobacter* y una bacteria del género *Leuconostoc* que presentaron ambas actividades. En base a esto, es importante mencionar que, a pesar de que presentaron las dos actividades una era más predominante que la otra. Esto se podría deber a que los medios en los que fueron cultivados variaban en su composición y su pH. Particularmente, la bacteria del género *Gluconobacter* presentó mayor actividad lipolítica y baja proteolítica, al contrario de *Leuconostoc* cuya actividad más evidente fue la proteolítica. A pesar de que no existen estudios acerca de las enzimas proteolíticas producidas por *Leuconostoc pseudomesenteroides*, una investigación realizada por Linares (2021) donde aisló BALs de fuentes no proteicas, indica que la especie *Leuconostoc mesenteroides* presentó actividad proteasa y lipasa y que estas variaban de alto a bajo dependiendo de su fuente de aislamiento. Cabe mencionar, que la relación que existe entre *L. mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides* es que ambas se pueden aislar de vegetales y leche (García, 2007) y además son ampliamente estudiadas por desarrollar textura y sabor característico en productos fermentados (Chuat & Dalmasso, 2015).

En este estudio, la bacteria ácido láctica *L. pseudomesenteroides* resultó ser la mejor productora de la enzima proteolítica. Las proteínas obtenidas de esta bacteria fueron analizadas mediante un gel de electroforesis (SDS-PAGE), donde se pudo visualizar una banda de 18 kDa (**Figura 7**). Un estudio realizado por Rao, Tanksale, Ghatge, & Deshpande (1998) muestra que las proteínas con un peso molecular que oscilan entre 18 y 35 kDa se encuentran dentro del grupo de las serinas proteasas. Sin embargo, existen excepciones como la serina proteasa de *Blakeslea trispora* con un peso molecular de 126 kDa como se cita en Govind, Mehta, Sharma, & Modi (1981). En vista de que en este trabajo no se realizó una purificación completa de la proteasa de *L. pseudomesenteroides*, serían necesarios más análisis para determinar más precisamente su peso molecular y también el grupo de proteasas al cual pertenece. También, cabe mencionar que las bandas de aproximadamente 34 kDa que se observan en la **Figura 7**, podrían corresponder a la caseína del medio en el que fue producida la enzima, ya que un estudio realizado por Zhao, Ken, Yacine, & Don (2018) ubican a las bandas de caseína entre 25 y 37 kDa, en donde al igual que nuestro estudio realizaron una hidrólisis del caseinato de sodio, sin embargo, sería necesario un análisis más detallado para corroborar esto.

En relación a las temperaturas a las que fue sometida la enzima de *L. pseudomesenteroides*, no se observó un cambio significativo de la actividad enzimática, por lo que se puede decir que la enzima en cuestión podría funcionar muy bien si es sometida a un rango más amplio de temperatura, lo que resultaría favorable para algunos tratamientos que se emplean en la industria de alimentos. Por esta razón, se sugiere que se evalúe dicha enzima a un rango más

amplio de temperatura para observar su comportamiento a temperaturas altas y bajas y determinar cual es la óptima para su funcionamiento. Según Jofré (2012), al aumentar la temperatura del sistema por sobre la temperatura óptima se dan cambios conformacionales los cuales pueden afectar la actividad de una enzima. Un estudio realizado con una proteasa de *Bacillus licheniformis* LB04, donde se utilizó un rango de temperatura de 20 a 90°C, mostró una máxima actividad de la enzima a 40°C, además la actividad enzimática se vio poco afectada conforme aumenta la temperatura de los 40 a 90°C (Montes, 2020).

Cabe mencionar que la producción de enzimas por parte de las cepas evaluadas no fue alta, por lo que sería interesante realizar otros procesos adicionales como se cita en González, y otros (1993), una alternativa para la sobreproducción industrial es la manipulación genética utilizando técnicas de DNA recombinante, que consiste en la formación de una molécula de DNA artificial en donde se combina la información genética de un organismo, y se coloca en otro diferente (López, Moran, Placier, & López, 2017). Otro método puede ser el incremento de la actividad proteasa mediante estrés por sustrato como indica Sahagun, Villanueva, Lugo, & García (2021), quienes lograron incrementar la actividad proteasa de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* haciéndola crecer en un medio de cultivo donde el nutriente principal es la proteína. De no ser viable su uso como fuente de proteasas, *L. pseudomesenteroides* se podría usar como un cultivo iniciador, ya que este género ha sido utilizado en la elaboración de productos vegetales, lácteos fermentados, carnes fermentadas, etc. desempeñando un rol esencial en la formación de aroma y textura (Pujato, 2017).

Una investigación bibliográfica acerca de las aplicaciones de las enzimas microbianas en la industria alimentaria, revela que las proteasas microbianas son usadas ampliamente para la fabricación de quesos, debido a que inducen a la formación de la textura requerida y sabor durante el proceso de maduración. En cuanto a su uso en productos horneados, como pan y galletas, se ha descrito que las proteasas aseguran la uniformidad de la masa, mantienen la fuerza del gluten en el pan y reducen la consistencia de la masa (Ramesh, Harani, Chattopadhyay, & Kavitha, 2020). Moral, Ramírez, & García (2015) sugieren el uso de las proteasas en la industria cárnica ya que ayudan a reducir la dureza de la carne, debido a que hidrolizan el colágeno y elastina en el tejido conectivo de esta. Por otro lado, Drapala & Hernández (2018) indican el uso de proteasas microbianas en la industria cervecera, ya que descomponen las moléculas de proteína grandes en cadenas más pequeñas de aminoácidos, lo que promueve la retención de espuma y reduce la turbidez. En base a la amplia aplicación de las proteasas microbianas que se ha expuesto anteriormente, la proteasa obtenida de *L. pseudomesenteroides* se podría usar en al menos uno de los productos mencionados con la finalidad de observar su comportamiento en dicha matriz alimentaria.

Por otra parte, para la determinación de la actividad lipolítica se usaron tres sustratos que fueron aceite de girasol, aceite de oliva y Tween 80. Sobre este último es que se evidenció mayor actividad del microorganismo *Gluconobacter sp. strain*. Hernández (2016) evaluó la actividad lipolítica de tres microorganismos los cuales fueron *Terribacillus aidingensis*, *Serratia liquefaciens* y *Bacillus subtilis* donde reporta al Tween 80 como mejor inductor de actividad lipolítica en comparación con otros sustratos como el aceite de oliva, girasol y un aceite usado. Otro estudio realizado por Flores y col. (2010) corrobora que la mayoría de las



bacterias que aislaron degradaban más eficientemente el Tween 80 en comparación con el aceite de oliva. Además, mencionan que la capacidad de hidrólisis y la frecuencia de uso de un sustrato u otro dependen de la cepa y del lugar de procedencia. Salazar y col. (2020) han descrito que las enzimas lipolíticas bacterianas son activas en un amplio rango de sustratos, además, tienen un centro activo que permanece protegido por una cubierta que impide la entrada del sustrato (González, Moreno, & del Monte, 2010). En base a esto Hernández (2016) menciona que el Tween 80 estimula la biosíntesis y la secreción de lipasas, aumentando la permeabilidad celular gracias a que tiene en su estructura un enlace éster que funciona como inductor natural para dicha enzima. Es así que al usar este compuesto como sustrato el microorganismo pudo evidenciar mejor su actividad lipolítica.

Aunque *Gluconobacter sp. strain* fue la bacteria que mayor actividad lipolítica presentó con relación al tiempo, su baja producción de enzima resultó ser una limitante para su caracterización. No obstante, una manera de aprovechar a *Gluconobacter sp. strain* sería mediante su uso como un cultivo iniciador, como, por ejemplo, para la biooxidación de mostos alcohólicos obtenidos a partir de frutos, con la finalidad de obtener vinagres (Gerard, 2015). También se podría incrementar la producción de dicha enzima por medio de expresión heteróloga. Un estudio realizado por Castilla (2022) muestra que en algunos casos se encuentran enzimas que, si bien tienen características deseables para ser aplicadas en cierto proceso, su producción homóloga es una limitante para su aplicación, debido a que la tasa de producción de la proteína es muy baja o el cultivo del microorganismo es costoso o dificultoso. A pesar de que no existen estudios previos de la expresión heteróloga de lipasas de *Gluconobacter*, se ha reportado que es posible obtener una lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* usando la levadura *Pichia pastoris* (Loango, 2015). En este estudio utilizaron glicerol como fuente de carbono para la producción de lipasas recombinantes a partir de la levadura mencionada anteriormente.

En los ensayos que se realizaron con y sin Tween 80 (**Figura 5**), se pudo observar que es posible inducir la expresión de lipasas desde *Gluconobacter* mediante un estrés por presencia/ausencia de sustrato. En el medio suplementado con Tween 80 se evidenció una mayor cantidad de biomasa y actividad enzimática, en contraste a lo observado en ausencia de Tween 80. En una investigación donde se variaron las concentraciones de Tween 80, obtuvieron como resultado un aumento de la producción de lipasa y masa celular (De Long, He Xu, & Pan, 2007), lo que corroborara los resultados obtenidos en este trabajo, además se sugiere que el microorganismo en cuestión sea evaluado a diferentes concentraciones de Tween 80 con la finalidad de observar cual es su comportamiento en la producción de la enzima.

En cuanto, a las aplicaciones de las lipasas microbianas en la industria alimentaria, Ramakrishnan, Narayan, & Halami (2019) señalan que estas enzimas son usadas en la elaboración de productos lácteos ayudando en la hidrólisis de la grasa de la leche, en especial para el desarrollo del sabor y aroma en los quesos. También se usan en la industria panadera, debido a su capacidad para liberar ácidos grasos de cadena corta por esterificación. De esta manera, ayudan a prolongar la vida útil, mejorar la textura y la suavidad de los productos. Adicionalmente, ayudan con la eliminación de grasas durante el procesamiento de carne y

pescado dando como resultado productos más magros y sin grasa (Ramesh, Harani, Chattopadhyay, & Kavitha, 2020).

Considerando las metodologías implementadas y los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación, este estudio puede servir como base para futuras investigaciones relacionadas con la obtención de enzimas a partir de microorganismos aislados de productos fermentados. En el país existe una carencia de información sobre el aislamiento y la producción de enzimas microbianas, y este trabajo es un punto de partida para futuras investigaciones sobre este tema. Si bien las cepas que se analizaron no produjeron las enzimas de interés en altas cantidades, se podría optar por usar otras alternativas para mejorar la producción, como se mencionó anteriormente, el estrés por sustrato sería una buena opción, también se podría usar la tecnología del DNA recombinante en el caso de ser posible. Si aun así no se lograra el aumento de la producción de las enzimas, estas bacterias aisladas podrían ser aprovechadas como cultivos iniciadores para la producción y mejoramiento de productos en la industria de alimentos.

## CONCLUSIONES

Mediante este estudio se determinó que es posible obtener enzimas tanto proteolíticas como lipolíticas a partir de microorganismos aislados de la fermentación de cacao, por lo que este trabajo podría servir como base para buscar más actividades enzimáticas de dichos microorganismos o de otros microorganismos provenientes de productos fermentados.

En esta investigación las bacterias que presentaron actividad proteolítica fueron de las especies *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Gluconobacter sp. strain* y la levadura *Wickerhamomyces anomalus*. Por otra parte, las bacterias que presentaron actividad lipolítica fueron *L. pseudomesenteroides* y *Gluconobacter sp. strain* y las levaduras *Wickerhamiella pararugosa*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia kudriavzevii*.

Se determinó que las enzimas producidas por las bacterias estudiadas son intracelulares, por lo que es necesario que sean sometidas a un correcto proceso de lisis celular para asegurar una buena extracción y que posteriormente puedan ser caracterizadas. Además, con el avance de la tecnología es posible que se pueda mejorar la producción de enzimas mediante la aplicación de otra metodología o mediante expresión heteróloga.

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 desde microorganismos del cacao. Esto sin duda podría ser beneficioso para la industria local y el desarrollo de nuestro país.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGROBIZ, Insitu. (2020). *Implementación de un Sistema Participativo de Garantías (SPG) basado en la ISO 34101 de Cacao*. Obtenido de [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PA00XDCP.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00XDCP.pdf)
- Alejando, L., Flores, C., & Zavaleta, A. (2017). *Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por Pseudomonas sp. M211 en fermentación sumergida*. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2017000400010](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400010)
- Arpigny, J., & Jaeger, K. (1999). *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220539/pdf/10493927.pdf>
- Arreguín Magdaleno, S. A., & Morales Vargas, A. T. (2015). *Análisis de la actividad lipolítica y de esterasas, de una colección de cepas de Yarrowia lipolytica*. Jóvenes en la Ciencia, 1(3), 35-39. Obtenido de [https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/725/pdf\\_7](https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/725/pdf_7)
- Balcão, V., Paiva, A., & Malcata, X. (1996). *Bioreactors with immobilized lipases: State of the art*. Obtenido de <https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/6568/1/Bioreactors%20with%20immobilized....pdf>
- Castañeda, M. (2019). *Enzimas de interés biotecnológico*. Obtenido de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89649/Apunte\\_de\\_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89649/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Castilla, A. (2022). *Producción, caracterización bioquímica e inmovilización de lipasas microbianas y sus aplicaciones*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12008/31282>
- Chuat, V., & Dalmaso, M. (2015). *Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Leuconostoc mesenteroides and L. pseudomesenteroides*. Obtenido de [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2599-5\\_19](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2599-5_19)
- Cortés, N., Ordóñez, P., & Domínguez, J. (2019). *Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión*. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v11n4/2448-6698-rmcp-11-04-1150.pdf>

- De Long, Z., He Xu, J., & Pan, J. (2007). *Significant Improvement of Serratia marcescens Lipase Fermentation, by Optimizing Medium, Induction, and Oxygen Supply*. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0023-6>
- Drapala, A., & Hernández, D. (2018). *Elaboración de cerveza de maíz*. Obtenido de [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/11455/drapala-hernandez-2018.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/11455/drapala-hernandez-2018.pdf)
- 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*. Obtenido de <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/3361/1/FERMENTACION%20DE%20CACAO.pdf>
- Flores, M., Zavaleta, A., Zambrano, Y., Cervantes, L., & Izaguirre, V. (2010). *Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico*. Obtenido de <https://doi.org/10.15381/ci.v13i1.3224>
- García, G., González, M., & Palma, J. (2019). *Las proteasas de serina bacterianas y su implicación en la fisiopatología de la infección*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-pdf-S1888400819300303>
- García, J. (2007). *Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotificación*. Obtenido de <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10742/Identificacion%20de%20bacterias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, P. (2000). *Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional durante el beneficio de cacao*. Obtenido de [https://www.imbe.fr/docrestreint.api/943/7bbbbdc0bfa6560b0be9b002f3667d292e43153f/pdf/re-11\\_2000\\_maestria\\_pedro\\_garcia\\_allamilla\\_9066\\_.pdf](https://www.imbe.fr/docrestreint.api/943/7bbbbdc0bfa6560b0be9b002f3667d292e43153f/pdf/re-11_2000_maestria_pedro_garcia_allamilla_9066_.pdf)
- Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/59401/GERARD%20-%20Caracterizaci%F3n%20de%20bacterias%20del%20%20Elcido%20ac%20E9tico%20destinadas%20a%20la%20producci%F3n%20de%20vinagres%20de....pdf;jsessionid=D9EE5C50D9DC50B3765940720238D860?sequence=1>
- González, J., Moreno, V., & del Monte, A. (2010). *Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial*. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574/38075>
- González, R., Pérez, A., Ventura, L., Sánchez, P., Sanz, P., Fernández, M., . . . Ramón, D. (1993). *Manipulación genética de la síntesis de enzimas fúngicas de uso en industrias de alimentos*. Obtenido de <https://digital.csic.es/bitstream/10261/41727/1/sem.pdf>

- Govind, N., Mehta, B., Sharma, M., & Modi, V. (1981). *Protease and carotenogenesis in Blakeslea trispora*. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Protease-and-carotenogenesis-in-Blakeslea-trispora-Govind-Mehta/dc556c64a7af431d7b9784fcb74c89b475af32f3>
- Guerrero, L. (2018). *Identificación y evaluación de la actividad metabólica de microorganismos contaminantes representativos de la etapa de elaboración de azúcar*. Obtenido de <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/4346/1/Identificaci%20y%20evaluaci%20de%20la%20actividad%20metab%20lica%20de%20microorganismos%20contaminantes%20representativos%20de%20la%20etapa%20de%20elaboraci%20de%20az%20car..p>
- Hernández, S. (2016). *Aislamiento, caracterización e identificación molecular de microorganismos productores de lipasas nativos del estado de Sinaloa*. Obtenido de <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/117/1/Tesis%20Final%20Sandy%20Hernandez%20231116.pdf>
- Jofré, J. (2012). *Mejoramiento de la termoestabilidad de enzimas mediante dinámica molecular y análisis de componentes principales*. Obtenido de <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/114024>
- Linares, J. (2021). *Selección de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales por su capacidad antimicrobiana y su uso en biopreservación de alimentos*. Obtenido de <http://repositorio.uach.mx/388/1/TESIS%20Jose%20Linares%207-1-2021.pdf>
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). *Microbial Enzymes of Use in Industry*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Lizano Chehin, O. A. (2012). *Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica de Pseudoalteromonas Atlantica aislada de la Bahía de Paracas*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3221>
- Loango, N. (2015). *Utilización de glicerol proveniente de la industria de biodiesel como fuente de carbono para la producción de lipasas recombinantes en Pichia pastoris*. Obtenido de <https://www.tdx.cat/handle/10803/313455#page=1>
- López, J., Moran, K., Placier, D., & López, A. (2017). *Tecnología del ADN recombinante*. Obtenido de <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/2627/2062>
- López, O. (2015). *Búsqueda de enzimas lipolíticas termófilas y expresión en microorganismos mesófilos*. Obtenido de <http://hdl.handle.net/2183/14799>
- Maisincho, M. (2006). *Fermentación de cacao (Theobroma cacao) variedad CCN-51 inoculando Acetobacter*. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3341/1/P80%20Ref.2969.pdf>

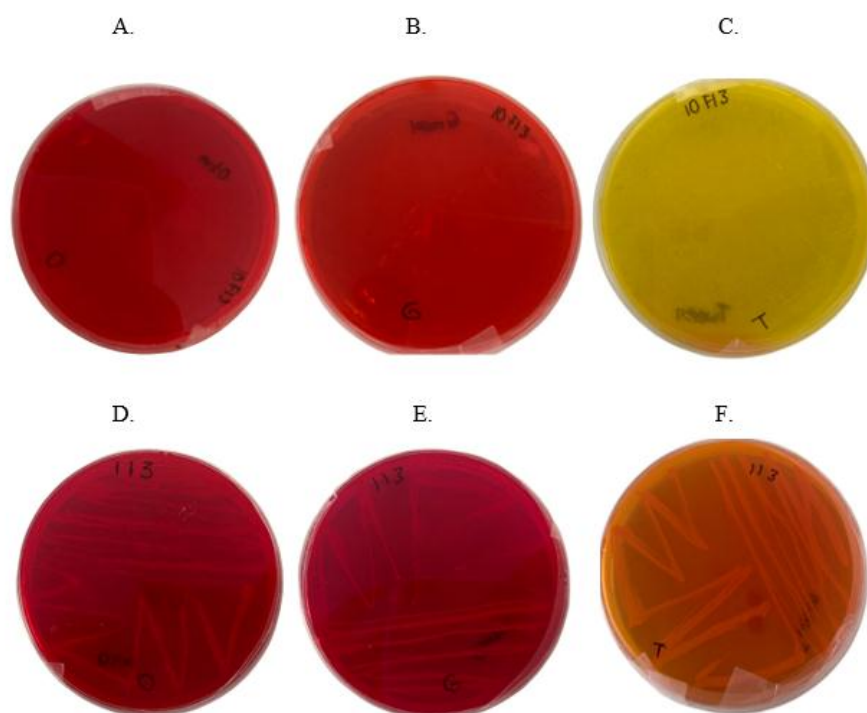
- Menor, C. (2019). SDS-PAGE: *Electroforesis en gel de poliacrilamida* . Obtenido de <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>
- Montes, L. (2020). *Caracterización bioquímica de la proteasa producida por Bacillus licheniformis LB04*. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/22380/1/1080315389.pdf>
- Moral, S., Ramírez, L., & García, M. (2015). *Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos*. Obtenido de <http://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000102.pdf>
- Moreno, J. (2019). *Estudio de la ecología microbiana en las fermentaciones de cacao*. Obtenido de <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/10263/MORENO%20REYES%2C%20JONATAN%20BARUC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Peña, C., & Quirasco, M. (2014). *¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible*. Obtenido de <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/art94.pdf>
- Pérez, M., Soriano, J., Ponce, E., & Díaz, L. (2015). *Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6020409>
- Pujato, S. (2017). *Fagos autóctonos de Leuconostoc: caracterización, interacción con sus cepas sensibles e implicancias industriales*. Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1050/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=n>
- Queiroz, C., & Barbosa, A. (2020). *Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos*. Obtenido de <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13970/11676>
- Ramakrishnan, V., Narayan, B., & Halami, P. (2019). *Lipase of Lactic Acid Bacteria*. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/337959058>
- Ramesh, A., Harani, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). *Microbial Ezymes: Roles and Applications in Industries*. Obtenido de [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1710-5\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1710-5_8)
- Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M., & Deshpande, V. (1998). *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998?src=getftr>
- Rigo, D., Gayeski, L., Albuquerque, G., Dalmaso, F., Zeni, J., Valduga, E., . . . Toniazzi, G. (2021). *Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão*. Obtenido de <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/23661/19022>
- Sahagun, M., Villanueva, S., Lugo, E., & García, M. (2021). *Incremento de la actividad proteasa de la cepa nativa Leuconostoc mesenteroides de carpa (Cyprinus carpio)*

- procedente del lago Chapala.* Obtenido de <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2022/03/Area-IV-Biotecnologia-Alimentaria.pdf>
- Salazar, L., Hinojoza, M., Acosta, M., Escobar, A., & Vásquez, A. (2020). *Caracterización, clasificación y usos de las enzimas en la producción industrial.* Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v39n4/1561-3011-ibi-39-04-e620.pdf>
- Suárez, M. L., Hernández, N. P., & Figueroa, C. Y. (2021). *Selección de levaduras y bacterias autóctonas de la fermentación de cacao mexicano para la formulación de cultivos iniciadores.* Obtenido de <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/2562>
- Wacher, M. (2011). *Microorganismos y chocolate.* Obtenido de <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf>
- Zhao, L., Ken, S., Yacine, H., & Don, O. (2018). *Protease activity of enzyme extracts from tamarillo fruit and their specific hydrolysis of bovine caseins.* *ELSEVIER*, 380 - 386. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918303193?via%3Dihub>



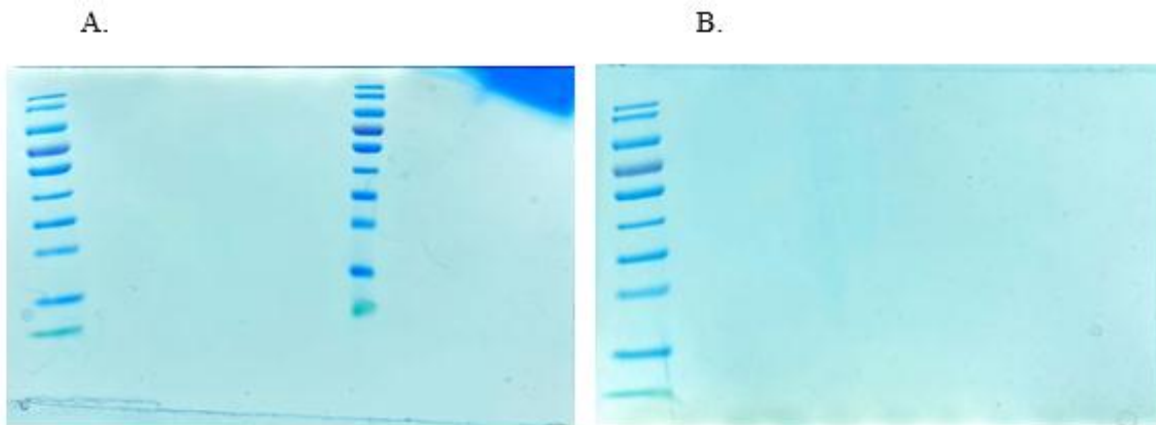
## ANEXOS

En el **Anexo 1** se observa las bacterias y levaduras cultivadas en diferentes sustratos con la finalidad de determinar en cuál de ellos se evidencia mejor la actividad lipolítica. Dando como mejor sustrato el Tween 80.



**Anexo 1.** Ensayos en medios sólidos utilizando diferentes sustratos. A, B y C. corresponden a bacterias y D, E y F a levaduras. A y D sustrato de aceite de oliva, B y E sustrato de aceite de girasol y C y F sustrato de Tween 80.

Una vez producidas las enzimas en medio líquido se procedió a realizar geles de SDS-PAGE para corroborar la presencia de proteínas en el sobrenadante extracelular, sobrenadante extracelular filtrado, sobrenadante sonificado, sobrenadante sonificado centrifugado y sobrenadante sonificado centrifugado y filtrado, de muestras que fueron cultivadas en medios con y sin Tween 80, como se observa en el **Anexo 2**.



**Anexo 2.** Geles SDS-PAGE de enzima lipolítica. A. enzima obtenida de un medio sin Tween 80, B. enzima obtenida de un medio con Tween 80.

En ambos casos no se logró evidenciar la presencia de bandas que indiquen la existencia de proteínas, por lo que se procedió a realizar una concentración con sulfato de amonio con una saturación del 80%. Sin embargo, no fue posible precipitar a las proteínas únicamente se evidencio una separación de dos fases como se observa en el **Anexo 3**. Esto se debe a que el Tween 80 es un agente emulgente no iónico, que tiene un amplio e intenso poder emulgente y suspensor que es poco afectable por altas concentraciones de electrolitos.



**Anexo 3.** Diálisis del sobrenadante con enzima lipolítica, saturación al 80% con sulfato de amonio.