



La Santiago
transforma
tu mundo



**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA EN MICROBIOTA
LEVADURIFORME ASOCIADA A SUELOS Y FRUTOS DEL VALLE DEL CAUCA**

**Hurtado Galindo, Manuela
Otálvaro Hernández, Dana Vanesa**

**Director
Ms.C. Iván Andrés González Vargas
Director
Ph.D. Raúl Alberto Cuervo Mulet**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de microbiología
Cali, Colombia
2020**



La Santiago
transforma
tu mundo



**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA EN MICROBIOTA
LEVADURIFORME ASOCIADA A SUELOS Y FRUTOS DEL VALLE DEL
CAUCA**

**Hurtado Galindo, Manuela
Otálvaro Hernández, Dana Vanesa**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo(a).**

**Director:
Ms.C. Iván Andrés González Vargas
Director:
Ph.D. Raúl Alberto Cuervo Mulet**

**Línea de Investigación:
Biología molecular – Universidad San Buenaventura Cali, Universidad Santiago de
Cali
Grupo de Investigación:
GIMIA y (BIOTECNOLOGÍA – Universidad San Buenaventura Cali)**

**Programa de Microbiología
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia
2020**



IMPACTOS

Impactos que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	De ser utilizadas estas levaduras pectinolíticas identificadas es posible bajar los costos en la utilización de pectinasas importadas asociados a la utilización de este tipo de proteínas en la industria.	Agroindustria de sector bebidas y jugos naturales en general
Responsabilidad social	NA	NA
Científico	Poster citii2 (Universidad Santiago de cali)	Comunidad científica
Indicadores de Gestión	NA	NA
Tecnológico	Desarrollo de una metodología para la identificación de levaduras pectinolíticas nativas de la región vallecaucana	Comunidad científica
Técnico	NA	NA
Ambiental	Los aislados fueron obtenidos de muestras de suelos y frutas de la región vallecaucana, permitiendo conocer más sobre las potencialidades de las levaduras nativas en nuestro medio.	Agroindustrias que utilicen pectinasas para la degradación de las pectinas
Social	Apropiación social de conocimiento	Industria y comunidad científica
Cultural	NA	NA



DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA EN MICROBIOTA LEVADURIFORME ASOCIADA A SUELOS Y FRUTOS DEL VALLE DEL CAUCA

Manuela Hurtado Galindo ¹, Dana Vanessa Otálvaro H ¹, Raúl Alberto Cuervo M ², Iván Andrés González Vargas ¹, Rosa del Pilar Cogua¹

¹ Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Santiago de Cali, Colombia

² Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura - Cali, Colombia

RESUMEN

Las pectinas son polisacáridos caracterizados por una estructura compleja y propiedades gelificantes. En algunos procesos industriales, la pectina debe ser eliminada debido a su capacidad de retener líquidos y enturbiar el producto, esta se puede degradar empleando pectinasas. En este estudio se determinó la producción de pectinasas de interés industrial en especies levaduriformes aisladas a partir de suelos y frutos de la región del Valle del Cauca. Se evaluó la actividad de las enzimas pectinolíticas a diferentes temperaturas y pH mediante DNS y se realizó una identificación morfológica y fisiológica para los aislados obtenidos. Los aislados positivos presentaron producción de pectinasas a temperaturas bajas, lo cual aporta a la literatura sobre pectinasas frías y hace que las levaduras presenten potencial frente a la producción de pectinasas por hongos filamentosos. De la gran diversidad de levaduras sólo algunas poseen actividad pectinolítica y estas difieren en su capacidad y/o velocidad de reacción.

Palabras clave: Levaduras, Actividad enzimática, Pectinasas, Método DNS

DETERMINATION OF PECTINOLYTIC ACTIVITY IN YEASTS ASSOCIATED WITH SOILS AND FRUITS OF VALLE DEL CAUCA

ABSTRACT

Pectins are polysaccharides characterized by a complex structure and gelling properties. In some industrial processes, pectin must be eliminated due to its ability to retain liquids and cloud the product. It can be degraded using pectinases. In this study, the production of pectinases of industrial interest was determined in isolated levaduriform sp. from soils and fruits of the Valle del Cauca region, in Colombia. The activity of the pectinolytic enzymes at different temperatures and pH was evaluated by DNS and a morphological and physiological identification was performed for the isolates obtained. The positive isolates showed pectinase production at low temperatures, which provides new data on cold pectinases. This investigation shows, of the great diversity of yeasts only some have pectinolytic activity, and these differ in their capacity and / or speed of reaction.

Keywords: Yeasts, Enzymatic activity, Pectinases, DNS method

1. INTRODUCCIÓN

Las pectinas son polisacáridos caracterizados por una estructura compleja y propiedades gelificantes. Su unidad estructural principal es la unidad de ácido α -1,4-d-galacturónico (GalA), que forma parte de tres dominios principales de pectina: homogalacturonano (HGA), rhamnogalacturonano I (RGI) y rhamnogalacturonano II (RGII), presentando variaciones en la composición, estructura y peso molecular [1]; este polisacárido fue aislado por primera vez por el



químico francés Henri Braconnot en 1825, quien la designó como “pectina”, que deriva del griego pektikos, que significa congelar o solidificar [2].

Numerosos microorganismos producen pectinasas, que son enzimas que degradan la pectina. En la producción industrial de jugos de frutas y vegetales, la pectina debe ser eliminada debido a su capacidad de retener líquidos y enturbiar el producto. Por su acción pectinolítica, las pectinasas liberan el jugo retenido en la pectina de las paredes celulares vegetales, aumentando el rendimiento de extracción del jugo y mejorando su calidad. También facilitan la clarificación de vinos y cervezas. La comunidad científica ha mostrado un gran interés por estas enzimas (pectinasa, celulasa) por su aplicación industrial en la producción de alimentos, en la fermentación alcohólica de granos, en la extracción de zumos de frutas y verduras, en la industria de la pulpa y el papel, en las industrias textil, alimentaria, química, de combustible, entre otras [3].

Se ha confirmado la efectividad del uso de levaduras no *Saccharomyces* para la mejora de parámetros como la extracción de polifenoles, antocianos y otros pigmentos, o la contribución a la mejora de la turbidez y filtrabilidad de los vinos [4]. También se ha podido estudiar que la actividad poligalacturonasa de *Metschnikowia pulcherrima* es efectiva para la mejora de los citados parámetros en la elaboración de vinos tintos tanto a escala de laboratorio como a escala industrial [4]. Los resultados de diferentes investigaciones sugieren que, de un total de 16 especies de levaduras analizadas, aisladas de ambientes enológicos, tan solo *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Monilia fructicola* mostraron actividad poligalacturonasa. Otros estudios han descrito la presencia de dicha actividad en cepas de *Meyerozyma guilliermondii* y *Debaryomyces hansenii* pero de orígenes no enológicos [4] [5].

Se han informado pectinasas de varias especies de levaduras entre ellas *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Rhodotorula sp.*, *A. pullulans* y *Candida sp.*, con actividad especialmente poligalacturonasa, lo cual presenta una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales que demuestran ser ventajosas sobre los mohos con respecto a la producción de pectinasas, debido a su naturaleza unicelular, crecimiento simple y no requerimiento de medio de crecimiento inductor. Además, la clonación y manipulación de genes pueden mejorar la producción de enzimas, lo que sugiere que la producción de enzimas comerciales por levaduras puede ser prometedora. En relación con la obtención de pectinasa, las levaduras generalmente no secretan pectinmetil esterasa (PME) y, por lo tanto, sus pectinasas pueden usarse para clarificar jugo de frutas y vino sin liberar metanol [6].

Las enzimas de uso industrial son almacenadas luego de producidas, ya sea por el fabricante hasta su comercialización o por el usuario hasta su utilización. Durante el período de almacenamiento, y dependiendo de las condiciones en que éste se realice, el producto puede deteriorarse y las enzimas van perdiendo su actividad [7]. La pérdida de estabilidad enzimática es causada por factores físicos (radiación, temperatura, fuerzas mecánicas), químicos (ácidos, álcalis, quelantes, metales pesados, solventes orgánicos, variaciones de pH), o biológicos (proteasas) que pueden llevar a procesos de inestabilidad física como desnaturalización, agregación y formación de partículas insolubles e inestabilidad química como oxidación, deamidación, alteración de puentes disulfuro, que generan en conjunto pérdida total de la integridad estructural de la enzima y por tanto su actividad [8].

La adición de preparados enzimáticos fúngicos constituye un coste significativo para las bodegas, por lo que la búsqueda de levaduras capaces de producirlos establece un objetivo interesante. Se ha descrito que al menos un 75% de las cepas enológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentan una actividad pectinolítica muy limitada. En este contexto se han desarrollado un gran número de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* con actividades pectinolíticas heterólogas más eficientes mediante ingeniería genética del gen PGU1 de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la falta de aceptación de organismos genéticamente modificados en la industria enológica obliga a la búsqueda de levaduras naturales como fuente alternativa de enzimas pectinolíticas [4]. El valle del Cauca es un gran productor industrial de jugos y bebidas alcohólicas, presentando los problemas mencionados



anteriormente. Adicional a esto, hasta el momento existe poca literatura en cuanto a producción de pectinasas en el Valle del Cauca. Por esto se da la necesidad de conocer especies levaduriformes autóctonas de la región para evitar gastos en la importación de enzimas pectinolíticas.

Esta investigación tiene como objetivo determinar la actividad pectinolítica en especies levaduriformes de interés industrial aisladas a partir de suelos y frutos de la región del Valle del Cauca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 obtención de muestras

Las muestras evaluadas en este estudio fueron tomadas de suelo y frutas en las localidades de Zabaletas (3°44'25.9"N 76°58'01.5"W), Anchicaya (3°44'25.3"N 77°02'29.6"W), Aguaclara (3°40'18.8"N 76°56'38.2"W), Bajo calima (4°00'05.0"N 76°58'33.4"W); bahía de Buenaventura: 3°54'02.6"N 77°05'53.8"W; 3°55'21.5"N 77°07'08.6"W y el Estero hondo 3°48'48.3"N 77°05'57.8"W en la costa pacífica Vallecaucana. Estas fueron guardadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 4°C hasta su tratamiento.

En el caso de las muestras de suelo, se colectaron aproximadamente 10 gramos en rangos de profundidad de 0 a 30 cm, estos se depositaron en bolsas estériles y se rotularon indicando el lugar de colecta [9]; las frutas Chontaduro (*Bactris gasipaes*), borojó (*Borojoa patinoi*), lulo (*Solanum tojiro*), banano (*Musa paradisiaca*) y guayaba agria (*psidium araca*), se cosecharon de forma aséptica, por triplicado y se depositaron en bolsas estériles.

2.2 Aislamiento levaduriforme

El proceso de aislamiento en muestras de origen vegetal (frutas), se realizó empleando la parte externa (exocarpo) y la parte interna (mesocarpo) de cada una de las frutas recolectadas, haciendo un enjuague inicial con abundante agua destilada estéril, posterior a esto, con ayuda de un bisturí estéril se cortaron 50 g de fruto y se disolvieron en 450 mL de agua peptonada [10]. Para el aislamiento a partir de muestras de suelo, se diluyeron 8 g de cada muestra en 100 mL de agua peptonada al 0,1% (p/v). La siembra se realizó inoculando 100 µL de muestra en cajas de Petri que contenían medio YPDA, el cual está compuesto por: Extracto de levadura 10 g/L (Scharlau), Peptona 20 g/L (OXOID), Glucosa 20 g/L (Scharlau), Agar-agar 15 g/L (Scharlau), y Cloranfenicol 0,2 g/L. Todas las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas y se realizaron resiembras para cada una de las colonias aisladas hasta lograr cultivos axénicos [11].

2.3 Identificación de aislados levaduriformes

La identificación y caracterización de los aislados levaduriformes se realizó evaluando sus características morfológicas y fisiológicas

- La caracterización morfológica se realizó en cultivos axénicos en YPDA, describiendo el color de la colonia, textura, forma y apariencia del borde.
- La caracterización fisiológica se determinó mediante la evaluación de osmotolerancia, halotolerancia y tolerancia a etanol; la osmotolerancia se evaluó al 60% p/v de glucosa y la halotolerancia al 15% p/v de NaCl₂, ambos incorporados medio YPDA y se incubaron durante 48 horas. Para la tolerancia a etanol, se empleó el 15% v/v en caldo YPD, se dejó incubar 48 horas y se sembró en placas de YPDA. Los ensayos de crecimiento se realizaron con incubación a 30°C [12].



2.4 Determinación de actividad pectinolítica

La determinación se realizó mediante crecimiento de las cepas levaduriformes en un medio rico en pectina, compuesto por Pectina cítrica 4g/L; Extracto de levadura 2g/L (Scharlau); Agar 16g/L (Scharlau); KH_2PO_4 0,2g/L (Merck); CaCl_2 0,05g/L (Merck); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L (Merck); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08 g/L (Merck); pH 4,5 [13]. Las placas se incubaron a 30°C durante 6 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se revelaron todas las placas adicionando una solución de Lugol a cada una de ellas. La selección de las cepas levaduriformes con actividad pectinolítica se realizó de forma visual mediante la identificación de las colonias que desarrollaron un halo de clarificación a su alrededor [14].

2.5 Obtención de extractos enzimáticos

La extracción de la pectinasa se realizó a partir de las cepas positivas obtenidas en la prueba anterior; las cepas se ajustaron a una concentración de 10^6 cel/mL empleando una cámara de Neubauer y se crecieron en 250 mL de medio que contenía: 1g de Pectina cítrica; 0,0125g de CaCl_2 ; 0,25g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05g de KH_2PO_4 y 0,02g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 4.5; éstas muestras se mantuvieron en agitación a 150 rpm durante 6 días a 30°C. El extracto enzimático se obtuvo mediante centrifugación por 20 minutos a 10000 rpm, y posteriormente se realizó filtración por membrana (0,45 μm) [10]. La actividad de las enzimas pectinolíticas fue cuantificada por el seguimiento del aumento de azúcares reductores a diferentes temperaturas (5°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C y 55°C) y pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Para evaluar los diferentes rangos de pH, se empleó una solución tampón de acetato de sodio para rangos de pH entre 3 y 5; y una solución de fosfato de sodio para rangos de pH entre 5 y 9. La mezcla de reacción para evaluar tanto el efecto de pH y temperatura estaba compuesta por 0,5 mL de pectina al 1% (p/v); 0,5 mL de extracto enzimático y 0,5 mL de buffer necesario para el ajuste a cada pH. Para el ensayo a diferentes pH, se incubaron las muestras a 30°C por 90 minutos y para el ensayo a diferentes temperaturas, se mantuvo un pH de 4 para todas las muestras y se incubaron por 90 minutos a las diferentes temperaturas descritas. Después la reacción fue frenada con hielo durante 5 minutos y posteriormente los azúcares reductores fueron cuantificados por medio de la técnica de DNS [15]. La unidad de actividad (U/mL) se definió como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de equivalente reductor (glucosa) por minuto bajo las condiciones de la prueba.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización morfológica

Se obtuvieron 52 aislados levaduriformes, de los cuales se identificó sus características morfológicas, describiendo el color de la colonia, la textura, forma y apariencia del borde (ver tabla 1). Algunas de las características descritas se pueden observar en la figura 1, donde cada muestra se sembró por triplicado en agar YPD en sentido 1-3→4-6.



Tabla 1. Características morfológicas de aislados levaduriformes provenientes de muestras de suelos y frutos del Valle del Cauca

Aislado	Color	Textura y Superficie	Forma y Borde	Origen
1	Amarillo	Cremosa-Convexa	Irregular-Ondulado	Suelo
3	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Irregular-Ondulado	Suelo
4	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Suelo
5	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Suelo
10	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Suelo
14	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Suelo
19	Naranja	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Suelo
21	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Irregular-Ondulado	Suelo
25	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Suelo
27	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
30	Beige	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
31	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
32	Amarillo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
35	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
38	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Guayaba agria
41	Rosado	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
42	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
46	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
48	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Banano
52	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
56	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
60	Amarillo	Opaca- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
64	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Banano
65	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Banano
67	Naranja	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
68	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
70	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
76	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Banano
78	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Irregular-Ondulado	Banano
81	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
82	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Banano
93	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
94	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
95	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Lulo
99	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Lulo
103	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Lulo
104	Beige	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Lulo
105	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Irregular-Rizoide	Lulo
108	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
109	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
110	Beige	Cremosa- Convexa	Irregular-Ondulado	Banano
111	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Banano
117	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Lulo
128	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Ondulado	Chontaduro
130	Beige	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Chontaduro



132	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Chontaduro
133	Beige	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Chontaduro
146	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Chontaduro
147	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Borojó
148	Blanco	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Borojó
152	Blanco grisáceo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Borojó
153	Amarillo	Cremosa- Convexa	Circular-Redondeado	Borojó

Total: 52

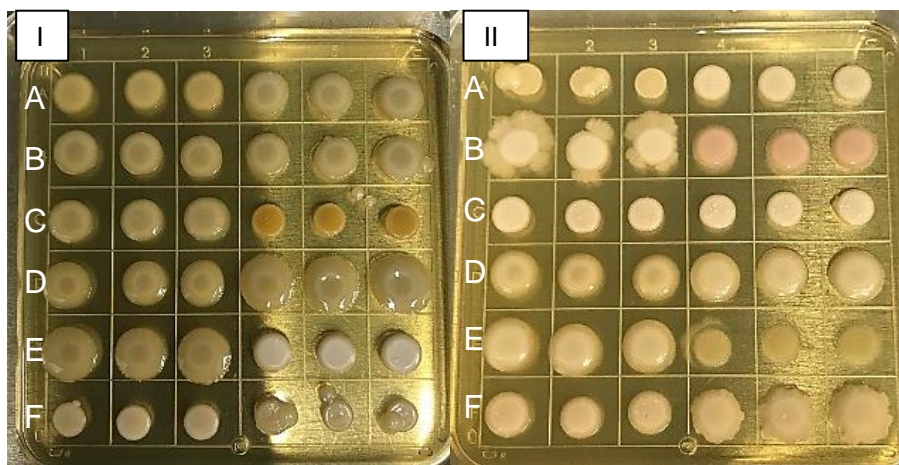


Fig. 1. Características macroscópicas de levaduras obtenidas a partir de las muestras de suelos y frutos del Valle del Cauca, sembradas de izquierda a derecha por triplicado (1,2,3) Y (4,5,6) en agar YPD; I) Aislado # 1,3,4,5,10,19,14,21,25,27,30,31; II) Aislado #32,35,38,41,42,46,48,52,56,60,64,65.

La mayoría de los aislados obtenidos presentaron colonias de color blanco, cremosas y de forma esférica regular. Se ha demostrado que el predominio de las colonias de color blanco o crema frente a las rosadas o pigmentadas radica en las condiciones climáticas características de la zona, tales como cielos nublados, lluvias constantes, altura a nivel del mar [16]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la producción de pigmentos es un mecanismo de fotoprotección de las levaduras a la exposición intensa a los rayos ultravioleta y aunque los sitios de muestreo en este estudio generalmente estaban expuestos a los rayos uv, los frutos son protegidos de estos por las ramas de los árboles, lo que puede evitar la producción de pigmentos [17].

Una de las características que puede explicar las diferencias en el número de aislados presentes en este estudio en relación con los publicados, corresponde a la cantidad de azúcares disponibles para el crecimiento de microorganismos [18].

3.2. Caracterización Fisiológica

La prueba de osmotolerancia, tolerancia a etanol y halotolerancia se muestran en la tabla 2; en el que se encontró que 28 aislados son osmotolerantes, 4 aislados son tolerantes al etanol, y 9 toleraron concentraciones de 15% de NaCl.



Tabla 2. Características fisiológicas de aislados levaduriformes provenientes de muestras de suelos y frutos del Valle del Cauca

Aislado	Crecimiento en glucosa 60% p/v	Crecimiento en etanol 15% v/v	Crecimiento en NaCl 15% p/v	Origen
1	-	-	-	Suelo
3	-	-	-	Suelo
4	-	-	-	Suelo
5	-	-	-	Suelo
10	-	-	-	Suelo
19	-	-	-	Suelo
14	-	-	-	Suelo
21	-	-	-	Suelo
25	-	-	-	Suelo
27	+	+	+	Guayaba agria
30	+	-	-	Guayaba agria
31	+	-	-	Guayaba agria
32	+	+	-	Guayaba agria
35	+	-	+	Guayaba agria
38	-	-	-	Guayaba agria
41	+	+	-	Banano
42	+	+	+	Banano
46	+	-	+	Banano
48	+	-	-	Banano
52	-	-	-	Banano
56	-	-	-	Banano
60	+	-	-	Banano
64	-	-	-	Banano
65	-	-	-	Banano
67	+	-	-	Banano
68	+	-	-	Banano
70	+	-	+	Banano
76	+	-	-	Banano
78	-	-	-	Banano
81	-	-	-	Banano
82	-	-	-	Banano
93	-	-	-	Banano
94	-	-	-	Banano
99	-	-	-	Lulo
95	-	-	-	Lulo
103	+	-	-	Lulo
104	+	-	-	Lulo
105	+	-	+	Lulo
108	+	-	+	Banano
109	+	-	+	Banano
110	+	-	+	Banano
111	+	-	+	Banano
117	+	-	+	Lulo



128	+	-	-	Chontaduro
130	-	-	-	Chontaduro
132	+	-	-	Chontaduro
133	+	-	-	Chontaduro
146	+	-	-	Chontaduro
147	+	-	-	Boroj3
148	+	-	+	Boroj3
152	-	-	-	Boroj3
153	-	-	-	Boroj3
Total: 52				

Al evaluar el efecto de una alta concentraci3n de glucosa en el medio (60% p/v), se observa que el crecimiento se ve afectado en comparaci3n con la glucosa a1adida en medio convencional (2% p/v). La ausencia de crecimiento de los aislados levaduriformes bajo las condiciones de concentraciones de glucosa evaluadas pudo ser consecuencia de la respuesta primaria hacia el estr3s osm3tico al que estuvieron expuestas continuamente las levaduras [19]. por otra parte, los 28 aislados tolerantes a altas concentraciones de glucosa encontrados en este estudio pueden ser de gran importancia en la industria para procesos fermentativos como producci3n de etanol a partir de sustratos con elevados niveles de az3car, producci3n de salsa de soja y salsas orientales.

El crecimiento a concentraciones al 60% p/v de az3car (ver tabla 2), observado en los aislados obtenidos en este estudio, pueden ser explicados por los mecanismos de respuesta al estr3s entre los que se distinguen cambios celulares inmediatos, que ocurren como consecuencia de las fuerzas f3sico-mec3nicas que se presentan bajo estas condiciones, procesos de defensa primaria que buscan dar protecci3n a la c3lula, reparaci3n y recuperaci3n, al igual que eventos adaptativos que permiten la restauraci3n de la homeostasis celular bajo las nuevas circunstancias [19]. Se debe tener en cuenta que las levaduras que habitan la filofera est3n expuestas a continuas fluctuaciones ambientales que afectan su desarrollo, siendo una de las m3s limitantes la actividad de agua (Aw). Sin embargo, las levaduras han desarrollado mecanismos de defensa frente a cambios repentinos en la Aw, lo que puede relacionarse con la capacidad que poseen algunas para desarrollarse mejor que otras [16]. Adicionalmente, autores afirman que la tolerancia al alto contenido de az3car podr3a atribuirse a la alta tolerancia al estr3s general de estas especies y, que la capacidad de transportar eficientemente el glicerol a las c3lulas es un mecanismo esencial para combatir el estr3s osm3tico en muchas especies de levadura [12].

El etanol es bien conocido como un inhibidor del crecimiento de microorganismos. Se ha informado que da1a el ADN mitocondrial en las c3lulas de levadura y causa la inactivaci3n de algunas enzimas, como la hexoquinasa y la deshidrogenasa. Sin embargo, algunas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestran tolerancia y pueden adaptarse a altas concentraciones de etanol. Muchos estudios han documentado la alteraci3n de la composici3n lip3dica celular en respuesta a la exposici3n al etanol. Se ha encontrado que las c3lulas de *S. cerevisiae* cultivadas en presencia de etanol parecen aumentar la cantidad de 3cidos grasos monoinsaturados en los l3pidos celulares. Dado que las membranas celulares han recibido una amplia consideraci3n como objetivos principales del estr3s por etanol, muchos informes han sugerido una relaci3n entre las composiciones de 3cidos grasos de las membranas lip3dicas y la tolerancia al estr3s por etanol. Aunque la correlaci3n entre la tolerancia al etanol y el mayor grado de insaturaci3n de 3cidos grasos de los l3pidos de membrana de *S. cerevisiae* est3 bien documentada, a1n no se ha establecido una relaci3n causal [20]. En este estudio se encontraron 4 aislados que presentaron tolerancia a concentraciones de etanol al 15% v/v lo cual es una cantidad m3nima del total de los aislados, sin embargo, esto se puede explicar debido a que la alta concentraci3n de etanol pone en peligro la supervivencia de las c3lulas, mientras que, bajo niveles moderados de etanol, las c3lulas sobreviven, pero pueden tener



una capacidad de crecimiento y una tasa de fermentación muy reducidas. Por lo tanto, ambos aspectos de la tolerancia al etanol, el crecimiento y la supervivencia son factores clave en la producción de etanol, lo cual se debe tener en cuenta al emplear cepas en la fermentación de este compuesto [21]. Al comparar lo reportado en la literatura a cerca de la tolerancia a etanol y glucosa, con los resultados obtenidos en este estudio se puede inferir que los aislados 27, 32, 41 y 42 pueden tener una potente vía de producción de glicerol o lípidos y un buen mecanismo de absorción, lo cual puede ser evaluado en estudios posteriores. También se confirma que las condiciones de alta salinidad inducen ligeros cambios en el contenido total de esteroides, pero causan un aumento significativo en el contenido de fosfolípidos y el nivel de insaturación de ácidos grasos. Aunque se requiere más investigación, estas evidencias respaldan que existen mecanismos distintos para modular la integridad de la pared celular y la fluidez de la membrana plasmática en respuesta a las tensiones iónicas y no iónicas. Además, se demostró que al remodelar su integridad y fluidez, la célula de levadura establece un equilibrio mediante el cual la fuerza que impulsa el agua a través del gradiente osmótico hacia la célula es contrarrestada por la presión de turgencia contra la membrana plasmática y la pared celular [22].

Leaf by Lesaffre es una unidad de negocios dedicada a las ventas mundiales y al desarrollo del mercado de soluciones de fermentación de valor agregado para productores de bioetanol y productos químicos con base biológica, esta empresa vende "Ethanol Red" ®, una cepa de levadura de fermentación rápida y tolerante a la temperatura que es capaz de alcanzar una concentración final de etanol de hasta 18% (v / v) [23]. Teniendo en cuenta esta información, los aislados #27, 32, 41 y 42 podrían someterse a condiciones de estrés superiores a las evaluadas, hasta de un 20% v/v de etanol para corroborar su potencial y posible uso de estas por los ingenios productores de bioetanol.

3.2 Determinación de actividad pectinolítica y obtención de extractos enzimáticos

A partir del crecimiento de los aislados levaduriformes en medio rico en pectina, se pudo identificar que, de un total de 52 aislados, sólo 5 presentaron actividad pectinolítica, los cuales representan el 9,6% del total de los aislados levaduriformes. En la figura 2 se observan los aislados que resultaron positivos para actividad pectinolítica, los cuales forman halos de degradación superiores a 3 milímetros.

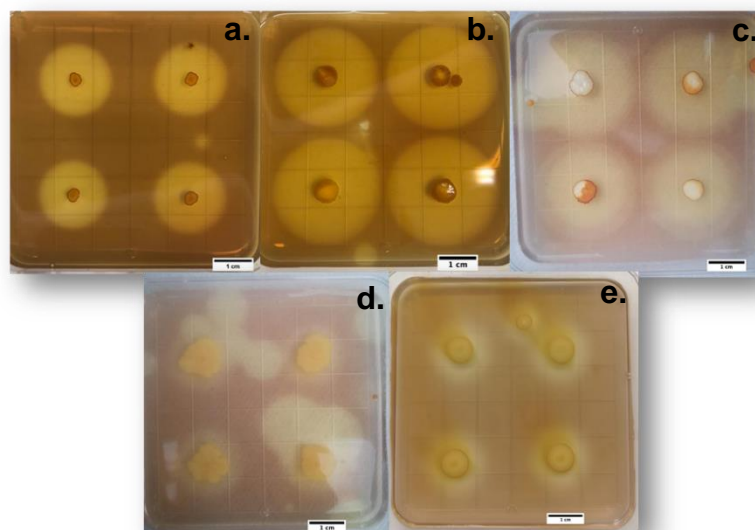


Fig. 2. Aislados levaduriformes sembrados en medio rico en Pectina, revelados con una solución de Lugol después de 6 días de incubación a 30°C. Los diámetros para cada ensayo arrojaron valores de: a) Aislado #1, halo de 1,94 cm; b) Aislado #19, halo de 2,68 cm; c) Aislado #30, halo de



2,89 cm; d) Aislado #67, halo de 2,45 cm; e) Aislado #146, halo de 1,70 cm. (todas las muestras fueron evaluadas en cuatro repeticiones y los halos medidos mediante imageJ).

La determinación cuantitativa de la actividad pectinolítica a diferentes temperaturas y pH mediante el método DNS, se representa en las siguientes gráficas.

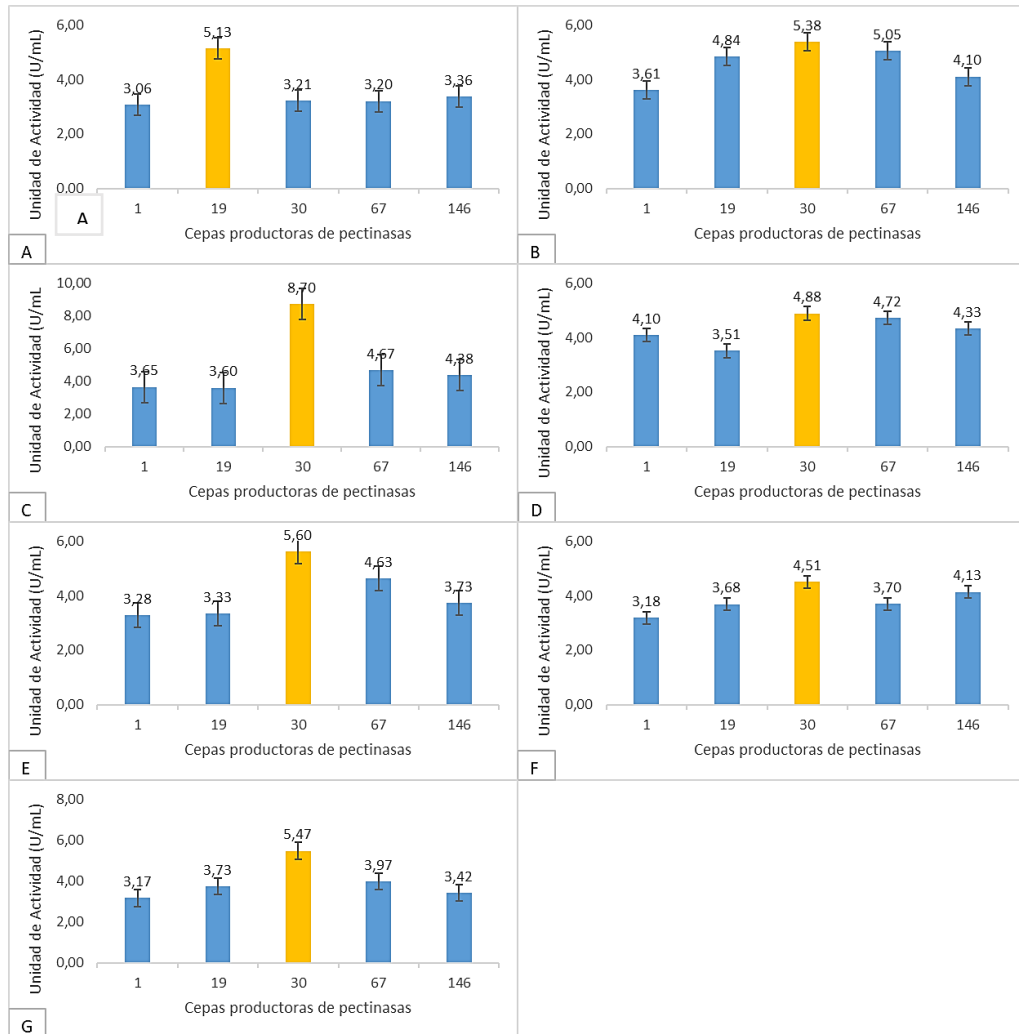


Fig. 3. Actividad enzimática total a diferentes concentraciones de pH, determinada por el método DNS. En la figura las letras A: pH 9, B: pH 8, C: pH 7, D: pH 6, E: pH 5, F: pH 4, G: pH 3, las barras de color amarillo corresponden a la mayor unidad de actividad enzimática; las barras de error indican la desviación estándar de la media de los valores.

La cepa que presentó mayor actividad pectinolítica por el método de DNS a diferente pH fue la #30 con un pH óptimo de 7 para producción de pectinasas, donde se obtuvieron 8,70 U/mL, seguida por las cepas #19 con un pH óptimo de 9 donde se obtuvo 5,13 U/mL y #67 con un pH óptimo de 8 y obtención de aproximadamente 5,05 U/mL (ver figura 3), resultados similares fueron obtenidos por



Khan y colaboradores, donde se demostró que el pH es un factor que influye en la actividad enzimática [24]. En otras investigaciones realizadas por Haile, se reportaron datos similares en donde informan por primera vez levaduras productoras de pectinasas identificadas durante la fermentación del café con una actividad de PG de 8.28 U/mL [13]. Al comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura se observa que los valores obtenidos son cercanos a los reportados por autores como García y colaboradores, donde levaduras como *Kluyveromyces marxianus* producen 3 U/mL de Poligalacturonasas totales [25].

La variabilidad observada en la actividad pectinolítica para los diferentes aislados puede ser explicada por diferencias asociadas a la especie, producción enzimática del microorganismo y condiciones de cultivo (pH inicial, tamaño del inóculo y período de incubación) [13]. A pesar de esto, la identificación de los aislados a nivel de especie obtenidos en este estudio no se realizó; por lo cual se hace necesario caracterizar molecularmente las cepas en estudios posteriores para compararlas con las reportadas en la literatura y evaluarlas en medios específicos de acuerdo con las necesidades de la industria, así como su actividad pectinolítica específica.

En el ensayo realizado por Arellano y colaboradores, en el cual se emplea una bacteria como fuente de pectinasas, se reportan halos de hidrólisis en medio sólido más grandes que los obtenidos en este estudio (entre 16,3 y 0.82 mm) [26]; sin embargo la actividad de pectinasa es menor a la de los aislados obtenidos, teniendo en cuenta los valores arrojados a pH 6 que es el mismo empleado en por Arellano y colaboradores, lo que permite inferir que el diámetro del halo de degradación obtenido en cada colonia no necesariamente es proporcional a las unidades enzimáticas producidas.

El estudio realizado por Echeverrigaray señala que la actividad enzimática total presentó mayor actividad a pH 4.8; adicionalmente menciona que la actividad óptima de los extractos enzimáticos comerciales se encuentra de pH 3 a pH 5 [27], rango en el cual se encuentra la actividad de las enzimas producidas por *K. marxianus*, considerada cepa referencia en la evaluación de actividad pectinolítica por levaduras. En este estudio, las enzimas pectinolíticas producidas por el aislado #30 presentaron su máxima actividad a pH 7 (8,7 U/mL) y un rango de actividad entre pH de 3 a 8, con actividades que van desde 4,51 a 8,70 U/mL; rango superior al registrado por preparaciones enzimáticas comerciales previamente descritas, lo cual puede ser prometedor en el caso de su inclusión en procesos que fluctúen en el rango de pH descrito.

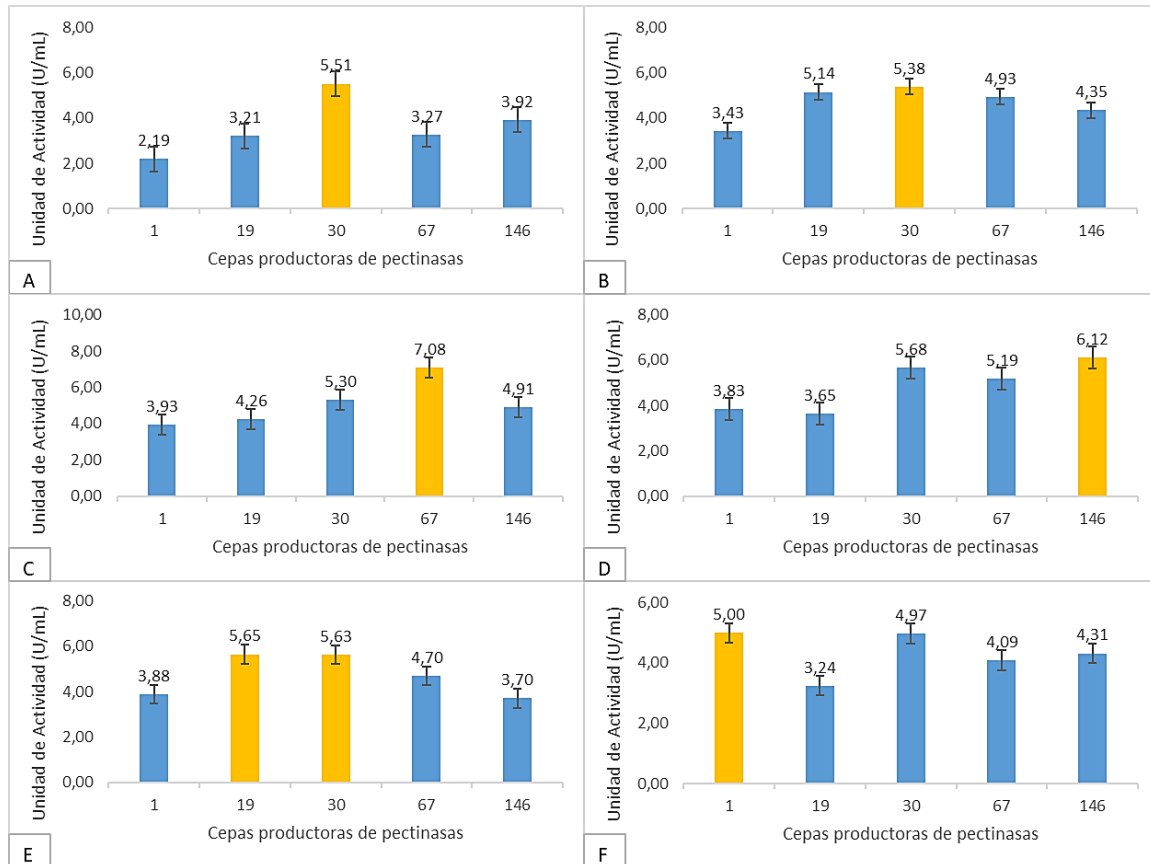


Fig. 4. Actividad enzimática total a diferentes condiciones de temperatura. En la figura A: 55°C, B: 45 °C, C: 37 °C, D: 30 °C, E: 20 °C y F: 5 °C. Las barras de color amarillo corresponden a la mayor unidad de actividad enzimática; las barras de error indican la desviación estándar de la media de los valores.

Las pectinasas comerciales tienen temperaturas de actividad óptimas entre 40°C y 60°C, pero algunos procesos (como la producción de vino blanco y pisco) ocurren a temperaturas más bajas; por lo tanto, las pectinasas que trabajan a temperaturas más bajas son necesarias [28]. En este trabajo se han identificado dos cepas levaduriformes (67-146) con una actividad pectinolítica óptima a 37°C (7,08 U/mL) y 30°C (6,12 U/mL) respectivamente, al menos 10°C más baja que la mayoría de las pectinasas fúngicas descritas hasta ahora. Estas cepas podrían ser utilizadas en procesos que requieran baja temperatura, donde esta altera las características organolépticas de los productos, como es el caso de la producción comercial de jugos. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Khan I. G y Barate D. L (2016) [24] y Echeverrigaray [27], donde el rango de temperatura óptimo de actividad enzimática en sus ensayos era de 30 a 37°C. La presencia de pectina en la composición del medio de cultivo es un factor importante, ya que influye sobre la diversidad y cantidad de enzimas pecticas, sabiendo además que la producción de enzimas pectinasas es inducible y no constitutivo [29].

En cuanto a la cepa #30, su temperatura óptima fue de 30°C, en la cual la actividad enzimática fue de 5,68 U/mL, sin embargo a una temperatura de 20°C la actividad pectinolítica obtenida fue similar



(5,63 U/mL), por lo tanto, se puede decir que este aislado levaduriforme tiene una temperatura óptima entre 20-30°C a pH 4. Estos resultados son consistentes con estudios previos, donde se encontró que la producción máxima de enzimas se obtuvo a las 48 h (5,91 U/mL) y la actividad enzimática óptima estaba en un rango de pH de 3.8 a 4.5 y en un rango de temperatura de 20 a 35 °C [6]. En otros estudios, hallaron que a la temperatura de 37°C y pH 5 la enzima fue más activa [30], lo que coincide con lo obtenido en este estudio con la cepa #67, la cual a esta temperatura evidenció la mayor actividad enzimática total respecto a las demás temperaturas evaluadas.

En la figura 4E y 4F se observa que los aislados presentan producción de pectinasas a temperaturas bajas, lo cual aporta a la literatura sobre pectinasas frías y hace que las levaduras presenten potencial frente a la producción de pectinasas por hongos filamentosos como *Aspergillus* que funcionan mal a temperaturas inferiores a 35° C [31]

5. CONCLUSIONES

Se logró aislar microbiota levaduriforme a partir de suelos, y frutos como borjón, lulo, chontaduro, banano y guayaba agria del Valle del Cauca, a los cuales se les realizó una caracterización macroscópica y algunos parámetros fisiológicos como tolerancia a etanol, glucosa y halotolerancia, encontrando 4, 28 y 9 aislados respectivamente. Lo anterior es de importante, puesto que, si se tiene en cuenta que las cepas levaduriformes utilizadas en la actualidad por los ingenios locales para la producción de etanol poseen aproximadamente una tolerancia de 15%, se abren las posibilidades para después de una caracterización molecular poder emplear estas cepas en este tipo de bioprocesos. No obstante, con los resultados obtenidos se sugiere una caracterización molecular para proporcionar información complementaria a la investigación.

Se determinó la actividad pectinolítica total a diferentes temperaturas y pH para los aislados encontrados como positivos, demostrando que ambas variables son factores que pueden aumentar o disminuir la actividad del sustrato enzimático pectinolítico, encontrándose actividades óptimas entre 30 y 45 °C y pH de 3 a 8. De esta forma las cepas (1, 19, 30, y 67) pueden ser potencialmente utilizadas en procesos agroindustriales dado que es en esta temperatura y pH donde se llevan a cabo la mayoría de estos. Además, los resultados confirman, que, de la gran diversidad de levaduras aisladas y caracterizadas, el 9,6%, poseen actividad pectinolítica, las cuales difieren en su capacidad y/o velocidad de reacción. Sin embargo, es importante identificar la actividad pectinolítica específica que tiene estos aislados levaduriformes en estudios posteriores.

6. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Santiago de Cali y la dirección general de investigaciones (DGI) por la financiación del proyecto número 934-621115-B2, titulado "*Caracterización de la microflora levaduriforme de interés agroindustrial (pectinasa) asociada a suelos, aguas y frutos del Valle del Cauca*", del cual hace parte nuestra investigación y a la universidad de San Buenaventura Cali por brindar los materiales y espacios necesarios para la realización de nuestros estudios. Gracias a Dios por guiar nuestro camino y darnos vida y salud para culminar nuestros estudios. A nuestros padres por su amor incondicional, comprensión y apoyo. A nuestras parejas por su apoyo y paciencia. A Iván por su cariño, perseverancia y por querer enseñarnos todo al detalle y a Raúl por brindarnos su conocimiento y apoyo durante la realización del proyecto.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Gawkowska, J. Ciesla, A. Zdunek, and J. Cybulska, "The Effect of Concentration on the Cross-Linking and Gelling of Sodium Carbonate-Soluble Apple Pectins," *molecules*, 2019.
- [2] N. Chasquibol Silva, E. Arroyo Benites, and J. C. Morales Gomero, "Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana," *Ing. Ind.*, vol. 26, pp. 175–199, 2008.
- [3] N. S. Avilés Muso and N. M. Tapia Ramírez, "Obtención de dos tipos de enzimas pectinasa (cáscara de naranja) celulasa (cáscara de plátano) y su evaluación en la producción de pulpa de manzana (*malus domestica*) y pera (*pyrus communis*) en los laboratorios académicos de la carrera de ingeniería agroin," Universidad Técnica de Cotopaxi, 2016.
- [4] I. Belda, J. Ruiz, A. Alonso, D. Marquina, E. Navascués, and A. Santos, "Actividades enzimáticas de levaduras no *Saccharomyces* para su aplicación enológica," *ACENOLOGÍA*, 2015.
- [5] J. Sanchez, J. P. Guiraud, and P. Galzy, "A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 4, pp. 262–267, 1984.
- [6] V. Poondla, R. Bandikari, and R. Subramanyam, "Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 70–76, 2014.
- [7] V. M. Taragano, "Pectinasas fúngicas: estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados," Universidad de Buenos Aires, 2000.
- [8] A. P. Flórez Wilches, "Evaluación de la estabilidad de un extracto enzimático, obtenido de *Penicillium* sp. HC1, con actividad endoxilanasas bajo condiciones de almacenamiento.," Pontificia Universidad Javeriana, 2018.
- [9] L. V. Ignatova, Y. V. Brazhnikova, R. Z. Berzhanova, and T. D. Mukasheva, "Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil," *Microbiol. Res.*, vol. 175, pp. 78–83, 2015.
- [10] R. A. Cuervo M., "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS NATIVAS CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL Y PECTINASAS," Universidad del Valle, 2014.
- [11] A. D. Koricha, D. Han, K. Bacha, and F. Bai, "Occurrence and Molecular Identification of Wild Yeast from Jimma Zone, Shouth West Ethiopia," pp. 1–15, 2019.
- [12] V. Mukherjee, D. Radecka, G. Aerts, K. J. Verstrepen, B. Lievens, and J. M. Thevelein, "Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2017.
- [13] M. Haile, "Isolation , Identification , and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Co f f ee Fermentation," 2019.
- [14] J. C. A. Barragán, S. A. I. Zerpa, M. L. S. Castillo, M. R. Haro, W. N. Alarcón, and F. O. Gasco, "Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp.," *Rev. Científica la Fac. Ciencias Biológicas*, vol. 34, no. 1, pp. 33–41, 2014.
- [15] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," no. III, 1959.
- [16] L. A. Uribe G., "CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LEVADURAS AISLADAS DE LA FILÓSFERA DE MORA," 2007.
- [17] D. Libkind, M. Moliné, and M. Van Broock, "Radiobiología," vol. 4, pp. 84–88, 2004.
- [18] M. C. Filho, M. B. D. Bertéli, and J. S. Valle, "Genetic diversity and pectinolytic activity of epiphytic yeasts from grape carposphere," vol. 16, no. 2, pp. 1–13, 2017.
- [19] W. H. Mager and M. Siderius, "Novel insights into the osmotic stress response of yeast," *FEMS Yeast Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 251–257, 2002.



- [20] K. M. You, D. C. Knipple, and C. Rosenfield, "Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 3, pp. 1499–1503, 2003.
- [21] R. Haas *et al.*, "Mapping Ethanol Tolerance in Budding Yeast Reveals High Genetic Variation in a Wild Isolate," *Front. Genet.*, vol. 10, no. November, pp. 1–17, 2019.
- [22] T. C. Dakal, L. Solieri, and P. Giudici, "Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 185, pp. 140–157, 2014.
- [23] Leaf by Lesaffre, "Products," 2020. [Online]. Available: https://lesaffreadvancedfermentations.com/ethanol_yeast/.
- [24] I. G. Khan and D. L. Barate, "Effect of Various Parameters on Activity of Pectinase Enzyme," vol. 4, no. 1, pp. 853–862, 2016.
- [25] A. R. García, M. I. Balbín, J. C. Cabrera, and A. Castelvij, "ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONASA DE UN PREPARADO DE LA LEVADURA *Kluyveromyces marxianus* AISLADA DE LA PULPA DEL CAFÉ," 2002.
- [26] J. Arellano, S. Ilich, M. Salazar, P. Torres, I. Rodríguez, and W. Alarcón, "Producción de pectinasas por *Bacillus* spp . a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono," *Rev. Científica la Fac. Ciencias Biológicas. Univ. Nac. Trujillo.*, vol. 35, no. 1, pp. 62–69, 2015.
- [27] S. Echeverrigaray, "Comparison of a pectinolytic extract of *Kluyveromyces marxianus* and a commercial enzyme preparation in the production of lves (*Vitis labrusca*) grape juice," 2015.
- [28] G. Poveda, C. G. Durán, I. Vaca, G. Levicán, and R. Chávez, "Cold - active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges," *Biol. Res.*, pp. 1–6, 2018.
- [29] G. A. Arroyo Orbegoso, "PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PECTINASAS POR ACTINOMYCETOS EN CULTIVO SUMERGIDO UTILIZANDO PECTINA Y CÁSCARA DE NARANJA," 2002.
- [30] P. Yu and C. Xu, "Production optimization , purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp . ZJ1407," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 108, pp. 972–980, 2018.
- [31] M. Carrasco, J. M. Rozas, J. Alcaíno, V. Cifuentes, and M. Baeza, "Pectinase secreted by psychrotolerant fungi : identification , molecular characterization and heterologous expression of a cold - active polygalacturonase from *Tetracladium* sp .," *Microb. Cell Fact.*, pp. 1–11, 2019.
- [32] M. J. Escobar Reyes, "Caracterización de levaduras aisladas a partir de frutos de durazno (*Prunus persica*), fresa (*Fragaria vesca*) y manzana (*Malus domestica*).," Universidad Técnica de Ambato, 2019.